

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİANYONLARIN BOVİN SERUM ALBUMİN İLE
KARIŞIMLARININ DÖRT DETEKTÖRLÜ MOLEKÜLER
ELEME KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE ANALİZİ**

Kimyager Murat TOPUZOĞULLARI

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
ÖZET	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Moleküler Eleme Kromatografisi	3
2.1.1 Ayırma Prensibi	3
2.1.2 Ayırmayı Etkileyen Faktörler	6
2.1.3 Etkileşimler	7
2.1.4 Moleküler Eleme Kromatografisinin Önemli Bileşenleri	7
2.1.4.1 Mobil Faz	7
2.1.4.2 Pompa Sistemi	7
2.1.4.3 Enjeksiyon	8
2.1.4.4 Dolgu Malzemeleri ve Kolonlar	8
2.1.5 Detektörler	10
2.1.5.1 Konsantrasyon Detektörleri	11
2.1.5.2 UV Detektörü	11
2.1.5.3 Kırılma İndisi (Refraktif İndeks, RI) Detektörü	12
2.1.5.4 Molekül Kütlesi Detektörleri	13
2.1.5.5 Viskozite Detektörü	14
2.1.5.6 Işık Saçılması Detektörü (RALS)	16
2.1.6 Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisi Kullanılarak Elde Edilen Veriler	18
2.2 Polimerlerde Molekül Kütlesi	19
2.2.1 Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı	19
2.2.2 Ağırlıkça Ortalama Molekül Ağırlığı	20
2.2.3 z-Ortalama Mol Kütlesi	20
2.2.4 Molekül Kütlesi Dağılımı	20
2.3 Mark-Houwink-Sakurada Eşitliği	21
2.4 Polimerlerde Boyut	22
2.5 Polielektrolitler	22
2.5.1 Homopolielektrolitler	23
2.5.2 Poliamfolitler	25
2.5.3 İnterpolielektrolit Kompleksler	27
2.6 Polikomplekslerin SEC’te İncelenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	33
3. DENEYSEL KISIM	41
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	41
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	41

3.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	42
3.2	BSA ve PAA Çözeltilerinin Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisinde İncelenmesi.....	43
3.3	pH 5,0'de PAA'nın dn/dc Değerinin Hesaplanması.....	43
3.4	BSA/PAA Karışımları	43
3.4.1	Kullanılan Çözeltiler.....	44
3.4.2	Karışımların Hazırlanışı	44
3.4.3	Hesaplamalar	44
3.5	BSA-PAA Karışımlarının Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisinde İncelenmesi.....	45
4.	DENEY SONUÇLARI.....	47
5.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	75
	KAYNAKLAR.....	81
	ÖZGEÇMİŞ.....	84

SİMGE LİSTESİ

g	gram
M	Molar
mg	miligram
mL	mililitre
M_w	ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
M_n	sayıca-ortalama molekül ağırlığı
M_z	z-ortalama molekül ağırlığı
R_h	hidrodinamik yarıçap
R_g	dönme yarıçapı
$[\eta]$	intrinsik viskozite
η	viskozite
IP	viskozimetre kapillerlerinin iç basınçları farkı
DP	viskozimetre giriş ve çıkış arasındaki basınç farkı
n	mol
nm	nanometre
μL	mikrolitre
Å	angström
cm	santimetre
μm	mikrometre
Da	Dalton
C	derişim
V	hacim
K_{RI}	RI detektörünün kalibrasyon sabiti
n_0	çözücünün kırılma indisi
V_{enj}	enjekte edilen hacim
ΔRI_{Alan}	RI kromatogramında pik alanlarındaki değişim
ΔC	konsantrasyondaki değişim
ϵ_p	molar absorbans

KISALTMA LİSTESİ

Ab	Antikor
Ag	Antijen
BSA	Bovin serum albumin
CH ₃ COOH	Asetik Asit
CMC	Karboksimetil selüloz
DNA	Deoksiribonükleik asit
GFC	Jel filtrasyon kromatografisi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LAC	Sıvı adsorbsiyon kromatografisi
LALLS	Dar açılı lazerli ışık saçılması
LS	Işık saçılması
M	Molekül kütlesi
M-H	Mark-Howink
MWD	Molekül kütlesi dağılımı
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaN ₃	Sodyum azid
PAA	Poliakrilik Asit
PE	Polielektrolit
PEG	Poli(etilen glikol)
PSSNa	Poli(sodyum stiren sülfonat)
PVEP	kuaternize poli-4-vinilpiridin
RALS	Dik açılı ışık saçılması
RI	Kırılma İndisi
RT	Alıkonma zamanı
RV	Alıkonma hacmi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet
VIS	Viskometri

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 SEC’de ayırma mekanizması (Lough ve Wainer, 1992).....	4
Şekil 2.2 Örnek bir SEC kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi (Lough ve Wainer, 1992).....	6
Şekil 2.3 BSA’nın çeşitli konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 83, 100 mg/mL) jel filtrasyon kromatogramları (Vijayalakshmi, 2002).....	8
Şekil 2.4Dekstranın epiklorhidrin ile çapraz bağlanması.....	9
Şekil 2.5 Akrilamid ve metilenbisakrilamidin formülleri.....	9
Şekil 2.6Çift hücreli sapma refraktometre şeması (Pasch ve Trathnigg, 1999).....	12
Şekil 2.7 Konsantrasyon ve RI ölçümü arasındaki doğrusal bağıntıyı gösteren bir şekil.....	13
Şekil 2.8 Çok kapillerli viskozimetre detektörü (köprü modeli).....	15
Şekil 2.9Işık saçılması detektörünün çalışma düzeneği.....	17
Şekil 2.10 Madde üzerine yollanan ışık madde tarafından her yöne eşit şiddette saçılması....	17
Şekil 2.11 Madde üzerine yollanan ışık madde tarafından her yöne farklı şiddette saçılması.....	17
Şekil 2.12 Polimerlerde molekül ağırlığı dağılımı [1].....	21
Şekil 2.13 Poli(vinilpiridinyum) halojenür ve sodyum poli(stiren sülfonat).....	23
Şekil 2.14 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve poli(akrilik asit) (PAA). PSS kuvvetli, PAA zayıf bir polianyondur [5].....	24
Şekil 2.15 İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin).....	24
Şekil 2.16 Çözeltiye elektrolit eklenmesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonuna geçmesi [6].....	25
Şekil 2.17 Simpleks oluşum yolları.....	28
Şekil 2.18 Nonstokiyometrik suda çözünebilen simplekslerin şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.19 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $nP/nPE \leq Ni$ oranında oluşan komplekslerin yapısı “a” ve “b” - “a” (I) ve “b” (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir (Mustafae, 1996).....	33
Şekil 2.20 BSA ve anti-BSA’nın UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).....	36
Şekil 2.21 BSA/anti-BSA kompleksinin (aşırı BSA eklendiğinde) UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).....	37
Şekil 2.22 BSA/anti/BSA kompleksinin (aşırı anti-BSA eklendiğinde) UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).....	37
Şekil 2.23 Molekül kütlesi hesabı yapılırken piklerin seçilen sınır değerleri (Kendrick vd., 2001).....	39
Şekil 4.1. Farklı pH’larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin (C=1 mg/mL) RI kromatogramları.....	47
Şekil 4.2. Farklı pH’larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin (C=1 mg/mL) RALS kromatogramları.....	47
Şekil 4.3. Farklı pH’larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin (C=1 mg/mL) VIS kromatogramları.....	48
Şekil 4.4. pH 7,0’de hazırlanmış BSA çözeltisinin (C=2,0 mg/mL) VIS, RI, UV ve RALS kromatogramları.....	48
Şekil 4.5. BSA-PAA karışımlarının farklı pH’lardaki orana bağlı optik densite (OD ₅₀₀) grafiği (Çimen, 2006).....	49
Şekil 4.6. Farklı pH’lardaki (A-pH 4 ve 4,3; B-pH 5, 6 ve 7) BSA-PAA karışımlarının matriks çözeltilerinin orana bağlı optik densite (OD ₂₈₀) grafikleri. (Çimen, 2006).....	50
Şekil 4.7. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	51

Şekil 4.8. pH 7’de RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	51
Şekil 4.9. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	52
Şekil 4.10. pH 7’de UV kromatogramlarındaki (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	52
Şekil 4.11. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	53
Şekil 4.12. pH 7’de RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	53
Şekil 4.13. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	54
Şekil 4.14. pH 7’de VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	54
Şekil 4.15. pH 6’da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	55
Şekil 4.16. pH 6’da RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	55
Şekil 4.17. pH 6’da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	56
Şekil 4.18. pH 6’da UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	56
Şekil 4.19. pH 6’da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	57
Şekil 4.20. pH 6’da RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	57
Şekil 4.21. pH 6’da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	58
Şekil 4.22. pH 6’da VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	58
Şekil 4.23. pH 5’te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	59
Şekil 4.24. pH 5’te RI kromatogramlarındaki PAA(pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	59
Şekil 4.25. pH 5’te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	60
Şekil 4.26. pH 5’te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	60
Şekil 4.27. pH 5’te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	61

Şekil 4.28. pH 5'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	61
Şekil 4.29. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	62
Şekil 4.30. pH 5'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	62
Şekil 4.31. (LS)(VIS)/(RI) ² değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} orana bağlı olarak değişimi.....	63
Şekil 4.32. PAA çözeltilerinden elde edilen RI kromatogramlarındaki pikin konsantrasyona göre değişimi.....	63
Şekil 4.33. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin M_w (○)ve M_n (□) değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.	65
Şekil 4.34. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin intrinsik viskozite değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.	65
Şekil 4.35. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin boyutlarının (hidrodinamik yarıçaplarının) n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.36. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin Mark-Houwink-Sakurada a üstelinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.	66
Şekil 4.37. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.38. pH 4,3'te RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.39. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	68
Şekil 4.40. pH 4,3'te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	68
Şekil 4.41. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	69
Şekil 4.42. pH 4,3'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	69
Şekil 4.43. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	70
Şekil 4.44. pH 4,3'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	70
Şekil 4.45. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	71
Şekil 4.46. pH 4'te RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	71
Şekil 4.47. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	72
Şekil 4.48. pH 4'te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	72
Şekil 4.49. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı	

değişimi.....	73
Şekil 4.50. pH 4'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	73
Şekil 4.51. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi.....	74
Şekil 4.52. pH 4'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi	74

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 SEC sisteminde kullanılan detektör çeşitleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).	11
Çizelge 2.2 Mark-Houwink-Sakurada eşitliğinde a sabitinin teorik değerleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).	22
Çizelge 2.3 GM3 kompleksinin I ve II numaralı fraksiyonlarının molekül kütlesi ve diğer parametrelerinin deneysel değerleri	40
Çizelge 4.1 pH 5'te PAA, BSA ve BSA-PAA komplekslerine ait dört detektörlü SEC ile elde edilmiş değerler.....	64

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile beni yönlendiren sayın danışmanım Prof. Dr. Huriye Kuzu'ya,

Engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın her yönde önünü açan, ileri laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bizlere sağlayan ve rehberlik eden Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafaev'e,

Bu tezin hazırlanmasındaki desteğinden dolayı Nermin Saliha Çimen'e,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca her türlü desteğinden dolayı sevgili aileme,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, sağlamış oldukları destekten dolayı TÜBİTAK – Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na sonsuz saygılarımı sunarım.

ÖZET

Suda çözünen ve çözünmeyen protein-polielektrolit kompleksleri fonksiyonel biyopolimer sistemleri olarak çeşitli alanlarda önemli uygulamaları bulunmaktadır ve polimer-protein bileşiklerinin spesifik bir sınıfını oluşturmaktadırlar. Polielektrolitlerin proteinlerle sulu çözeltilerdeki etkileşimi, pH ve iyonik şiddete duyarlıdır ve proteinlerin izoelektrik noktasına bağlıdır. Polimer-protein kompleksleri poliyon zincirleriyle protein molekülünün zıt yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak meydana gelmektedir.

Bu tez çalışmasında, bileşenlerin farklı oranlarında ($n_{BSA}/n_{PAA}=0,5-50$) ve farklı pH'larda (pH=4,0; 4,3; 5,0; 6,0; 7,0) bovin serum albuminin poliakrilik asit ile etkileşimi ve çözünür polikomplekslerin moleküler özellikleri dört detektörlü (UV, kırılma indisi, ışık saçılması ve viskometri) moleküler eleme kromatografisi kullanılarak incelenmiştir.

Nötral pH'larda polianyon ile protein arasında etkileşim gözlenmezken, proteinin izoelektrik noktasına yakın pH değerinde suda çözünür PAA-BSA kompleksleri oluşmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri dört detektörlü kromatografi sistemi kullanılarak incelenen bu komplekslerin belli bir oran aralığında molekül kütleleri ve boyutlarının bir maksimumdan geçtikten sonra sabit kaldığı gösterilmiştir. Proteinin izoelektrik noktasından daha düşük pH değerlerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşmuş, bu çözeltilerin santrifüj sonrası süpernatantları incelenmiştir. Bileşenlerin molar oranlarının çok küçük ve çok büyük değerlerinde suda çözünen kompleksler olduğu bulunmuş, suda çözünen ve çözünmeyen polikomplekslerin bir arada bulunduğu gösterilmiştir. Ön aşamada, çökmeden önce polielektrolit-protein kompleksleri arasında agregasyon olduğu belirtilmiştir.

Anahtar kelimeler: polielektrolit-protein kompleksleri, moleküler eleme kromatografisi, ışık saçılması, viskometri.

ABSTRACT

Water-soluble and insoluble protein-polyelectrolyte complexes as functional biopolymer systems represent a specific class of polymer-protein compounds that have important applications in various areas. The extent of the interaction of polyelectrolytes (PE) with proteins in aqueous solutions is found to be pH and ionic strength sensitive and dependent on the isoelectric points of proteins. Polymer-protein complexes form as a result of the electrostatic interaction of polyion chains with the oppositely charged groups of the protein molecule during these reactions.

In this study, we attempt to investigate the interaction of bovine serum albumin (BSA) with polyacrylic acid (PAA) and molecular properties of soluble polyelectrolyte complexes at different ratios of components ($n_{BSA}/n_{PAA}=0,5-50$) and pH of solutions (pH=4,0; 4,3; 5,0; 6,0; 7,0) using size-exclusion chromatography (SEC) with on-line quadruple detection system: UV absorption (UV), refractive index (RI), light scattering (LS) and viscosity (VIS) detectors.

While interaction between polyanion and protein is not observed at neutral pH values, stable water-soluble complexes form at pH values close to isoelectric point of BSA. Investigation of physicochemical behaviors of these soluble complexes by chromatography shows that molecular weight and size of polycomplex particles passes through a maximum molar ratio range. At pH values below the isoelectric point of protein, water-insoluble complexes form as a result of strong electrostatic attraction. After centrifugation, supernatants were analysed. At very low and high values of molar ratios, water-soluble polyanion-protein complexes form and it was showed that these soluble complexes coexist with water-insoluble complexes. At first step, aggregation occurs between polyelectrolyte-protein complexes before precipitation

Key words: polyelectrolyte-protein complexes, size exclusion chromatography, light scattering, viscometry.

1. GİRİŞ

Polielektrolitlerin proteinlerle sulu çözeltilerdeki etkileşimi, pH ve iyonik şiddete duyarlıdır ve proteinlerin izoelektrik noktasına bağlıdır (Kabanov vd., 1978). Polimer-protein kompleksleri poliyon zincirleriyle protein molekülünün zıt yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Morawetz ve Hughes, 1952). Polielektrolitin proteinlere bağlanma şekli bileşenlerin oranına bağlıdır ve sonuçta çözünür polikompleksler (Berdick ve Morawetz, 1953; Mustafaev vd., 1975), kompleks koaservatları (Sacco, 1988) yada amorf çökelek (Veis, 1991) oluşabilmektedir.

Suda çözünen ve çözünmeyen protein-polielektrolit komplekslerin, fonksiyonel biyopolimer sistemleri olarak çeşitli alanlarda önemli uygulamaları bulunmaktadır ve polimer-protein bileşiklerinin spesifik bir sınıfını oluşturmaktadırlar. Sentetik polielektrolitler, proteinleri kovalent bağlarla modifiye etmekte, antijenik proteinlerin bağışıklık sisteminde immunojenliğinin arttırılmasında (ya da azaltılmasında) (Bae vd., 1987; Petrov vd., 1992; Abouchowski vd., 1977) ve vücuttan atılma sürelerinin uzatılması (Abouchowski vd., 1977) için sıkça kullanılmaktadır. Bununla birlikte, viral antijenlerin polielektrolitlerle konjugatları güçlü koruyucu özellikler göstermektedir (Petrov vd., 1992) ve yeni nesil aşı bileşikleri olarak düşünülmektedir.

Anyonik polielektrolitlerle aynı yüklü proteinler arasında kompleks oluşumu çok sayıda çalışmaya konu olmuştur. Çözünür polimer-protein kompleksleri kolloid ve polimer kimyasında bilinen birçok metot kullanılarak incelenmiştir. Kimyasal bileşim, fizikokimyasal özellikler ve proteinlerin polianyonik komplekslerinin biyoetkinlikleri hakkında geniş bilgiye sahip olmakla birlikte kompleks oluşumu sırasında çözünen halden çözünmeyen hale faz geçişinin mekanizması ve sulu çözeltilerindeki yapıları tam olarak incelenmemiştir. Son zamanlarda, HPLC yöntemlerinin polimer-protein karışımlarına uygulanması kompleks oluşumu hakkında yeni bilgiler sunmaktadır (Mustafaev, 2004).

Moleküler eleme kromatografisi (size exclusion chromatography, SEC), polimerleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan bir HPLC yöntemidir. Moleküler eleme kromatografisiyle ayrılmış polimer molekülleri genelde kırılma indisi detektörü, spektrofotometrik detektörler ya da diğer derişim ölçen detektörlerce saptanmaktadır. SEC kullanımının ilk yıllarında molekül kütlesi ve viskozitesi bilinen polimer standartlarının alıkonma zamanları bulunup, $\log M$ ve $\log[\eta]M$ değerlerine karşılık gelen kalibrasyon eğrileri oluşturularak analiz edilen polimerlerin boyutları ve kütleleri hesaplanmaktaydı. Bu tekniğin yetersiz olduğu kısa sürede anlaşıldı ve polimerlerin viskozitesini ve ışık saçılmasını ölçen

detektörler kullanılmaya başlandı (Mourey, 2004).

Viskometri ve ışık saçılması detektörleri günümüzde rutin olarak kullanılmaktadır. Bu detektörlere “molekül kütlesi detektörleri” denmektedir, çünkü saptadıkları değerler doğrudan polimerlerin molekül kütlesi ile ilişkilidir. Genelde polimer derişimini ölçen bir veya daha çok detektörle birlikte kullanılmaktadırlar. Molekül kütlesi detektörlerine sahip SEC sistemi, diğer ışık saçılması ve viskometri cihazlarının yerine kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü modern HPLC cihazları doğru, tekrarlanabilir ve otomatik analiz imkanı sağlamakta, diğer cihazlarda polimer hakkında ortalama bilgi edinilirken SEC’te polimerlerin fraksiyonlarına ayrılması dağılım (boyut, kütle, vb.) hakkında bilgi vermekte, ayırma sırasında çözücü molekülü ve tuz uzaklaştırıldığı için sabit kimyasal potansiyelde ölçüm yapılmakta ve son olarak, bu detektörlerin yüksek hassasiyeti sayesinde SEC boyut dağılımının her noktasında polimer özellikleri hakkında veri elde edilmektedir (Mourey, 2004).

Molekül kütlesi detektörlerine sahip SEC sistemi kullanılarak protein-protein ve protein-ligand etkileşimleri, protein-polisakkarit kompleksleri, polimer-protein konjugatları ve bunların konjugasyon derecesi günümüze kadar incelenmiştir. Bu teknik, sentetik polielektrolitlerin proteinlerle komplekslerinin incelenmesinde az sayıda araştırmacı tarafından kullanılmıştır ve bu alanda yeni bir tekniktir.

Bu tez çalışmasında, bileşenlerin farklı oranlarında ($n_{BSA}/n_{PAA}=0,5-50$) ve farklı pH’larda (pH=4,0; 4,3; 5,0; 6,0; 7,0) bovin serum albuminin poliakrilik asit ile etkileşimi ve çözünür polikomplekslerin moleküler özellikleri dört detektörlü (UV, kırılma indisi, ışık saçılması ve viskometri) moleküler eleme kromatografisi kullanılarak incelenmiştir.

Nötral pH’larda polianyon ile protein arasında etkileşim gözlenmezken, proteinin izoelektrik noktasına yakın pH değerinde suda çözünür PAA-BSA kompleksleri oluşmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri dört detektörlü kromatografi sistemi kullanılarak incelenen bu komplekslerin belli bir oran aralığında molekül kütleleri ve boyutlarının bir maksimumdan geçtikten sonra sabit kaldığı gösterilmiştir. Proteinin izoelektrik noktasından daha düşük pH değerlerinde suda çözünmeyen kompleksler oluşmuş, bu çözeltilerin santrifüj sonrası süpernatantları incelenmiştir. Bileşenlerin molar oranlarının çok küçük ve çok büyük değerlerinde suda çözünen kompleksler olduğu bulunmuş, suda çözünen ve çözünmeyen polikomplekslerin bir arada bulunduğu gösterilmiştir. Ön aşamada, çökmeden önce polielektrolit-protein kompleksleri arasında agregasyon olduğu belirtilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Moleküler Eleme Kromatografisi

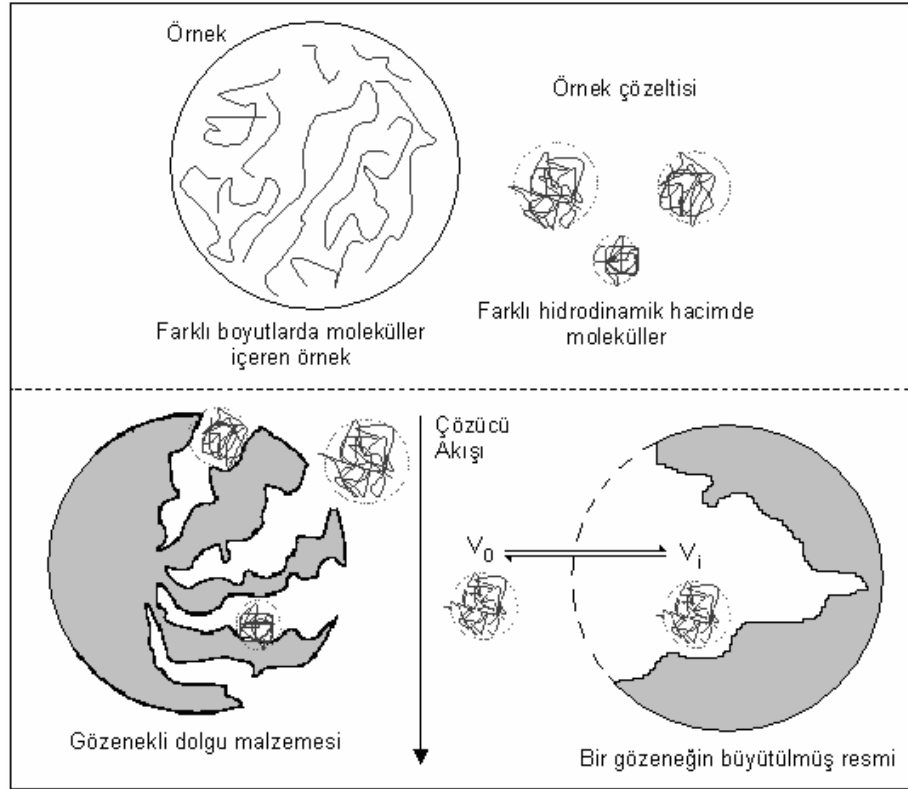
Moleküler eleme kromatografisi (jel filtrasyon, jel geçirgenlik ve sterik eleme kromatografisi) dolgu malzemesinin ortalama gözenek çapına bağlı olarak makromoleküllerin hidrodinamik çaplarına göre entropik olarak kontrol edilen bir ayırma işlemidir. Bu teknikle ayırma işlemi ilk olarak Lathve ve Ruthven tarafından tanımlandı. İlerleyen yıllarda farklı araştırmacılar tarafından çeşitli alanlarda değişik amaçlarla kullanıldı. SEC hem sentetik polimerler hem de biyopolimerler için doğru ve güvenilir bir yöntem haline gelmiştir (Vijayalakshmi, 2002).

Moleküler eleme kromatografisi kullanılan hareketli ve sabit fazlara göre ikiye ayrılır:

- a) Jel geçirgenlik kromatografisi (gel permeation chromatography, GPC): Apolar türlerin ayrılmasında kullanılır. Apolar sabit faz, apolar hareketli faz kullanılır. Bu teknik genelde polimer karakterizasyonu için polimer kimyası alanında kullanılmaktadır.
- b) Jel filtrasyon kromatografisi (gel filtration chromatography, GFC): Polar türlerin ayrılmasında kullanılır. Polar sabit faz, polar hareketli faz kullanılır. GFC tekniği protein ve (veya) peptid karışımlarının saflaştırılması ve tanımlanması için kullanılmaktadır. Üç uygulama alanı vardır: Analitik amaçlı (molekül kütlesi bulunması, vd.), fraksiyonlara ayırma ve tuzdan ayırma.

2.1.1 Ayırma Prensibi

İdeal SEC’de ayırma işlemi, makromoleküllerin hidrodinamik hacimleri ve şekilleri ile sabit fazın gözenek büyüklüğü ve şekline bağlı olarak gerçekleşmektedir. Moleküller dolgu malzemesinin dışında kalan hacimle gözeneklerin içindeki hacimler arasında dağılırlar. Ayırma sırasında belirli bir anda her bir molekül türünün belli bir kısmı gözeneklerin içinde bulunur. Molekül ne kadar ufaksa gözenek içinde o kadar çok molekül bulunur (büyük moleküllerin tamamı gözeneklerin dışındadır). Büyük moleküller sterik engellemeden dolayı gözeneklere giremezken ufak moleküllerin önemli bir kısmı gözeneklere girer. Ufak moleküller gözeneklerin içinde daha uzun süre bulunurlar. Sabit faz partiküllerinin dışında kalan büyük moleküller hareketli fazla birlikte hareket eder. Bu sebeple büyük moleküller ufaklardan daha önce kolondan çıkar (Şekil 2.1) (Vijayalakshmi, 2002).



Şekil 2.1 SEC’de ayırma mekanizması (Lough ve Wainer, 1992).

Seçicilik terimi ayırma derecesini ya da bir numune içindeki farklı moleküller arasındaki alıkonma zamanını tanımlayan bir terimdir. SEC dolgu malzemesinin daha yüksek seçiciliği, çözünenin şekil ve boyutunu ya da dolgu malzemesinin gözeneklerinin boyut ve şeklini değiştirmedikçe çözücüü değiştirerek elde edilemez. Çözünen moleküllerin alıkonma hacimleriyle (ya da alıkonma hacmiyle ilgili bir fonksiyonla) boyutları arasında çizilen bir grafik kolonun seçiciliğini gösterecektir.

Numunenin hiçbir fraksiyonu kolon dolgu partikülleri arasında kalan hacimden (V_0) daha önce kolondan çıkamaz. Bu alıkonma hacmi kolonun ayırma sınırını göstermektedir. Gözeneklerin en iç noktasına kadar girebilen ufak moleküller V_0 ile gözenek hacimlerinin toplamına eşit bir alıkonma hacminde (V_i) kolonu terk edeceklerdir. Bu iki sınır arasında kalan aralıktaki değerlerde boyutları olan moleküller V_e alıkonma hacminde kolondan elüe edileceklerdir (Şekil 2.2):

$$V_e = V_0 + K_{SEC} V_i \quad (2.1)$$

Bu denklemde K_{SEC} numunenin ayırma sırasındaki denge sabitini göstermektedir. K_{SEC} makromoleküllerin gözenekler içinde olma ihtimalini veya mobil fazdakine göre gözenek içindeki madde derişimini vermektedir. Casassa tarafından geliştirilen teoriye göre; 2d çaplı

yarığa benzer bir gözenekte R_g yarıçaplı esnek zincirli bir makromolekölün dağılım katsayısı, gözenek ve makromoleküllerin boyutlarının oranına bağlıdır:

$$K_{SEC} = 1 - \frac{2}{\sqrt{6\pi}} \frac{R}{d} \quad (2.2)$$

Bir kromatografik ayırmanın denge sabiti termodinamik parametrelerle ilişkilendirilebilir. Sabit sıcaklıktaki bir ayırmanın arkasındaki itici güç Gibbs serbest enerjisindeki değişimdir (ΔG):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (2.3)$$

Sadece entropiyle yönetilen ideal SEC’de ΔH sıfıra eşit olmalıdır ve denge sabiti:

$$K_{SEC} = e^{\Delta S/R} \quad (2.4)$$

şeklinde olmalıdır. $0 < K_{SEC} < 1$ değerleri arasında olabilen, $K_{SEC} = 0$ olduğunda en büyük gözenekten daha büyük moleküller için, $K_{SEC} = 1$ olduğunda gözeneklerin en iç noktasına kadar difüz edebilen moleküller için kullanılmaktadır.

İdeal SEC’de alıkonma hacmi $V_e = V_0 + V_i$ ’yi geçemez. Bunun tersi LAC’de (sıvı adsorpsiyon kromatografisi) geçerlidir, sabit fazla moleküller arasında etkileşimler gerçekleşir. Ayırma sırasında moleküler eleme olmadığı varsayılırsa (gözeneksiz sabit faz, çok ufak moleküller ve çok büyük gözenekler var olması durumunda), şu formül yazılabilir:

$$V_e = V_0 + V_i K_{LAC} \quad (2.5)$$

LAC sisteminin dağılım katsayısı entalpiyle bulunur:

$$K_{LAC} = e^{-\Delta H/RT} \quad (2.6)$$

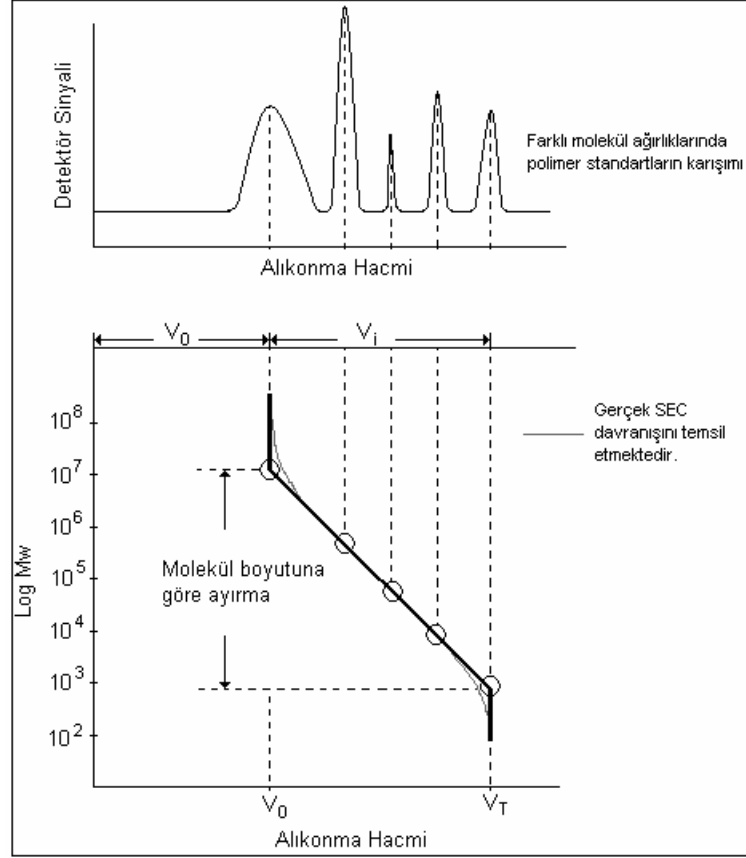
Adsorbe olabilecek grupların artmasıyla ΔH artarken, polimerizasyon derecesine bağlı olarak K_{LAC} üstel olarak artar. Sonuç olarak, alıkonma hacmi V_0 hacmini aşar.

Pratikte, hem moleküler eleme hem de etkileşimler gerçekleşmektedir. K denge sabiti denklemde görüldüğü üzere hem ideal moleküler eleme hem de adsorbsiyonun katkısıyla oluşur:

$$V_e = V_0 + V_i K_{SEC} K_{LAC} \quad (2.7)$$

Adsorpsiyon ya da partisionun olmadığı durumlarda bile ideal moleküler eleme gerçekleşmez. Bunun sebebi ikincil moleküler eleme etkisidir. Bu etki polar grupların

elektrostatik itmesinden doğmaktadır. Elektrolit eklenmesiyle oluşan hidrojen bağları kırılarak bu etki ortadan kaldırılabilir (Trathnigg, 2000).



Şekil 2.2 Örnek bir SEC kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi (Lough ve Wainer, 1992).

2.1.2 Ayırmayı Etkileyen Faktörler

Ayırmayı etkileyen faktörleri şu başlıklar altında toplayabiliriz:

- Gözenek Hacmi
- Partikül Boyutu
- Destek Malzemesi
- Çözücü
- Etkileşimler
- Kolon Uzunluğu
- Akış Hızı
- Örnek Hacmi
- Örnek Derişimi

2.1.3 Etkileşimler

Her dolgu malzemesinde bazı etkileşimler meydana gelebilir. Uygun mobil faz seçilerek bu etkileşimler en aza indirilebilir. İki ana adsorbsiyon gerçekleşmektedir: hidrofobik ve iyonik (elektrostatik) etkileşimler. Silika esaslı dolgu malzemeleri eksi yüklü yüzeye sahip oldukları için pozitif yüklü moleküllerle etkileşebilirler. Bu etkileşimleri en aza indirmek için çözücünün iyonik şiddeti artırılır ya da tuz ilavesi yapılır. Çoğu dolgu malzemesinde yüksek iyonik şiddetlerde hidrofobik etkileşimler gerçekleşmektedir. İzopropanol, etilen glikol, CMC ya da deterjan ilavesiyle hidrofobik etkileşimler azaltılabilir (Vijayalakshmi, 2002) .

2.1.4 Moleküler Eleme Kromatografisinin Önemli Bileşenleri

2.1.4.1 Mobil Faz

SEC’te mobil fazın amacı sadece örneği çözmektir ve mobil faz şu özelliklere sahip olmalıdır:

- 1) Örneğin optimum çözünürlüğünü sağlamalı,
- 2) Örneğin üç boyutlu yapısını, varsa biyolojik etkinliğini etkilememeli,
- 3) Kolon dolgu malzemesiyle uyumlu olmalı,
- 4) Viskozitesi düşük olmalı,
- 5) Örneğin saptanmasına izin vermeli.

Organik fazlı SEC’te tetrahidrofuran, toluen, kloroform ve diklorometan kullanılır. Sulu SEC’te ise su veya tampon sistemleri kullanılmaktadır (Lough ve Wainer, 1992).

2.1.4.2 Pompa Sistemi

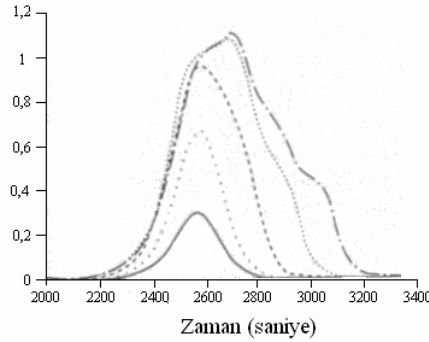
Mobil fazın akış hızının doğruluğu, özellikle molekül ağırlığı tayini yapılırken, SEC için çok önemlidir. Bunun doğruluğu pompa sistemiyle sağlanmaktadır.

Akış hızı, makromoleküllerin difüzyon katsayısı ufak olduğu için belli değerler arasında olmalıdır. Molekül büyüdükçe gözeneklerin içine daha yavaş difüz etmektedir. Bu yavaş difüzyon piklerin genişlemesine sebep olmaktadır. Büyük moleküller akış hızından daha çok etkilenmektedirler. Genelde 1,0–2,0 mL/dak.’lık akış hızı kullanılmaktadır (Lough ve Wainer, 1992).

2.1.4.3 Enjeksiyon

Diğer kromatografi türlerine göre SEC’te daha az hacimde örnek kolona enjekte edilir. Örnek hacmi, toplam kolon hacminin %0,5’inden daha fazla olmamalıdır. Hacim arttıkça piklerin çözünürlüğü azalmaktadır. Genelde, detektör cevabını arttırmak için, yaklaşık 100 μ L hacimde enjeksiyon yapılmaktadır.

Enjekte edilen polimerin derişimi çok yüksek olmamalıdır. Çünkü yüksek konsantrasyonlarda polimer çözeltilerinin viskozitesi artmaktadır. Bu da örneğin hazırlanmasında, enjeksiyonunda ve alınan sonuçlarda sorunlara sebep olacaktır. Yapılan çalışmalarda, örnek derişimi arttıkça piklerin çözünürlüğünün azaldığı gözlenmiştir. Yüksek viskozite değerlerinde (yüksek derişim) akış düzeni bozulmaktadır. Yüksek örnek konsantrasyonundan dolayı oluşan bu düzensiz akışa “viscous fingering” adı verilmektedir (Şekil 2.3). Genel bir kural olarak, örneğin viskozitesi mobil fazın viskozitesinin %50’sinden daha fazla olamaz. Örneğin derişimi, maddenin molekül ağırlığına bağlı olarak genelde 2-5 mg/mL arasında değişmektedir (Vijayalakshmi, 2002).



Şekil 2.3 BSA’nın çeşitli konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 83, 100 mg/mL) jel filtrasyon kromatogramları (Vijayalakshmi, 2002).

2.1.4.4 Dolgu Malzemeleri ve Kolonlar

SEC sisteminin kalbi, kullanılan dolgu malzemeleri ve kolon(lar)dur. Organik veya susuz mobil fazların kullanıldığı sistemlerde polistiren/divinilbenzen jelleri dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu malzeme yüksek oranda çapraz bağlar içermektedir ve gözenekli, küresel bir yapıya sahiptir. Divinilbenzen çapraz bağlanmayı sağlamaktadır. Silika esaslı SEC dolgularına göre daha avantajlıdır. Çünkü daha fazla sayıda farklı çözücüyle uyumludur. 50-10⁶ Å arasında çok geniş bir aralıkta istenen boyutta gözenekliliği elde etmek kolaydır. 3, 5 ve 10 μ m’lik partiküller üretilmektedir (Lough ve Wainer, 1992).

Agaroz da dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Agaroz D-galaktoz ve 3,6-anhidro-L-galaktozu içeren lineer bir polisakkariddir. Küresel yapıdaki agaroz moleküler eleme kromatografisi uygundur ve ticari adı da Sepharose'dur. Agaroz jellerinin gözenek büyüklükleri jel derişimi değiştirilerek ayarlanabilir. Gözenekleri genelde büyüktür ve büyük proteinlerle agregatlarını ayırmada kullanılmaktadır.

Kompozit dolgu malzemeleri ise iskeleti oluşturan polimer jelle, ayırma aralığını belirleyen lineer yapılı diğer bir polimerin bileşimiyle oluşmaktadırlar (Vijayalakshmi, 2002).

Kullanılan dolgu malzemelerinin genel olarak şu özelliklere sahip olması gerekmektedir:

- 1) Basınca dayanıklı,
- 2) Yüksek gözenek hacmi,
- 3) Nötrallik,
- 4) Hidrofillik,
- 5) Geniş pH aralığına ve farklı mobil fazlara dayanıklılık.

Dolgu malzemesinin toplam gözenek hacmi ayırmayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Çünkü ayırma işlemi bu gözeneklerde gerçekleşmektedir. SEC’de seçicilik dolgu maddesinin gözeneklerinin boyut dağılımının bir fonksiyonudur. En yüksek seçicilik tek gözenek boyutu olan ya da dar boyut dağılımına sahip dolgu maddelerinde bulunur. Yüksek seçicilik, dar ayırma aralığıyla sağlanır. Polimerlerin ayrılması sırasında etkili ayırma aralığının genişletilmesi için farklı boyutlarda gözenekleri içeren karma kolonlar kullanılmaktadır. En etkili dolgu malzemesiyle çalışılsa bile, benzer molekül ağırlıklarına sahip küresel proteinlerin ayrılması zordur. Bununla birlikte, molekül kütlesi X olan bir proteinle molekül kütlesi $2X$ olan diğer bir protein birbirinden ayrılabilir. Lineer moleküllerde de %20’lik bir fark ayırma için yeterli olabilmektedir (Vijayalakshmi, 2002).

SEC’de kolon etkinliği ya da teorik plato sayısı adsorbsiyon kromatografisinden daha önemlidir, çünkü ayırma işlemi izokratik olarak gerçekleştirilmektedir. 5-10 μm boyutlu partiküllerle en yüksek etkinlik sağlanır (en dar, en keskin pikler). Bu partiküllerin tek dezavantajı kolon basıncının yüksek olmasıdır.

Ayırma kalitesi kolon uzunluğunun kareköküyle orantılı olduğu için bu parametre oldukça önemlidir. HPLC kolonları genelde 20-40 cm uzunluğundadır, çünkü 5-10 μm ’lik partiküllere sahiptir. Kolon uzunluğu ayırmaya etki etse de çok uzun kolonlarda basınç yüksek olacak ve kolondan moleküllerin çıkması uzun bir süre alacaktır (Vijayalakshmi, 2002).

2.1.5 Detektörler

Ayrılan polimer molekülleri kolonu terk ederken, bir veya daha fazla detektör tarafından saptanmaları gerekmektedir. Polimerlerin SEC ile analizinde, sınırlı sayıda HPLC detektörü kullanılabilir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 SEC sisteminde kullanılan detektör çeşitleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).

Konsantrasyon Detektörleri		Molekül Kütlesi Detektörleri
<i>Seçici Detektörler</i>	<i>Genel Amaçlı Detektörler</i>	Tek kapilerli viskometre Diferansiyel viskometre Işık saçılması detektörleri LALLS MALLS TALLS RALLS MALLS ³
UV detektörü	RI detektörü	
IR detektörü	İletkenlik detektörü	
Floresans detektörü	Yoğunluk detektörü	
Elektrokimyasal det.	Evaporatif ışık saçılması det.	

2.1.5.1 Konsantrasyon Detektörleri

Konsantrasyon detektörlerinden alınan sinyal mobil fazda bulunan çözünmüş maddenin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu detektörleri seçici (çözünen maddenin bir özelliğini ölçen) detektörler ve genel amaçlı (mobil fazın bir özelliğini ölçen) detektörler olarak Çizelge 2.1'deki gibi ikiye ayırabiliriz.

2.1.5.2 UV Detektörü

En çok bilinen detektörlerden biridir. Birçok çeşidi bulunmaktadır ve çoğu HPLC üreticisinden edinilebilir. Bu detektör, seçili dalga boyunda polimerin absorpsiyonunu ölçmektedir ve kromofor grupları olan polimerlere uygulanmaktadır. Üç tip UV detektörü bulunmaktadır (Pasch ve Trathnigg, 1999):

- Sabit dalga boylu detektörler
- Değişken dalga boylu detektörler
- Diyot dizisi detektörleri

Bu detektör bir UV-Görünür bölge spektrofotometresi gibi çalışmaktadır. Lambadan çıkan ışın filtre, slit, ve aynadan geçerek kırınım ağına yansıtılmaktadır. Kırınım ağı ışının istenen dalga boyuna ayarlanmasını sağlar. Belli dalga boyundaki ışın yarı saydam aynaya yansıtılır ve burada eşit şiddette iki ışına ayrılır. Bir ışın referans detektörüne gönderilir. Diğer ışın içinden hareketli fazın geçtiği akışkan hücreye gönderilir. Akışkan hücreden geçen ışın detektöre gelir ve burada ölçüm yapılır. Akışkan hücreden sadece hareketli faz geçtiğinde hiç absorbands olmayacağı için detektörden sinyal alınmaz ama hücreden analiz edilmiş moleküller geçerken absorbands yaptıkları için detektörden sinyal alınır. Oluşan sinyal

aşağıdaki formüldeki değerlere bağlıdır:

$$V = k.(dA/dc).C \quad (2.8)$$

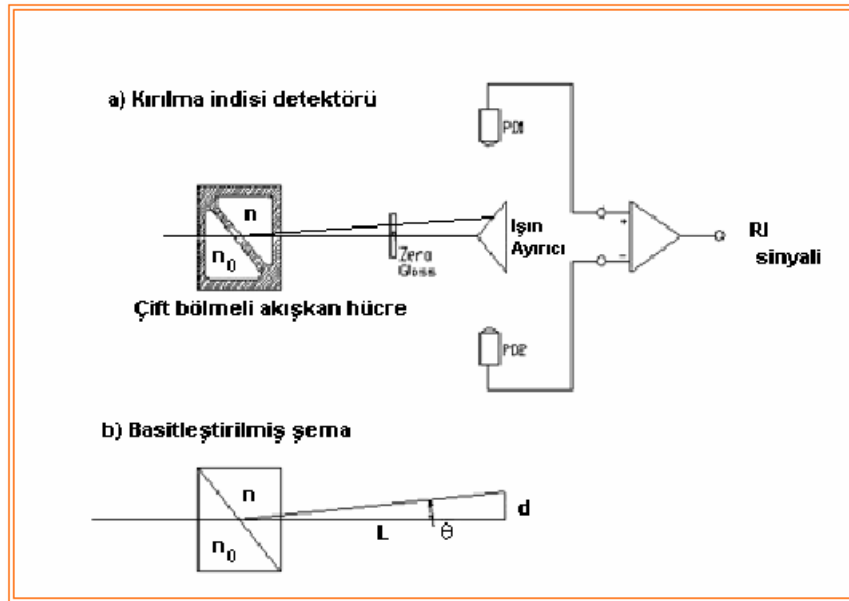
Detektörden elde edilen cevap o anda akışkan hücreden geçen maddenin konsantrasyonuna, C ve o maddenin dA/dc değerine bağlıdır. dA/dc her madde için farklı bir değerdir. k ise kalibrasyon sabitidir.

2.1.5.3 Kırılma İndisi (Refraktif İndeks, RI) Detektörü

Genel amaçlı detektörler içinde en bilinen detektör RI detektörüdür ve üç çeşidi bulunmaktadır (Pasch ve Trathnigg, 1999):

- Frensel refraktometre
- Sapma esaslı refraktometre
- İnterferometrik refraktometre

Sapma esaslı refraktometre Frensel refraktometresinden daha geniş bir ölçüm aralığı vardır. İnterferometrik refraktometreler ise diğer ikisinden daha hassastır.



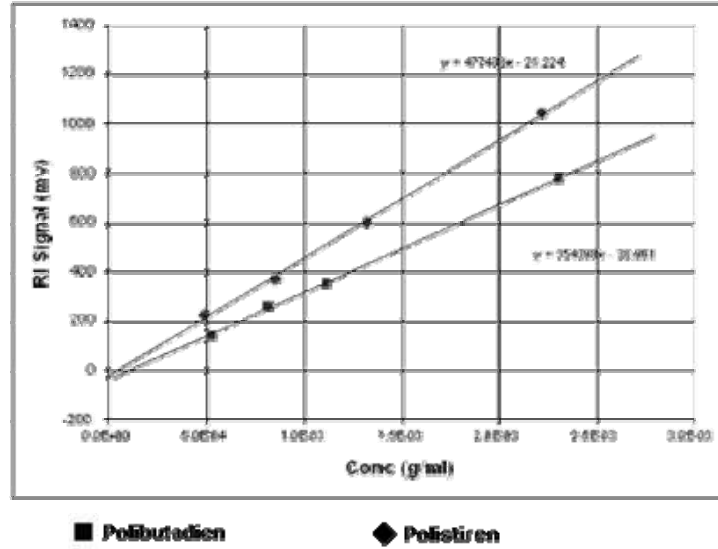
Şekil 2.6 Çift hücreli sapma refraktometre şeması (Pasch ve Trathnigg, 1999).

Çift hücreli sapma esaslı RI detektöründe hücrenin bölmelerinden birinde kırılma indisi n_0 olan referans çözücü bulunmaktadır ve ölçüm boyunca daima sabit kalmaktadır (Şekil 2.6). Diğer bölmede ise kırılma indisi n olan örnek çözeltisi bulunmaktadır. Işık Snell Kanunu'na uygun olarak kırılma indisleri farklı olan bu iki sıvının ara yüzeyinde kırılacaktır. Aslında

hücre içindeki cam-sıvı ve cam-hava ara yüzeylerinde de kırılma olmaktadır ama bu şekilde hesap karmaşıklaşmaktadır. Bunun yerine sadece sıvılar arasındaki kırılmayı kullanan basit bir hesaptan yararlanılmaktadır. RI detektöründe kullanılan temel formül şudur:

$$V = k.(dn/dc).C \quad (2.9)$$

Formülden görüldüğü üzere detektörden alınan sinyal ve madde konsantrasyonu arasında doğrusal bir bağıntı bulunmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Konsantrasyon ve RI ölçümü arasındaki doğrusal bağıntıyı gösteren bir şekil.

Kırılma indisi konsantrasyondan başka dn/dC değerine de bağlıdır. Bu değer kırılma indisinin konsantrasyona göre değişimini göstermektedir:

$$dn/dc = (n - n_0)/C \quad (2.10)$$

Hücrenin her iki tarafında da kırılma indisleri benzer sıvılar bulunduğunda ışın kırılması gözlenmeyecektir ve detektörden sinyal alınmayacaktır. Kromatografi işlemi sırasında hücreden çözücü geçerken kırılma olmayacak ve sinyal oluşmayacaktır. Sonuçta kromatogramın zemin çizgisini oluşacaktır. Maddemizin bulunduğu kısım hücreden geçerken konsantrasyona bağlı olarak sinyal oluşacak ve bir pik meydana gelecektir.

2.1.5.4 Molekül Kütlesi Detektörleri

Molekül kütlesi ölçen detektörler SEC'de kullanmak için çok faydalıdır, çünkü polimer pikinin her fraksiyonunun molekül kütlesini vermektedir. Bu detektörlerin oluşturduğu sinyal hem molekül kütlesine hem de konsantrasyona bağlı olduğu için konsantrasyon detektörleri

ile kullanılmaları gerekmektedir. Viskozite ve ışık saçılması detektörleri polimer hakkında farklı veriler ürettikleri için beraber kullanılmaları örnek hakkında daha fazla bilgi vermektedir. Işık saçılması detektöründen molekül kütlesi dağılımı elde edilebilir. Birden daha çok açıdan ölçüm yapılarak, molekül boyutu (R_g) bulunabilir. Viskozite detektörlü SEC sisteminden intrinsik viskozite dağılımı bulunabilir. Yalnız bu durumda, molekül kütlesi dolaylı yoldan bulunur ve bazı hatalara sebep olur. Bu sebeple, ışık saçılması ve viskozite detektörlerinin bir arada kullanılmasıyla daha doğru sonuçlar elde edilebilir (Mourey, 2004).

2.1.5.5 Viskozite Detektörü

Bir cismin akışını yavaşlatan genel bir özellik olup moleküllerin hareketleri sırasında uğradıkları dirençten ileri gelir. Gazların viskozitesi çok az, katılarınki çok fazla ve sıvılarınki ise sıvının cinsine ve özelliğine bağlı olarak geniş sınırlar arasında değişir.

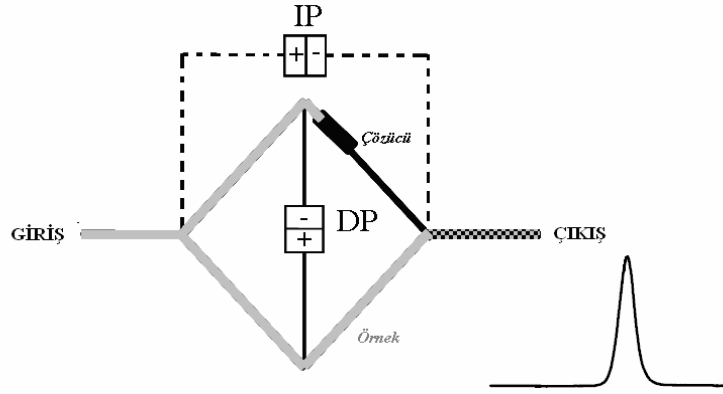
Viskozite detektörleri Q akış hızında l uzunluğunda ve r yarıçapındaki kapilerde ilerleyen çözeltideki basınç değişimini, ΔP ölçerler. Basınç değişimi çözeltinin viskozitesi ile ilişkilendirilir:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8lQ} \quad (2.11)$$

SEC detektörü olarak kullanılan ilk viskometre tek kapilerli olarak tasarlanmıştı. Tek kapilerli cihazlar akış hızındaki değişimlere çok hassas olduğundan çok kapilerli detektörler geliştirildi. Çok kapilerli detektörler hem polimer çözeltisini hem de saf çözücüyü aynı anda ölçmektedirler. Ölçüm yapılan her noktada spesifik viskozite hesaplanmaktadır:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_i - \eta_0}{\eta_0} \quad (2.12)$$

η_0 çözücünün viskozitesini göstermektedir. Köprü modelli viskozimetrelerde polimer çözeltisinin ilerlediği kapiler sistemiyle saf çözücünün ilerlediği ikinci kapiler sistemi arasındaki basınç farkı ölçülür (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Çok kapillerli viskozimetre detektörü (köprü modeli)

Ölçüm sırasında spesifik viskozite şu formülle bulunur:

$$\eta_{sp} = \frac{4DP}{IP - 2DP} \quad (2.13)$$

Spesifik viskozite birimsizdir ve her bir ölçüm noktasında RI detektörü tarafından ölçülen konsantrasyonla eşleştirilerek indirgenmiş viskozite bulunur:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \eta_{ind} \quad (2.14)$$

Her ölçüm noktasındaki intrinsik viskozite o noktadaki indirgenmiş viskozitenin sıfır konsantrasyonundaki limit değeridir:

$$\lim_{C \rightarrow 0} \eta_{ind} = [\eta] \quad (2.15)$$

İndirgenmiş ve intrinsik viskozitelerin birimi konsantrasyon biriminin tersidir ve genelde dL/g veya cm³/g cinsindendir. SEC’de örnek konsantrasyonları çok düşüktür ve intrinsik viskozitenin indirgenmiş viskoziteye eşit olduğunu varsaymak mümkündür. Konsantrasyon detektörü ile birlikte kullanılan viskozimetre detektörü doğrudan intrinsik viskozite dağılımını vermektedir (Mourey, 2004).

Yukarıda anlatılanlar göz önünde tutulduğunda viskozimetre detektöründen alınan sonucun Eşitlik 2.16’daki değerlere bağlı olduğunu söyleyebiliriz:

$$V = K_{VIS} \cdot [\eta] \cdot C \Rightarrow C \cdot [\eta] = \eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{4DP}{IP - 2DP} \quad (2.16)$$

2.1.5.6 Işık Saçılması Detektörü (RALS)

Işık saçılması, çözeltideki polimerlerin ağırlık ortalamalı molekül ağırlıklarının saptanması için kullanılan bir tekniktir. Işık molekülle etkileştiğinde, molekülde gelen ışıkla aynı fazda salınım yapmasından dolayı geçici bir dipol moment oluşur. Aslında, molekül bir anten görevi görür ve ışığı her yönde tekrar saçar. Bu ışık saçılması, Rayleigh saçılmasıdır ve gelen ışıkla aynı dalga boyunda ışık saçılır.

Termal dalgalanmadan dolayı, polimer çözeltisinden daha az olmakla beraber saf çözücü de ışığı yansıtır. Polimerin boyutu ve molekül ağırlığı hakkındaki bilgi, çözücünün oluşturduğu ışık saçılması dışında kalan aşırı ışık saçılması şiddetinden elde edilir. Çözeltideki polimerlerin yol açtığı ışık saçılması şiddeti doğrudan polimerin molekül ağırlığına ve çözeltideki konsantrasyonuna bağlıdır:

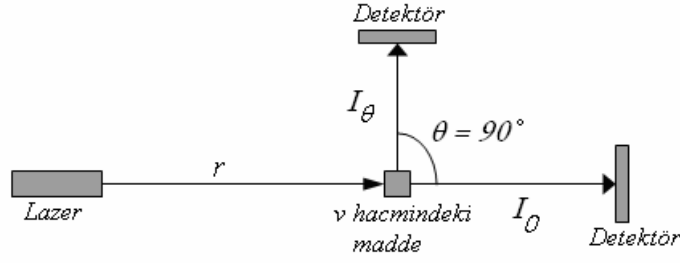
$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2C + \dots \Rightarrow \frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} \quad (2.17)$$

Bu denklemde C konsantrasyonu, M_w ağırlık ortalamalı molekül ağırlığını, A_2 de ikinci viryal sabiti temsil etmektedir. İkinci viryal sabit polimer molekülü ile çözücü arasındaki etkileşimin kuvvetini göstermektedir ve SEC çalışmalarında konsantrasyon çok düşük olduğu için $2A_2C$ terimi ihmal edilmektedir. $P(\theta)$ ise parçacığın saçılma fonksiyonudur (Kratochvil, 1987). $P(\theta)$, gelen ışığın şiddetine bağlı olarak, polimer moleküllerinin geometri ve boyutlarının bir fonksiyonudur. Eşitlikteki K terimi, optik bir sabittir:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2.18)$$

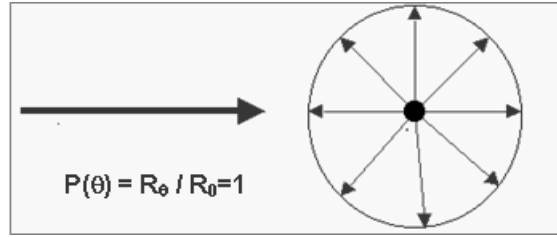
Burada n terimi ortamın kırılma indisini, λ_0 gelen ışının dalga boyunu, N_A Avogadro sayısını ve dn/dc ise kırılma indisinin değişimini göstermektedir.

Madde üzerine yollanan ışın madde tarafından her yöne saçılır. Saçılan ışık 0° haricinde çeşitli açılarda ölçülebilir. Çünkü bu açıda saçılan ışık ve madde üzerine gönderilen ışın birbirine karışacaktır. Ölçüm yapılan açılardan biri de 90° dir. Ölçümün 0° den farklı bir açıda yapılmasından dolayı R_θ terimi ortaya çıkmaktadır. R_θ , çözeltinin birim hacmi başına saçılan ışığın şiddetinin çözelteye yollanan ışığın şiddetine oranıdır (Şekil 2.9).



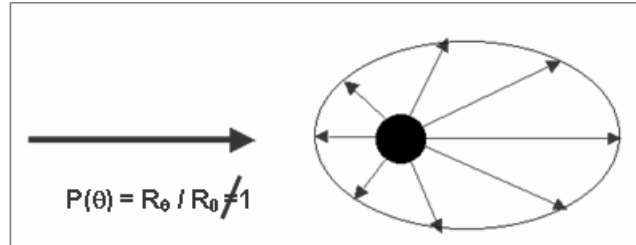
Şekil 2.9 Işık saçılması detektörünün çalışma düzeneği.

Molekül boyutu çözeltiye gönderilen ışığın dalga boyunun 1/20'sinden daha ufaksa $P(\theta)$ fonksiyonunun değeri 1'e yaklaşır. Bu durumda saçılan ışığın şiddeti, molekül boyutunu ölçmekte kullanılamaz, sadece molekül ağırlığının bir fonksiyonu haline gelir. $P(\theta)$ değeri 1'e yaklaştıkça, ışık saçılması sadece molekül ağırlığı ölçümü yapar.



Şekil 2.10 Madde üzerine yollanan ışık madde tarafından her yöne eşit şiddette saçılması

Saçılma yapan moleküllerin boyutları madde üzerine yollanan ışığın dalga boyundan çok ufaksa, molekül noktasal bir ışık kaynağı gibi davranacaktır. Bu durumda örneğimiz simetrik olarak ışık saçacaktır ve $P(\theta)$ değeri 1 olacaktır. Işık saçılması gösteren büyük moleküllerde ise $P(\theta)$ 1'den farklı çıkacaktır. Çünkü madde her yönde farklı şiddetlerde ışık saçacaktır.



Şekil 2.11 Madde üzerine yollanan ışık madde tarafından her yöne farklı şiddette saçılması

Sonuç olarak, $P(\theta)$ değerinin bulunması için önce 90° deki R_θ ölçülür ve viskozite detektöründen elde edilen veriler kullanılarak $P(\theta)$ hesaplanır. Doğru $P(\theta)$ değerini bulunması için aşağıdaki işlem akışı cihaz tarafından gerçekleştirilir. Arka arkaya üç kere aynı $P(\theta)$ elde

edilene kadar işlemler tekrarlanır ve doğru molekül ağırlığı bulunur:

$$\begin{array}{c}
 [\eta] = KM^a \longrightarrow \varepsilon = \frac{2a-1}{3} \\
 \swarrow \quad \searrow \\
 \frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2C + \dots \quad [\eta] = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \phi = 2,55 \times 10^{21} (1 - 2,63\varepsilon + 2,86\varepsilon^2) \\
 \searrow \quad \downarrow \quad \swarrow \\
 R_g = \left(\frac{1}{6}\right)^{1/2} \left(\frac{[\eta]M}{\phi}\right)^{1/3} \\
 \uparrow \quad \searrow \\
 P(\theta) = \frac{2}{X^2} [e^{-X} - (1-X)] \quad \longleftarrow X = \frac{8}{3} \left[R_g \frac{\pi m_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\phi}{2}\right) \right]^2
 \end{array} \quad (2.19)$$

2.1.6 Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisi Kullanılarak Elde Edilen Veriler

Viskozite, ışık saçılması, UV ve kırılma indisi detektörlerini içeren moleküler eleme kromatografi sisteminden elde edilecek veriler şu şekilde sıralayabiliriz:

- Molekül kütlesi: Molekül kütlesi değerleri ışık saçılması ve konsantrasyon detektörleri kullanılarak hesaplanmaktadır ve viskozite detektörü ile doğrulanmaktadır (Eşitlik 2.19).
 - Ağırlıkça ortalama molekül kütlesi, M_w
 - Sayıca ortalama molekül kütlesi, M_n
 - z-ortalama molekül kütlesi, M_z
- Boyut: Boyut değerleri viskozimetre ve ışık saçılması detektörleri kullanılarak hesaplanmaktadır.
 - Hidrodinamik yarıçap, R_h : $R_h = \left[\frac{3}{4\pi} \left(\frac{[\eta]M}{0,025} \right) \right]^{1/3}$ formülü kullanılarak hesaplanmaktadır.
 - “Gyration“ yarıçapı, R_g : 2.19 eşitliklerinden elde edilmektedir.
 - İntinsik viskozite $[\eta]$: İntinsik viskozite viskozimetre ve konsantrasyon detektörleri kullanılarak bulunmaktadır. Viskozite detektörü her ölçüm noktasında spesifik viskoziteyi

ölçmektedir ve o noktadaki konsantrasyon (konsantrasyon detektöründen gelen) değerine bölünerek intrinsik viskozite bulunmaktadır (Eşitlik 2.19).

- Mark-Houwink sabitleri (a , $\log K$): 2.19 eşitliklerinden elde edilmektedir.
- Molekül yapısı hakkında bilgi
 - Dallanma: Mark-Houwink sabitleri ve bir lineer polimer standardı kullanılarak elde edilmektedir.
 - Konformasyon (küresel, çubuk, rasgele yumak): Mark-Houwink sabitleri ve kütle-boyut grafiğinden bu bilgi elde edilmektedir.

2.2 Polimerlerde Molekül Kütlesi

Hemen hemen tüm polimerler, farklı derecede polimerleşmiş moleküllerin bir karışımıdır. Bu çok dağılımlılık bazı sentetik oligomerlerde proteinler gibi doğal polimerlerde görülmez. Tek dağılımlı (monodispers) polimerlerin tek bir molekül ağırlığı bulunmaktadır. Polimerler genelde çok dağılımlıdır (polidispers) ve bir molekül ağırlığı dağılımına sahiptirler. Bu sebeple polimerlerin molekül ağırlıkları ortalama bir değer olarak ifade edilmektedir. Polimerlerin molekül ağırlıkları farklı şekillerde belirtilebilir (Teraoka, 2002):

- 1) Sayıca ortalama molekül kütlesi (M_n)
- 2) Kütlece ortalama molekül kütlesi (M_w)
- 3) z-ortalama molekül kütlesi (M_z)

2.2.1 Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı

Sadece çözeltide bulunan moleküllerin sayısına duyarlı olan ve karışımdaki hiçbir taneciğin boyutundan etkilenmeyen kaynama noktası alçalması, donma noktası yükselmesi, osmotik basınç gibi özelliklerin kullanılmasıyla belirlenen ortalama molekül ağırlığına sayıca ortalama molekül ağırlığı denir. Böyle özellikler için önemli olan ortalama molekül ağırlığı tüm polimer kütlesinin polimer molekülleri sayısına bölümü ile elde edilen ağırlıktır. Sayıca ortalama molekül ağırlığı küçük mol ağırlıklı türlerin ağırlık kesrindeki değişimlere çok hassastır, çünkü küçük moleküller için az bir madde miktarı çok sayıda molekül demektir [1]. Sayıca ortalama molekül ağırlığı,

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (2.20)$$

formülü ile hesaplanır. Burada N_i , i moleküllerinin polimer kütlesi içindeki sayısı, M_i i

moleküllerinin molekül ağırlığıdır. i moleküllerinin kütle içindeki mol kesri, X_i ,

$$X_i = \frac{N_i}{\sum N_i} \quad (2.21)$$

eşitliği ile gösterilirse eşitliği

$$M_n = \sum X_i M_i \quad (2.22)$$

şeklini alır.

2.2.2 Ağırlıkça Ortalama Molekül Ağırlığı

Sadece polimer moleküllerinin sayısına değil aynı zamanda her bir polimer molekülünü boyutuna ve ağırlığına duyarlı olan ışık saçılması gibi yöntemlerle belirlenen ortalama molekül ağırlığına ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı denir. Bu ortalama ağırlık, büyük moleküllerin toplam polimer ağırlığının daha çoğunu oluşturduğu gerçeğine dayanır [1]. Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı,

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i} \quad (2.23)$$

formülü ile hesaplanır. Burada i moleküllerinin polimer kütlesi içindeki sayısı, M_i i moleküllerinin molekül ağırlığıdır.

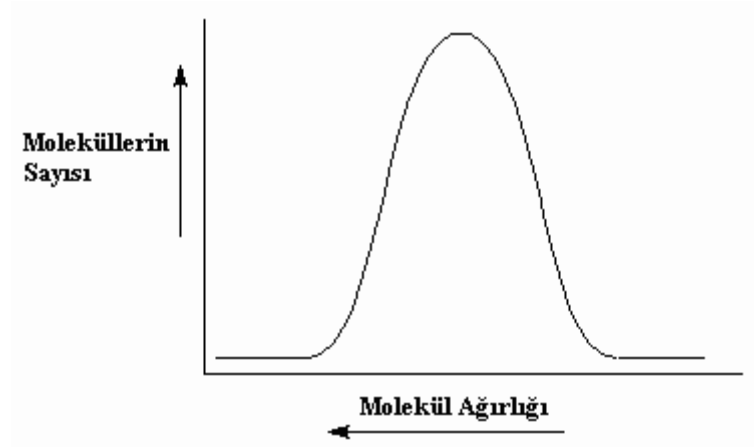
2.2.3 z-Ortalama Molekül Kütlesi

M_z olarak simgelenen z-ortalama molekül kütlesi şu şekilde tanımlanabilir (Teraoka, 2002):

$$M_z = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2} \quad (2.24)$$

2.2.4 Molekül Kütlesi Dağılımı

Mükemmel bir şekilde tek dağılımlı olan bir polimer için $M_n=M_w=M_z$ olur. Diğer polimerler için (çok dağılımlı) $M_n<M_w<M_z$ şeklindedir. Eğer bu polimer örneği için bir molekül ağırlığı dağılımı çizer ve anlatılan ortalama molekül ağırlıklarını grafik üzerinde işaretlersek ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı dağılımının yüksek molekül ağırlıklı kısmında ve sayıca ortalama molekül ağırlığı ise dağılımın düşük molekül kısmına yakın olur (Teraoka, 2002).



Şekil 2.12 Polimerlerde molekül ağırlığı dağılımı [1].

Eğer tüm polimer molekülleri aynı molekül ağırlığında ise, tüm molekül ağırlığı ortalamaları aynı olur. Bu pratikte yapay polimerler için geçerli değildir. Polimerler, bir polimerin molekül ağırlığı dağılımı genişliğinin ölçüsü olan molar ağırlık dağılımı kavramını kullanırlar. Bu ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının sayıca ortalama molekül ağırlığına oranıdır. Molar ağırlık dağılımı 1'e yaklaştıkça molekül ağırlığı dağılımı daralır.

$$MWD = M_w / M_n \text{ 'dir}$$

$M_w / M_n > 1$ ise polimer örneği polidispers,

$M_w / M_n = 1$ ise polimer örneği monodispersdir.

Molar ağırlık dağılımının dar olması polimerin bazı özelliklerini homojenleştirir. Örneğin polimerin sertliğini, uzamaya karşı direncini, ısı ve kimyasal direncini artırır ve çözünürlüğünü azaltır. Bunun sebebi polimer kütlesi içinde bulunabilecek kısa zincirlerin plastikleştirici etkisi yaparak polimerin kristalinliğini azaltmasıdır. Tüm zincirler aynı boyda olursa bu etki olmayacak, polimer en iyi şekilde kristalleşecektir. Molar ağırlık dağılımı genişledikçe polimer örneğinin de her türlü özelliği de heterojenleşecektir. Molar ağırlık dağılımı grafiğinde bir polimer örneğindeki polimer moleküllerinin gerçekte kaç tanesinin ortalama molekül ağırlığına sahip, kaçının daha ağır, kaçının daha hafif olduğu görülür [2].

2.3 Mark-Houwink-Sakurada Eşitliği

Intrinsik viskozite bir polimerin karakteristik özelliklerinden biridir. Konsantrasyon belirli miktarda arttığında çözeltinin viskozitesindeki artışı göstermektedir. İntrinsik viskozite, deneysel olarak, Mark-Houwink-Sakurada eşitliği ile ifade edilmektedir:

$$[\eta] = K.M^a \quad (2.25)$$

Bu eşitlikte $[\eta]$ intrinsik viskoziteyi, M polimerin molekül kütleini temsil etmektedir. K ve a ise polimere ait sabit değerlerdir. a sabiti, polimer zincirinin şekliyle bağlantılıdır. Çözeltide polimer zinciri çubuk şeklinde ise $a=2$ değerini alır. Polimer zincirinin alabileceği diğer bir şekil ise katı küre konformasyonudur ve bu durumda $a=0$ değerini almaktadır. Bu iki uç konformasyon arasında kalan konformasyonlardaki polimer zincirleri için $0 < a < 2$ eşitliği geçerlidir (Çizelge 2.2).

2.27 eşitliği doğrusal bir denklem haline getirilebilir:

$$\log[\eta] = \log K + a \log M \quad (2.26)$$

Bu denklem kullanılarak çizilen $\log[\eta]$ - $\log M$ grafiğinden K ve a sabitleri elde edilmektedir. Grafiğin y-eksenini kestiği nokta K değerini, grafiğin eğimi ise a değerini vermektedir [3].

Çizelge 2.2 Mark-Houwink-Sakurada eşitliğinde a sabitinin teorik değerleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).

Konformasyon	a
Çubuk	1,7-2
Yumak	0,5-0,9
Disk	0,5
Küre	0

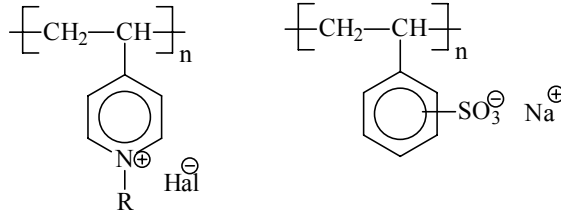
2.4 Polimerlerde Boyut

Çözelti içindeki polimerlerin boyutu en çok hidrodinamik yarıçap (R_h) ve dönme (“gyration”) yarıçapı (R_g) ile ifade edilmektedir. Hidrodinamik yarıçap çözelti içinde hareket eden polimerlerin çözelti ile etkileşimlerinden ve dinamik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Dönme yarıçapı ise polimer birimlerinin polimerin kütle merkezine olan uzaklıklarının ortalaması olarak tanımlanmaktadır [4]. R_h/R_g oranı polimerin çözelti içindeki konformasyonu hakkında bilgi vermektedir.

2.5 Polielektrolitler

Kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik gruplar içeren ve bu gruplara bağlı zıt yüklü iyonları olan polimer sistemleri için polielektrolit terimi kullanılmaktadır (Şekil 2.13) (Dautzenberg vd., 1994). Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere

homopolielektrolit, hem anyonik hem katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküllere ise poliamfolitler adı verilmektedir. Doğada bol miktarda protein yapılı poliamfolit olmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki toplam net yük sıfıra eşittir.



Şekil 2.13 Poli(vinilpiridinyum) halojenür ve sodyum poli(stiren sülfonat).

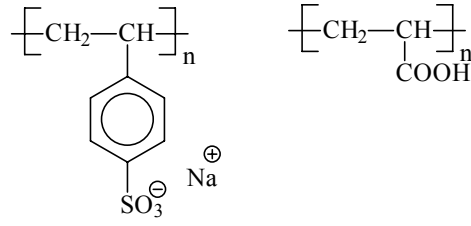
Prensipte, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine yeterli sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlanıp yapı uygun bir pH'da suda çözünür hale getirilerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler doğadan edinilebilir. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir (Dautzenberg vd., 1994).

2.5.1 Homopolielektrolitler

Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolitler adı verilmektedir. Polielektrolitlerin özellikleri bir yandan elektrolitlere (tuzlar) benzerken bir yandan da polimerlere benzemektedir ve polituzlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi viskozdur [5].

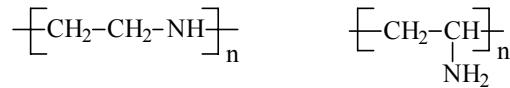
Polielektrolitin çözeltideki davranışlarından sorumlu iyonik grupların çeşidi yukarıda anlatılan polielektrolit zinciri yapılarının çeşidinden çok daha azdır. Polielektrolitlerin çözelti içindeki davranışlarını etkileyen başlıca dört faktörden söz edilebilir:

1. Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 2.14). Kuvvetli polielektrolitler çözeltide tüm iyonlarına ayrışırken, zayıf polielektrolitler tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir.



Şekil 2.14 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve poli(akrilik asit) (PAA). PSS kuvvetli, PAA zayıf bir polianyondur [5].

2. Polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama mesafe, polielektrolitin yük yoğunluğunu veren bir parametredir. Yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak da tanımlanabilir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir, örneğin çözünübilirlik. Bir kural olarak, eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin birden fazla iyonik kısmı varsa tipik polielektrolit davranışı beklenir.
3. Asit-baz kuvveti ve yük yoğunluğuna ek olarak, polielektrolit özelliklerinin saptanmasında, makro iyonun molekül geometrisinde yüklü kısımların yerleşimi üçüncü önemli noktadır. Şekil 2.15'e göre, iyonik gruplar ya polimerin ana zincirinin bir birimi olarak (integral tip) ya da bir ara zincir ile ana zince asılı olarak (yan zincirlerde) bulunur. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikasyon komplekslerinin oluşumu ile ilgilidir.

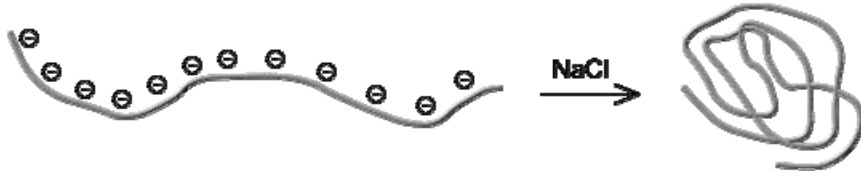


Şekil 2.15 İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin)

4. Düşük molekül ağırlıklı zıt yüklü iyonların (Na^+ , Cl^- , Br^- , K^+) türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi vardır, özellikle çözünürlük ve yapı oluşumunda. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(diallildimetilamonyum) polikasyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür (Dautzenberg vd., 1994).

Herhangi bir polimerin konformasyonu çeşitli etkenlere bağlıdır, özellikle polimerin yapısına ve çözeltiyle ilişkisine. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirini iter (Coulomb

itmesi) ve eksi (veya artı) yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan uzanmış (çubuk) halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 2.16). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makroiyondaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar [5].



Şekil 2.16 Çözeltiye elektrolit eklenmesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonuna geçmesi [6]

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

Polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozite artarken polielektrolitlerde konsantrasyon azalırken viskozite artar. Bunun nedeni azalan konsantrasyon artı ve eksi yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir.

Bazı polielektrolitlerin bağışıklık yanıtına kuvvetli etkisi ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için kullanılabileceği 70'li yılların başlarında immunolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bulunmuştur. Çünkü bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlemek mümkündür (Mustafaev, 1996).

2.5.2 Poliamfolitler

Poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisini bulunduran polielektrolitlerdir. Asidik ve bazik grupları içeren poliamfolitler, elektrokimyasal özellikleri proteinler gibi daha karmaşık biyolojik sistemleri taklit etmesi amacıyla ilk olarak 1950'lerde sentezlendi.

Polielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı-özellik ilişkisi anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki elektrostatik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda ($\geq$ % 10-15 mol), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaştırmaya başladıkça elektrostatik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'nın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünmesi kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla “antipolielektrolit etkisi” olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır (Merle, 1987; Higgs ve Joanny, 1991).

Yük dengesi etkilerine ek olarak, monomer birimlerine eklenmiş iyonik grupların doğası poliamfolitlerin davranışını etkilemektedir. En açık etki pH ayarlaması yapılarak iyonik grupların nötralize edilmesi ile gözlemlenebilir. Aslında, poliamfolitler pH cevabına bağlı olarak dört sınıfa ayrılır:

- Poliamfolitler zayıf katyonik ve anyonik grupların her ikisini içerebilir. Bu sistemler tipik olarak, anyonik bir tür olan karboksilat grubunu ve katyonik grup olarak da amin hidrohalojenürü içerirler.
- İkinci olarak, katyonik grup kuvvetli (kuaterner alkil grupları gibi), anyonik grup zayıf olabilir.
- Sülfonat gruplarında olduğu gibi anyonik grup kuvvetliken katyonik gruplar zayıf olabilir.
- Son olarak, baştanbaşa anyonik ve katyonik grupların hepsi kuvvetli olabilir. pH etkisinin yanında, yüklü grupların hidrate olması ve karşıt yüklü gruplar arasındaki gerilim gibi diğer önemli faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu sistemlerin keşfinin ardındaki mantık proteinler gibi biyolojik moleküllerin sulu çözeltideki davranışlarını derinlemesine anlaşılmasını sağlamaktır. Birçok sentetik sistem, proteinlerde olduğu gibi, elektroforetik mobilitesinin olmadığı ve viskozitesinin minimum olduğu bir pH değerinde bir izoelektrik noktasına sahiptir (Higgs ve Joanny, 1991). Ayrıca izoelektrik noktanın altında veya üstündeki pH değerlerinde viskozitede artış gözlenmektedir. İzoelektrik noktada yüklü gruplar arasındaki güçlü çekim sayesinde polimer intramoleküler olarak bir araya toplanmaktadır ve oldukça kompakt bir yapı meydana gelmektedir. pH izoelektrik noktanın altına veya üstüne çekildiğinde bazik veya asidik gruplar nötralleşir, aynı yüklü gruplar arasındaki elektrostatik itme gücü nedeniyle polimer zinciri gerilir ve

viskozitede artış gözlemlenir. İzoelektrik noktada çözücünün niteliğinin, elektrolit eklenmesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Çözünürlük ve pH cevabı mikroyapılara da bağlıdır. Örneğin, asidik ve bazik grupların kuvvetini etkileyen yakın komşu etkileşimler [7].

Sülfonat grubuna bağlı olarak anyonik türdeki poliamfolitler incelenmiştir. Karboksilat gruplarından daha kuvvetli asit olan sülfonat grupları uygun pH aralığının üzerinde sulu çözeltide iyonize olurlar. Bu sistemlerle ilgili çalışmalar elektrolitlerin varlığında elektrostatik etkileşimler üzerine odaklanmıştır. Katyonik ve anyonik yük oranı birbirine yaklaşmaya başladığında kopolimer deiyonize suda çözünmez hale gelir ve çözünür olabilmesi için kritik bir konsantrasyonda tuz ilavesi gerektirmektedir. Daha fazla tuz eklenmesi üzerine viskozitedeki artıştan anlaşılabileceği gibi bu sistemler “antipolielektrolit” davranış gösterirler. Bu tip poliamfolitler deiyonize suda intermoleküler olarak toparlanmaya eğilim gösteren noniyonik bir hidrofilik termonomeri de kapsamaktadır. Bu toparlanmalar elektrolit ilavesi ile bozulabilir (McCormick ve Salazar, 1992).

Proteinler, monomerleri amino asitler olan doğal polimerlerdir. Asidik ve bazik yan zincirlere sahip amino asitler proteinlerin yapısında bulunduğu için, proteinler amfoterik özellik göstermektedirler. Bu sebeple proton vererek veya proton alarak yüklenmektedirler. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir.

Eğer bir protein izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa en az çözünür haldedir ve en kolay çöktürülebilir durumdadır. Proteinlerin izoelektrik noktaları birbirinden oldukça farklıdır. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda bulunmaktadır (Gözükara, 1997).

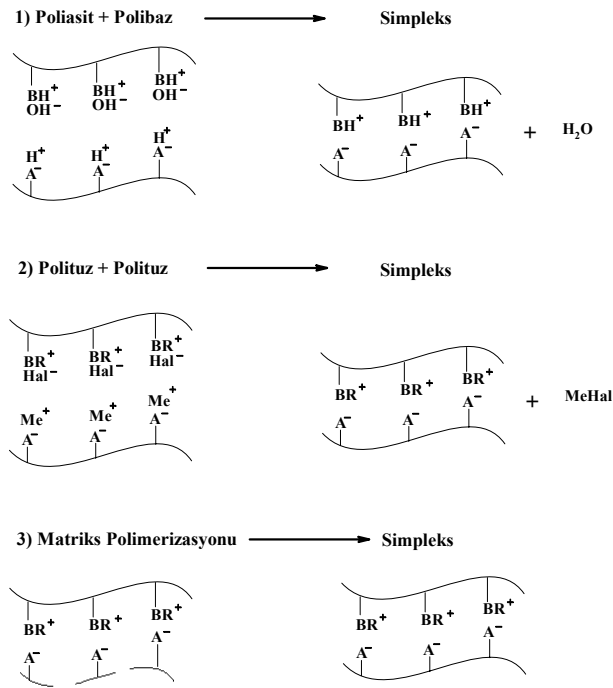
2.5.3 İnterpolielektrolit Kompleksler

Polielektrolit kompleksler karşıt yüklü makromoleküllerin sulu çözeltide baskın olarak coulombik kuvvetlerle etkileşmesi oluşurlar. Diğer intermoleküler etkileşimler hidrojen bağları, yük transferi ve dipol kuvvetler veya hidrofobik etkileşimlerdir. Bu etkiler agregat oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır ve sulu çözeltide kompleksin kolloidal davranışını saptamaktadır. Polielektrolit komplekslerinde birincil olarak, karşıt yüklü gruplar arasındaki etkileşimler yer alır. Makromoleküllerin sulu çözeltide iyonize olabilen grupları arasındaki etkileşimleri basit olarak 2.27 eşitliği ile gösterilebilir.



Reaksiyon koşullarına ve kullanılan bileşenlerin doğasına bağlı olarak, kompleks oluşumu prosesi ve komplekslerin özellikleri fazlaca şişmiş hidrojellerle kompakt çökelekler arasında değişmektedir [7].

Kompleks oluşumu asit-baz kavramına dayanmaktadır. Kompleks oluşumunda genel olarak başlıca üç yol bilinir (Şekil 2.17): poliasit-polibaz etkileşimi, polituz-polituz etkileşimi ve matriks polimerizasyonu.

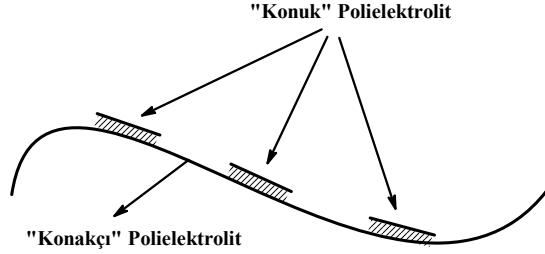


Şekil 2.17 Simpleks oluşum yolları.

Sadece birincisinde nötralizasyon söz konusudur ve ekzotermik bir reaksiyondur (reaksiyon ısısı 2 kcal/mol), fakat genel olarak karşıt yüklü gruplar arasındaki bağlanma hemen hemen atermaldir (Falb vd, 1968). Kooperatif etkiler kompleks oluşumunu desteklediğinden ilk iyon eşleşmesinden sonra daha fazla çapraz bağlanmalar gerçekleşir. Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin kompleksleri ile makromoleküllerin kompleksleri arasındaki en önemli fark; polimerin intra veya intermoleküler olarak etkileşimde bulunan uzun kısımları arasındaki bu kooperatif etkileşimlerdir.

Kompleks oluşum prosesi çok hızlıdır. Oldukça uzun polielektrolit (konakçı) ile kısa bir polielektrolitin (misafir) birleşmesiyle ardışık nonstokiyometrik suda çözünebilen simpleksler oluşabilir (Şekil 2.18) (Osada vd., 1972; Tsuchida ve Osada, 1974) . Kabanov ve Zezin

(1984) çeşitli reaksiyon koşullarında suda çözünebilen simplekslerin oluşumunu kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Konakçı ve misafir polielektrolit arasındaki daha zayıf bağlanmalar bu sistemler için karakteristik gibi gözükmemektedir ve yeniden düzenlenmeler ile çözünebilir halden çözünemez hale dönüşümler gözlemlenmiştir.



Şekil 2.18 Nonstokiyometrik suda çözünebilir simplekslerin şematik gösterimi.

Tek fazlı homojen sistemlerle faz ayrımının gerçekleştiği sistemler birbirinden ayrılmalıdır. Makroskobik homojen sistemler üç yolla elde edilebilir:

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

Faz ayrılması bulanık simpleks dağılımını, simpleks yumağı ve polimerce zengin ve az koaservatlaşmayı içermektedir. Makroskobik homojen sistemler ve bulanık sistemler olarak simpleksleri ikiye ayıracak keskin bir çizgi yoktur. Çünkü insan gözündeki yanılgılardan dolayı bu ayrım fiziksel değildir.

Elektroforetik ve viskometrik ölçümler simpleks partiküllerinin poliamfolite benzer bir özellikte olduğunu göstermiştir. Seyreltik sulu sistemlerde simpleks oluşumu prosesi için iki basamaklı bir mekanizma önerilmiştir. Birinci basamakta (az miktarda titrant eklendiğinde), iyon eşleşmeleri prosesi ufak simpleks agregatların oluşumuna sebep olmaktadır. Bu primer agregatların yüzey yükü karardır. İkinci basamakta, 1:1 stokiyometrisi için gerekli miktarın %70'inden fazla titrant eklendiğinde, primer agregatların birbirleri ile agree olması sonucu daha büyük partiküller oluşur [7].

Oluşan materyalin özelliklerini saptayan ilk faktörlerden biri de yük-yük etkileşiminin stokiyometrisidir. Stokiyometrik kompleksler "koaservatlar" ve "çökelti" şeklinde de adlandırılmaktadırlar. Oluştukları ortamda çözünür olmayabilirler (Commandur, 1989). Ayrıca yükler nötralize olsa bile çözünebilir komplekslerin oluşumu için düşük konsantrasyonlar yeterli olabilmektedir. Bunun aksine nonstokiyometrik polielektrolit

kompleksler yüklerinin bazıları iyonize olduğu için farklı olarak çözünebilen partiküller bulundurmaktadır.

Bir polielektrolit kompleksi oluşumunun gidişatı yüklü grupların etkileşimlerine (iyonizasyon-dissosiasyon gibi) öncülük eden olaylara bağlıdır.

Polielektrolit üzerindeki yük yoğunluğu, kompleksin hem oluşumunda hem de özelliklerinde etkilidir. Yük yoğunluğu az olan polielektrolitlerin oluşturduğu kompleksler daha kolay dissosiyelerken yük yoğunluğu yüksek polielektrolitler daha stabil kompleksler oluştururlar. Koetz ve arkadaşları (1986) polielektrolitlerin kimyasal yapısının ve yük yoğunluğunun kompleks oluşumunu önemli derecede etkilediğini göstermiştir.

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

Proteinler de polielektrolit özelliğindedir. Hem sentetik hem de doğal polimerlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerek polielektrolit kompleksleri oluşturmaktadırlar (Sacco vd., 1988; Dellacherie, 1991). Proteinlerin, izoelektrik noktalarının altında ve üstünde, polianyonlara ve polikasyonlara bağlanması hakkında birçok kanıt bulunmaktadır. Bu etkileşimler, çözünebilir komplekslerle, koaservat oluşumuyla (Lenk ve Thies, 1987; Veis, 1991) veya amorf çökelti oluşumuyla sonuçlanabilir (Nguyen, 1986; Kokufuta vd., 1981). Bu faz değişimlerinin sonuçları; proteinleri ayırmada polielektrolitlerin kullanımını, polielektrolit komplekslerde enzimlerin immobilizasyonu veya stabilizasyonunu ve protein substrat affinitesinin modifikasyonunu içermektedir (Shieh ve Glatz, 1991).

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir. Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır.

Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiyometrik çökelme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid titrasyonuna benzemektedir (Thies vd., 1994). Kabanov ve araştırmacıları (2004) zıt yüklü polielektrolitler temeline dayanan interpolielektrolit kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki halli model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı (Kabanov vd., 2004).

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

Proteinlerle hidrofobik olarak etkileşecek polimerler spesifik olarak tasarlanabilir. Ancak önemli olan nokta, hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı hallerin bilinmesidir (Radeva, 2001). Bütün proteinlerin değişen miktarlarda hidrofobik bölgeleri bulunduğundan ve tüm vinil polimerlerin ana zinciri hidrofobik olduğundan bu tip etkileşimlerin incelenmesi önemlidir. Diğer taraftan bu kuvvetlerin uzun mesafeli doğasından dolayı kuvvetli elektrostatik kararlılığın olması için çözünme de dikkate alınmalıdır. Hidrofobik etkileşimler bazı karakteristik belirtilere sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonunda daha kuvvetli hale gelirler. Hidrofobik yan zincirler takılmış polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Yapılan çalışmalar elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin birbirlerine katkıda bulunduklarını göstermektedir (Schreiber vd., 2000).

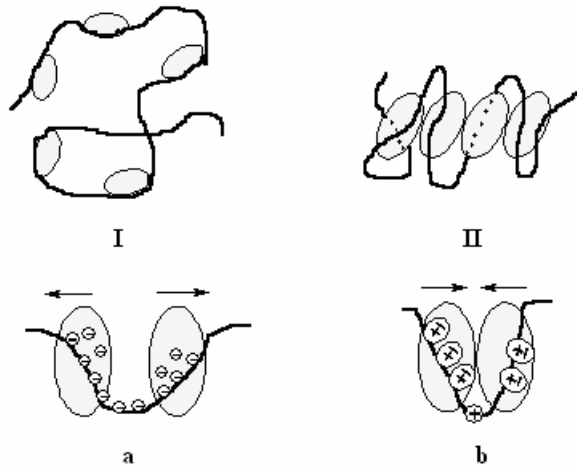
Proteinler ve polielektrolitler arasındaki kompleksleşme Coulomb etkileşimlerinden dolayı gerçekleştiği için, pH'nın arttırılması protein-polikasyon kompleksi oluşumunu, pH'nın azaltılması protein-polianyon kompleksi oluşumunu arttırmaktadır. Proteinle polielektrolit arasında kompleks oluşumu polielektrolit ve proteinin net yüklerinin birbirlerine eşit oldukları durumlarda bile gerçekleşmeye başlayabilir. BSA, lizozim ve RNAz gibi proteinlerle anyonik

ve katyonik polielektrolitlerin kompleks oluşturması sırasında aynı yüklü sistemlerde kompleks oluşumuna protein üzerindeki düzensiz yük öbeklerinin sebep olduğu bulunmuştur. Poliiyonun negatif yük yoğunluğu arttıkça protein-polielektrolit kritik bağlanma pH'ı artmaktadır. Bunun sebebi; daha yoğun yüklü poliiyonlarla protein üzerindeki bölgesel pozitif yüklü alanlar arasındaki elektrostatik çekim kuvveti polianyonla küresel protein arasındaki itme kuvvetlerini yenmektedir. Polianyonlarla negatif yüklü küresel proteinler arasında oluşan kompleksler polielektrolit ve proteinin yük öbeği arasındaki bölgesel etkileşimleri ortaya koymaktadır.

Mustafaev ve arkadaşları lineer polielektrolitlerin (polianyon ve polikasyonların) aynı ve zıt yüklü proteinlerle oluşturdukları suda çözünür kompleksleri ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Polimerik taşıyıcı molekülün doğasına bağlı olarak (protein bileşimi ve çevre koşulları), iki tip suda çözünür polielektrolit-protein kompleksi oluşabilmektedir (şekil 2.21). Birinci tip (Yapı I) kompleksler ikinci tip komplekslerden farklıdırlar. İki polikompleks yapısı arasındaki fark, polielektrolit zincirine adsorbe olan protein küreleri arasındaki etkileşimleri (çekme, itme) kontrol eden faktörlerin davranışlarından kaynaklanmaktadır. Proteinlerin net yükü her iki kompleks tipinde de negatiftir ve elektrostatik etkenler proteinlerin bir araya gelmesini engellemektedir. Aynı zamanda, polar olmayan etkileşimlerin sulu ortamda proteinlerin bir araya gelmesini arttıran bir etken olduğu bilinmektedir. Protein yüzeyindeki negatif yüklerle polikasyonun pozitif yüklü monomerleri arasında elektrostatik bağların oluşumu, proteinlerin polikasyonlara tutunmasındaki ana etkindir. Polikompleksin oluşması protein molekülünün yüzeyinde olan negatif yüklerin polikasyon zincirindeki pozitif yükler sistemiyle kooperatif reaksiyonundan meydana gelir. Bu şekildeki etki proteinin polimerle kuvvetli birleşmesini oluşturur. Kooperatif adsorpsiyonda elektrostatik faktörlerin rolü iyonik şiddetin artmasıyla kompleksin kararlılığının azaldığını gösterir. Sonuç olarak protein moleküllerindeki negatif yükler nötralize olmaktadır ve diğer proteinlerin bağlanmasını engellememektedirler. Yani polar olmayan karşılıklı bir etki gözlenmektedir. Aynı zamanda polikasyonun yükleri yeteri kadar kapanarak "II" yapısının yığılması yolu ile ayrı ayrı bölümlerinin yakınlaşmasına imkan vermektedir (Mustafaev, 1996).

Proteinlerin polianyonlarla adsorpsiyonunda durum tamamıyla başkadır. Negatif yüklü kürelerin polielektrolitlerle bağlanması elektrostatik itmenin tersi olarak oluşmaktadır. Her bir adsorbe olan proteinin efektif negatif yükü buna bağlı polianyon monomerinin miktarına göre artabilmektedir. Buna göre kompleks partiküllerinde küresel proteinlerin temasta olması menfaatli değildir ve bunlar birbirlerine aralıklı olarak yerleşerek "I" tipli yapıyı

oluşturmaktadırlar. Böylelikle küresel proteinler lineer polielektrolitlerle iki tip çözünen kompleks oluşturabilmektedir. Proteinlerin polikasyonlarla kompleksleri açık bir şekilde ifade olunan kooperatif karakterdedir ve kendisine bağlı yapı meyili olması ile karakterize olurlar. Proteinin az miktarında bunlar için küresel proteinlerin polielektrolit zincirleri arasında beraber olmayan dağılması görülmektedir. Proteinle maksimum yüklenmiş polikasyonlar pratik olarak, yüklenmemiş polikasyonlarla aynı zamanda bulunmaktadır. Silindire benzer partiküllerin kendisine bağlı yığını oluşur. Bu sistemlerin tam aksi olarak proteinlerle polianyonların çözünen kompleksleri bunlarda küresel proteinlerin beraber absorpsiyonu yolu ile oluşmaktadır. Böylece sistemde istatistik yumak konformasyonunda olan çözünen kompleks partikülleri oluşmaktadır.



Şekil 2.19 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $nP/nPE \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı "a" ve "b" - "a" (I) ve "b" (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir (Mustafaev, 1996).

2.6 Polikomplekslerin SEC'te İncelenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Kabanov, Mustafaev ve araştırmacıları (1978) lineer polielektrolitlerin (poliasitlerin polianyonları, poliamfolitler, polikasyonlar ve onların türevleri) aynı yüklü (pozitif veya negatif) globular proteinlerle karşılıklı etkisini incelemişler ve çok miktarda suda çözünebilen polimer-protein kompleksleri yapmışlardır. Yapmış oldukları çalışmalarda ultrasantrifüj cihazı kullanarak sedimentogramlar elde etmişlerdir. Ultrasantrifüj cihazı da molekülleri kütlelerine göre ayırması açısından SEC'e benzemektedir. Bu sebeple burada incelenmesi, konu için gereklidir. Mustafaev ve arkadaşlarının çalışmalarına göre; PAA-BSA çözeltilerinin pH 7'de alınmış sedimentogramları iki pik ile karakterize olmaktadır. Piklerden birinin

sedimentasyon sabiti poliasit çözeltisinin sedimentasyon sabitine uygunken diğer pikin ise serbest proteine uygun olduğu bulunmuştur. Proteini ilave ettikçe protein pikinin alanı artarken, diğer pikin alanı ise sabit kalmaktadır. Bu sonuç pH=7’de PAA ile BSA’nın kompleks oluşturmadığını göstermektedir. pH 7’de protein ve poliasit negatif yüklenmişlerdir. Buna göre de aynı yüklenmiş partiküllerin birbirini elektrostatik itmesi kompleks oluşumunu engellemektedir (Mustafaev, 1996).

Elde edilen sedimentogramlara göre, pH azaldığı zaman (pH 6) PAA-BSA sisteminde karşılıklı etkinin karakteri değişmektedir. Bu sistemin sulu çözeltilerinin sedimentogramlarında yalnız bir pik görülür. Protein ilave ettikçe bunun alanı ve sedimentasyon sabiti artmaktadır. Bu farklar çözeltideki bileşenler arasında kompleks oluşumunu göstermektedir. pH 6’da protein ve polielektrolit önce olduğu gibi aynı yüklüdürler. pH 7’ye nispeten genel negatif yük her ikisinde daha azdır. Başka bir deyişle önce olduğu gibi elektrostatik karşılıklı etki kompleks oluşumunu engellemektedir. Ancak proteinin lineer polielektrolitle adsorbsiyonuna neden olan başka faktörleri yok edememektedir. Böyle faktörlerden hidrojen bağlarını ve polar olmayan karşılıklı etkiyi göstermek olasıdır (Mustafaev, 1996).

PAA-BSA kompleksleri “circular dichroism” ve optik çevrilme metodu ile incelenmiştir. Sonuçlar proteinin kompleksleşmesi sırasında sarmallık seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuca göre proteinin polianyon üzerine adsorbsiyonu ile küresel yapısının fazla değişmediğini söylemek mümkündür. Polielektrolit makromoleküllerinin zincirinin uzunluğunun küresel proteinlerin çapından fazla olduğu dikkate alınarak her bir zincirin ardışık olarak birkaç protein molekülünü bağladığını söylemek mümkündür (Mustafaev, 1996).

Elektrostatik itme faktörünün elimine edilmesi BSA proteinin sodyum poli(stirensülfonat) (PSSNa) ile etkileşiminde daha iyi görülmektedir. BSA-PSSNa sulu çözeltileri proteinin çeşitli konsantrasyonlarında sedimentogramlarla ancak şiddetli bir dar pikle karakterize edilmiştir. Bunun alanı ve sedimentasyon sabiti sistemde protein miktarı arttıkça çoğalır. Bu sonuçlar çok büyük ihtimalle pH 7,5’te proteinle polielektrolit arasında kararlı polikompleks oluştuğunu göstermektedir. Aynı yüklü partiküllerin birleşmesinde, proteinin PSSNa poliiyonunun hidrokarbonları ile karşılıklı hidrofobik etkinin baskın olduğu gösterilmiştir (Mustafaev, 1996).

Polielektrolit komplekslerinin SEC cihazından elde edilen sonuçlarının daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle polielektrolitlerin bu cihazda incelenmesi gerekmektedir.

Buijtenhuijs ve Riet'in (1999) yaptığı çalışma polielektrolitlerin molekül kütlesine hassas detektörlere sahip SEC cihazında incelenmesine bir örnek olmuştur. Bu çalışmada polielektrolitler için uygun çalışma şartlarını belirtmişlerdir. Polielektrolitlerle dolgu malzemesi arasındaki etkileşimi en aza indirmek ve polielektrolitlerin hidrodinamik çaplarını azaltmak için iyonik şiddetin yeterli derecede yüksek olması gerektiğini göstermişlerdir. Ayrıca enjekte edilecek polielektrolit çözeltisinin konsantrasyonunun yüksek olmaması gerektiğini bulmuşlar ve bunu bir formülle ifade etmişlerdir:

$$IV \text{ (dL/g)} \times \text{Enjeksiyon Hacmi (mL)} \times \text{Konsantrasyon (mg/mL)} < \sim 0,2$$

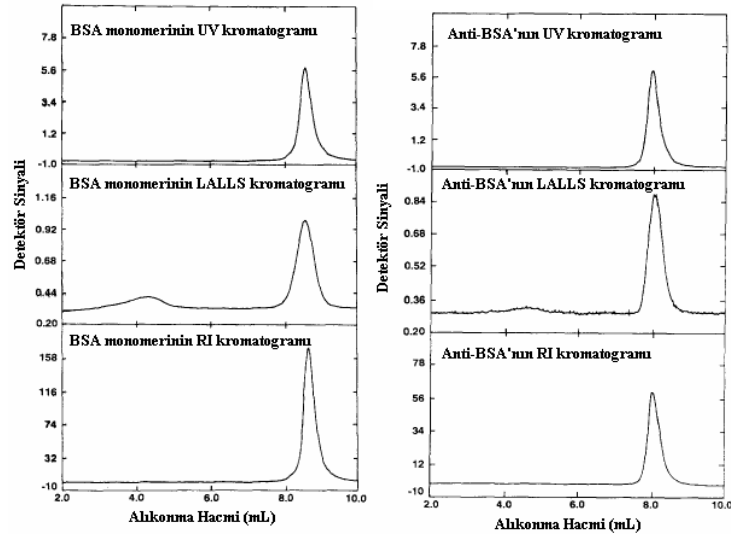
Yüksek konsantrasyonlarda polimer zincirleri yumaklaşır ve hidrodinamik hacimleri azalır. SEC kromatogramında oluşan pikin maksimumu daha büyük alıkonma zamanlarına kayar (Buijtenhuijs ve van de Riet, 1999).

Andrianov ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada poli[di-(karboksilatofenoksi)fosfazen] (PCPP) polimeri ile BSA'nın suda çözünen kompleksini MALLS, UV ve RI detektörlü SEC sisteminde incelemişlerdir. pH 7,4 değerinde, 0,5M NaCl içeren PBS mobil faz olarak kullanılmış, ayırma işlemi Ultrahydrogel (Waters) kolonunda 0,75 mL/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir.

PCPP polimerinin molekül ağırlığı $1,37 \cdot 10^6$ g/mol, yarıçapı 67 nm olarak bu cihaz tarafından bulunmuştur. BSA ve PCPP polimeri PBS çözeltileri kullanılarak farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanmıştır. Oluşan çözeltilerde çökelek oluşumunun olmadığı yayında belirtilmiştir. Kromatogramlarda BSA ve kompleks piklerinin birbirlerinden tamamen ayrıldığı, kompleks pikinin polimer pikiyle aynı yerde çıktığı ve kompleks çözeltilerinde BSA'nın UV kromatogramlarındaki piklerinin serbest BSA'dan daha ufak olduğu gösterilmiştir. Kompleks ve BSA pikleri ayrı ayrı incelenebilmiştir. En az BSA kullanılarak yapılan kompleksin molekül ağırlığı $1,7 \cdot 10^6$ g/mol, yarıçapı 81 nm olarak bulunmuştur. Kompleksin molekül ağırlığı polimerinkinden oldukça fazlayken, yarıçapı polimerden çok büyük değildir. Molekül kütlesi artarken boyutu aynı oranda artmadığı için, komplekse eklenen BSA miktarı arttıkça makromoleküler yapının kompaktlaşmakta olduğunu öne sürmüşlerdir. Kompaktlaşma miktarının kompleksin bileşimine ve karıştırma süresine bağlı olduğunu göstermişlerdir.

Qian ve arkadaşları 1997 yılında BSA'nın ($M_w=66200$ Da) anti-BSA antikoru ($M_w=150000$ Da) ile oluşturdukları farklı oranlardaki polikompleksleri SEC-RI-UV-LS-VIS sistemi ile incelemişlerdir. Kullanılan mobil faz PBS, kolon ise TSKgel G 2000 SW_{XL}'dir. Anti-BSA ve

BSA kompleksleri iki şekilde hazırlanmıştır. Birincisinde anti-BSA üzerine aşırı BSA eklenerek, ikincisinde ise BSA üzerine aşırı anti-BSA eklenerek kompleksler elde edilmiştir. BSA ve anti-BSA'nın kromatogramları şekilde görüldüğü gibidir.



Şekil 2.20 BSA ve anti-BSA'nın UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).

Oluşan komplekslerin molekül kütleleri hesaplanırken kompleksin konsantrasyonu ya da dn/dc değeri bilinmelidir. Yazarlar kompleksin dn/dc 'sini bulmak için öncelikle kompleksin bir kopolimer olduğunu kabul etmişlerdir ve toplanabilirlik kuralına göre kopolimerin dn/dc değeri ürünlerin dn/dc değerleriyle monomer veya homopolimerin kütle fraksiyonlarının çarpımlarının toplamına eşit olduğunu göstermişlerdir:

$$(dn/dc)_{kopolimer} = \sum W_i (dn/dc)_i \quad (2.28)$$

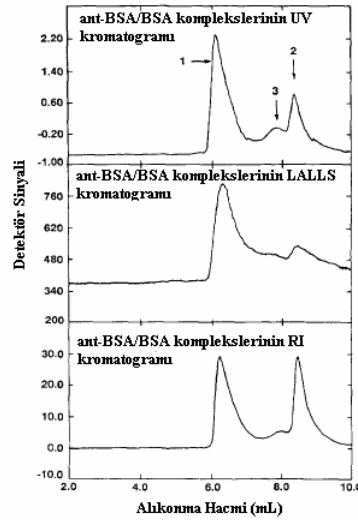
Bu bağıntı biyokonjugatlar ve biyokopolimerler için ilk olarak Watanabe ve Kato tarafından kullanılmıştır. Oluşacak anti-BSA/BSA kompleksi için şu formül önerilmiştir:

$$(dn/dc)_{kompleks} = (1 - W_{BSA})(dn/dc)_{anti/BSA} + W_{BSA}(dn/dc)_{BSA} \quad (2.29)$$

Bu formülde BSA ve anti-BSA'nın dn/dc değerleriyle proteinlerin kütle fraksiyonlarının bilinmesi gerekmektedir. Molekül ağırlığı 20000'den büyük proteinler için dn/dc değeri sabittir. Bu sebeple kompleks tek bir protein olarak düşünülüp dn/dc değeri proteinlerin kütle fraksiyonları kaç olursa olsun sonuç bu sabit değer çıkacaktır. Komplekslerin kütle hesabında bu değer kullanılmıştır.

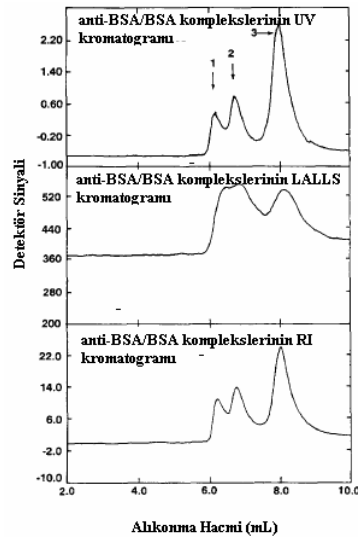
Şekil 2.21, çözeltide aşırı BSA olduğunda, anti-BSA/BSA karışımının kromatogramını göstermektedir. Bu kromatogramda gözüken yeni pik anti-BSA/BSA kompleksinin pikidir. Ölçülen M değeri 2:1 oranındaki komplekse uygun olduğu (297000'e karşılık 282000)

bulunmuştur.



Şekil 2.21 BSA/anti-BSA kompleksinin (aşırı BSA eklendiğinde) UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).

Anti-BSA aşırı olduğu durumda ise, kromatogramda 2 yeni pik (Şekil 2.22) oluşmuştur. Bunlar iyi ayrılmamışlardır. Kolondan ilk çıkan pikin 2:1 oranındaki komplekse uygun olduğu gösterilmiştir. İkinci pik ise, 2:1 ve 1:1 (Ag-Ab) kompleks oranları arasında bulunmaktadır. İki pikin üst üste gelmesinden dolayı 2:1 oranındaki kompleksin kütlesi önceki değerden daha küçük çıkmıştır. Kütlesi ve alıkonma zamanına göre, diğer kompleks daha çok 1:1 oranına uygun gelmektedir. Kütlesi de 242000 Da olarak bulunmuştur.



Şekil 2.22 BSA/anti/BSA kompleksinin (aşırı anti-BSA eklendiğinde) UV, LALLS ve RI kromatogramları (Qian vd., 1997).

Ayrıca viskozite detektörü de kullanılarak kompleks ve proteinlerin boyutları da bulunmuştur.

BSA'nın boyutu 3,5 nm, anti-BSA'nın boyutu 5,8 nm ve 2:1 oranındaki kompleksin boyutu da 6,5 nm olarak bulunmuştur. Bu çalışmada protein-protein komplekslerinin SEC cihazında incelenmesi için yeni bir metot öne sürülmüştür.

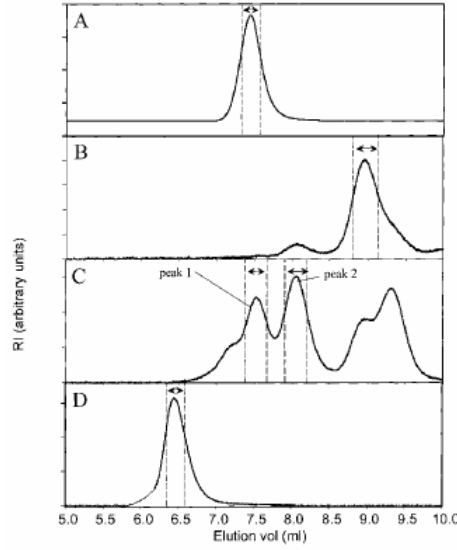
Diğer bir çalışmada proteinlerin PEG'le oluşturdukları konjugatlar SEC-RI-UV-LS sistemi ile incelenmiştir (Kendrick vd., 2001) ve polimer-protein konjugasyonunun derecesi ile assosiasyon durumunu verecek daha hızlı ve kolay bir yol önerilmektedir. Bu çalışmada da konjugatın dn/dc değerinin bulunması hakkında geniş bilgi verilmiştir. Konjugatın bir kopolimer olduğu kabul edilmiş ve toplanabilirlik kuralına göre dn/dc değeri bulunmaya çalışılmıştır. Konjugatın dn/dc değerinin bulunması için polimer ve proteinin dn/dc değerleri ve konjugat içindeki kütle fraksiyonlarının bilinmesi gerekmektedir. Konjugat içindeki bileşenlerin kütle fraksiyonları bilinmediği için yazarlar tarafından farklı bir yol izlenmiştir. Yazarlar molekül kütlesiyle dn/dc arasında şu şekilde bir bağıntı vermiştir:

$$M_{konjugat} \times (dn/dc)_{konjugat} = M_i \times (dn/dc)_i = \alpha \quad (2.30)$$

Bu denkleme göre kromatogramdaki konjugat piki için kullanılacak herhangi bir dn/dc değeriyle elde edilen molekül kütlelerinin çarpımı α değerini vermektedir. Konjugatın gerçek molekül kütlesi ile gerçek dn/dc değerinin çarpımı da yine α değerini vermektedir. α , konjugatın molekül kütlelerini hesaplamak için yazarlar tarafından kullanılmıştır:

$$M_{konjugat} = \frac{\alpha - M_{protein} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{protein} + M_{protein} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{polimer}}{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{polimer}} \quad (2.31)$$

Bu denklemde proteinin ışık saçılması detektörü tarafından saptanmış molekül kütlesi ($M_{protein}$) kullanılmıştır. Kullanılan α değeri rasgele bir dn/dc değeri ile SEC yazılımının bu dn/dc değerine karşılık verdiği molekül kütlesi çarpılarak bulunmaktadır. Bu formüller kullanılarak PEG-protein konjugatının molekül kütlesi ve PEG'e bağlı protein sayısı bulunmuştur. Yazarları değindiği diğer önemli husus ise molekül kütlesi hesabının yapılacağı pikin sınırları ve zeminin seçilmesidir. Kromatogramlarda pikler birbirinden tamamen ayrılmadığı için hesap yapılırken pikin üstten üçte ikisi ya da yarısı kullanılmıştır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23 Molekül kütlesi hesabı yapılırken piklerin seçilen sınır değerleri (Kendrick vd., 2001).

Wen ve arkadaşlarının (1996) yaptığı çalışmada ise protein-protein komplekslerinin ve protein-polisakkarit komplekslerindeki proteinlerin molekül kütlesinin nasıl bulunacağı gösterilmiştir. Polisakkarit içermeyen protein kompleksleri için şu formülü önermişlerdir:

$$M = K'(LS)(RI) \quad (2.32)$$

Formülde M molekül kütlesini, K' detektörlerin kalibrasyon değerlerini, LS ve RI ise detektörlerden okunan değerleri göstermektedir. LS ve RI değerleri için kompleks pikinin alanını veya pikler iyi ayrılmadığında pikin tepe noktasındaki detektör cevabı kullanılmıştır. Proteinlerin polisakkaritlerle olan komplekslerinde formül 2.32'yi kullanmak uygun değildir, çünkü proteinlerin polisakkaritlerle komplekslerle homojen dağılım göstermezler. Her protein eşit miktarda polisakkaritler kompleks yapmamaktadır. Bu sebeple kompleks içindeki proteinin molekül kütlesi hesaplanırken proteinin molar absorpsansı hesaba katılır ve proteinin konsantrasyonu bu detektörle bulunur. UV, LS ve RI detektörleri kullanılarak proteinin kütlesinin hesabı için şu formül kullanılmıştır:

$$M_p = \frac{K_{RI}^2 (LS)(UV)}{K_{LS} K_{UV} \epsilon_p (RI)^2} \quad (2.33)$$

Burada önemli olan nokta polisakkaritin absorpsans yapmadığı proteinin absorpsans yaptığı dalga boyunda analizlerin gerçekleştirilmesidir. K sabitleri farklı molekül ağırlıklarında proteinlerin analizi yapıp $(LS)(UV)/\epsilon_p(RI)^2$ değerleri ile molekül kütleleri arasında kalibrasyon grafiği çizilerek bulunmaktadır.

Arakawa ve Wen'in 2001'de yaptığı çalışmada yine konjugat veya glikoproteinlerdeki karbohidrat miktarını tayin etmişlerdir. Karbohidratın absorbans yapmadığı proteinin ise absorbansının olduğu dalga boyunda UV, RI ve LS detektörlerinden elde edilen piklerin alanları kullanılarak hesap yapılmaktadır. Eşitlik 2.34 kullanılarak karbohidrat-protein oranları saptanmaktadır.

$$\frac{1}{\varepsilon_p M_{pro}} \left(M_{pro} \left(\frac{dn}{dc} \right)_{pro} + M_{kar} \left(\frac{dn}{dc} \right)_{kar} \right)^2 = K \frac{(LS)}{(UV)} \quad (2.34)$$

Yine farklı molekül ağırlıklarında karbohidrat içermeyen proteinler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilerek içeriğindeki karbohidrat oranı bilinmeyen proteinin analizi yapılmaktadır. Yapılan hesap sırasında konjugattaki bileşenlerin oranı hakkında yaklaşım yapılarak (2:1, 1:1, 3:1, vb.) çıkan sonuca göre yaklaşımın doğruluğu kontrol edilmektedir.

Glikoproteinlerde ve konjugatlarda karbohidrat tayini için yapılan bu çalışmalar polimer-protein komplekslerine ve konjugatlarına da uygulanabilmektedir. Polimerin absorbans yapmadığı dalga boyunda çalışmak yeterli olmaktadır.

Peng ve Zhang (2003) *Ganoderma tsugae* mantarından ekstrakte ederek elde ettikleri polisakkarit-protein komplekslerinin tanımlanmasında UV, RI ve LALLS detektörlü SEC sistemini kullanmışlardır. GM3 adını verdikleri suda çözünür kompleksin molekül kütlesi-boyut ilişkisini kullanarak konformasyonları hakkında bilgi elde etmişlerdir. Fraksiyon I ve II olarak isimlendirdikleri iki pik ile karakterize olan bu kompleksin dn/dc değeri diferansiyel refraktometre kullanılarak 0,1407 mL/g olarak bulunmuştur. dn/dc değeri kullanılarak çizelge 2.3'teki değerler hesaplanabilmektedir.

Çizelge 2.3 GM3 kompleksinin I ve II numaralı fraksiyonlarının molekül kütlesi ve diğer parametrelerinin deneysel değerleri

Örnek	M _n 10 ⁴ (Da)	M _w 10 ⁴ (Da)	M _w /M _n	R _g (nm)	a
Fraksiyon I	139	355	2.5	29	0.20
Fraksiyon II	2.6	6.3	2.4	40	0.56

Bu sonuçlara göre fraksiyon II daha büyük boyuta ve a değerine sahip olduğu için fraksiyon I'den daha esnek yapıda yumak şeklinde olduğunu öne sürmüşlerdir. Fraksiyon I'in ise çok sayıda dallanmış olduğunu söylemişlerdir. Çünkü molekül ağırlığı çok yüksekken çok sıkı (yoğun) bir konformasyondadır, boyutu ve a değeri çok ufaktır.

3. DENEYSEL KISIM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- WTW pH level 1 pH metre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Precisa XB 220A Hassas Terazî
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvü
- Finnpiette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0,45 µm
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Aşağıda belirtilen bütün kimyasallar satın alındığı gibi kullanılmıştır, herhangi bir ön işleme tabi tutulmamıştır.

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Kodu
Poliakrilik asit, (PAA)	Aldrich	523925
Bovin serum albumin, (BSA)	Sigma	A-4503
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Asetik asit, (CH ₃ COOH)	Riedel de Haën	27225
Sodyum dihidrojen fosfat heptahidrat, (NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O)	Riedel de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430

3.2 BSA ve PAA Çözeltilerinin Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisinde İncelenmesi

10 mg BSA tartılıp 5 mL PBS’de (pH 7,0) çözülüp 0,45 µm enjektör filtresinden süzülerek cihaza verilmiştir. 25 °C’de, 1.0 mL/dak akış hızında, 100 µL enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV (280 nm’de), kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozimetre detektörleri kullanılarak çalışılmıştır. Mobil faz olarak PBS (pH 7,0) kullanılmıştır.

Stok PAA’dan son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde çalışma yapılacak pH’a uygun tamponla seyreltilmiştir. pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu, pH 6,0 ve 7,0 için PBS kullanılmıştır. Çözeltiler 0,45 µm enjektör filtresinden süzülerek cihaza verilmiştir. 25 °C’de, 1.0 mL/dak akış hızında, 100 µL enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV (280 nm’de), kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozimetre detektörleri kullanılarak çalışılmıştır. Her pH değerindeki moleküler eleme kromatografisi ölçümleri için o pH’daki çözeltinin hazırlanmasında kullanılan tampon, mobil faz olarak kullanılmıştır.

3.3 pH 5,0’de PAA’nın dn/dc Değerinin Hesaplanması

Son konsantrasyonları 0,57; 1,14; 1,71 ve 2,28 mg/mL olacak şekilde stok PAA çözeltisi pH 5,0’e ayarlanmış asetat tamponu ile seyreltilmiştir. Her bir PAA çözeltisi 0,45 µm enjektör filtresinden süzülerek dört detektörlü SEC cihazına verilmiştir. 25 °C’de, 1.0 mL/dak akış hızında, 100 µL enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozimetre detektörleri kullanılarak çalışılmıştır. Alınan kromatogramlardaki PAA piklerinin alanıyla çözeltilerin konsantrasyonu arasında çizilen grafikten elde edilen doğrunun eğimi eşitlik 3.1’e yerleştirilerek PAA’nın pH 5,0’teki dn/dc değeri hesaplanmıştır.

$$Eğim = \frac{\Delta RI_{Alan}}{\Delta C} = \frac{K_{RI}}{n_0} \cdot (dn/dc) \cdot V_{enj} \quad (3.1)$$

3.4 BSA/PAA Karışımları

Hesaplamalardaki gibi 19 farklı oranda ve 5 farklı pH’da (4,0; 4,3; 5,0; 6,0; 7,0) olmak üzere 95 tane çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler BSA ve PAA’nın fiziksel karışımlarıdır.

3.4.1 Kullanılan Çözeltiler

a) 0.01 mol/L'lik PBS Tamponu (pH=7,0; pH=6,0)

1,1998g NaH_2PO_4 ($M_w=119,98$ g/mol) tartılarak 500 mL ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 2,6807 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268,07$ g/mol) tartılarak yine 500 mL ultra saf suda çözülür. Bu iki çözeltiden NaH_2PO_4 çözeltisi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin üzerine eklenir. Bu karışıma 8,766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH ayarlanır.

b) Asetat Tamponu (pH 5,0; pH 4,0; pH 4,3)

5,72 mL asetik asit, ultra saf su ile 2 L'ye tamamlanır. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştıktan sonra 17,53 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1 M NaOH ile pH ayarlanır.

3.4.2 Karışımların Hazırlanışı

PAA stok çözeltisi 3 mg/mL olacak şekilde ultra saf suda hazırlandı. Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olduğuna göre her bir çözelti için (19 adet farklı $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranında) hazırlanan stoktan 10 mL çözelti için 3335 μL PAA çekilerek pH 7'lik tamponda iyice karışması sağlandı. Gerekli miktarda BSA tartılarak pH 7 tamponunda çözünmesi sağlanarak BSA stoğu hazırlandı. Daha sonra PAA çözeltilerinin pH'ı kontrol edilerek (pH 7 de olması gerekli) hesaba göre gerekli miktarlardaki BSA stoktan çekilerek karışmakta olan çözeltiye yavaş yavaş ilave edildi. Çözeltinin istenilen pH'da olup olmadığı kontrol edildi. Yaklaşık 30 dak. kadar karıştırıldı. Bütün karıştırma işlemleri manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her pH değeri için aynı aşamalar gerçekleştirildi ve pH 4,0-4,3-5,0'da hazırlanan karışımlarda asetat tamponu kullanıldı.

3.4.3 Hesaplamalar

PAA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı BSA konsantrasyonlarına 19 farklı oranda ($n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=0,05-50$) kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hesaplamalar,

$$\frac{n_{\text{BSA}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{C_{\text{BSA}} M_{\text{PAA}}}{C_{\text{PAA}} M_{\text{BSA}}} \quad (3.1)$$

eşitliği kullanılarak yapılmıştır.

PAA'nın çözeltideki konsantrasyonu 1 mg/mL'dir.

$M_{PAA}=100.000$ Da

$M_{BSA}=66.000$ Da

- 1) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,05$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,033$ mg/mL
- 2) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,1$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,066$ mg/mL
- 3) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,25$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,165$ mg/mL
- 4) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,4$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,264$ mg/mL
- 5) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,5$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,33$ mg/mL
- 6) $n_{BSA}/n_{PAA}=0,75$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,495$ mg/mL
- 7) $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=0,66$ mg/mL
- 8) $n_{BSA}/n_{PAA}=2$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=1,32$ mg/mL
- 9) $n_{BSA}/n_{PAA}=3$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=1,98$ mg/mL
- 10) $n_{BSA}/n_{PAA}=5$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=3,3$ mg/mL
- 11) $n_{BSA}/n_{PAA}=7,5$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=4,95$ mg/mL
- 12) $n_{BSA}/n_{PAA}=10$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=6,6$ mg/mL
- 13) $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=9,9$ mg/mL
- 14) $n_{BSA}/n_{PAA}=20$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=13,2$ mg/mL
- 15) $n_{BSA}/n_{PAA}=25$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=16,5$ mg/mL
- 16) $n_{BSA}/n_{PAA}=30$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=19,8$ mg/mL
- 17) $n_{BSA}/n_{PAA}=35$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=23,1$ mg/mL
- 18) $n_{BSA}/n_{PAA}=40$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=26,4$ mg/mL
- 19) $n_{BSA}/n_{PAA}=50$ olan 10 mL BSA-PAA Çözeltisi, $c_{BSA}=33$ mg/mL

3.5 BSA-PAA Karışımlarının Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisinde İncelenmesi

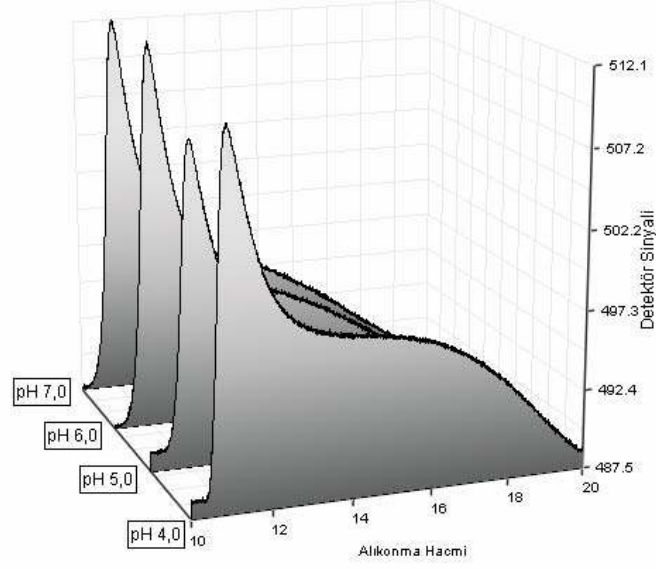
Kompleks çözeltileri santrifuj edildikten sonra 0,45 μ m'lik enjektör filtresiyle süzülerek bu cihaza verilmiştir. 25 °C'de, 1.0 mL/dak akış hızında, 100 μ L enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV (280 nm'de), kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozimetre detektörleri kullanılarak çalışılmıştır. Her pH'daki moleküler eleme kromatografisi ölçümleri için o pH'daki çözeltinin hazırlanmasında kullanılan tampon, mobil faz olarak kullanılmıştır.

Dört detektörlü SEC sistemi BSA proteini kullanılarak kalibre edilmiştir. 25 °C'de, 1,0 mL/dak akış hızında, 100 μ L enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV

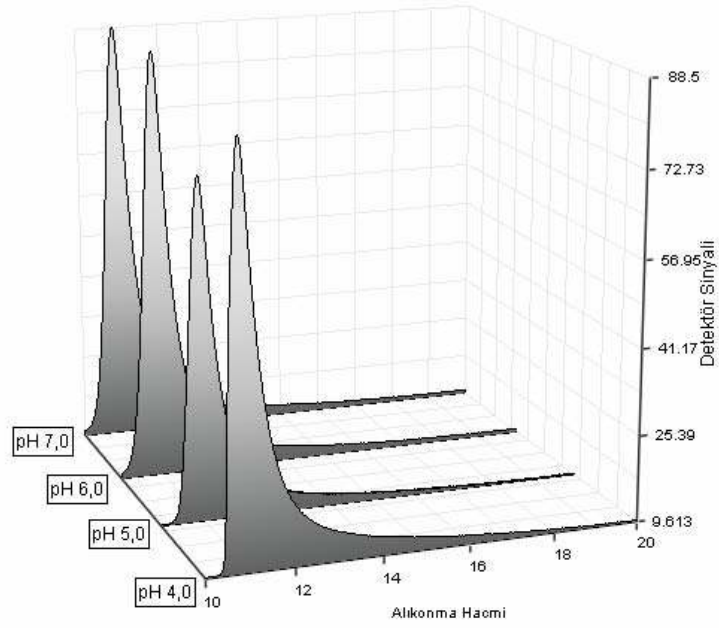
(280 nm'de), kırılma indisi, ışık saçılması ve viskozimetre detektörleri kullanılarak BSA çözeltisinin kromatogramı alınmış ve $dn/dc=0,185$ ile $M_w=66200$ Da değerleri metot dosyasına kaydedilerek kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. BSA'nın monomer piki bu işlem için kullanılmıştır.

pH 5,0'te analizi yapılan BSA-PAA komplekslerinin piklerinin alanları 10,00-15,00 dakikalar arasındaki bölgeler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sayede serbest BSA pikinden kaynaklanabilecek hatalar engellenmiştir. Kompleks piki içindeki BSA ve PAA miktarları net olarak bilinmediğinden dn/dc değerleri kullanılarak hesap gerçekleştirilmiştir. pH 5,0 için PAA'nın dn/dc değeri eşitlik 3.1 kullanılarak 0,202 olduğu bulunmuş; BSA'nın dn/dc değeri ise literatürden (Theisen vd., 1999) 0,185 olduğu bulunmuştur. Kopolimerlerin dn/dc değerleri bileşenlerin oranlarına bağlı olarak değişmektedir. BSA-PAA komplekslerinin kopolimer olduğu varsayılarak komplekslerin dn/dc değerleri bulunmuştur. Bileşenlerin dn/dc değerleri birbirlerine çok yakın olduğundan ortalama bir dn/dc değeri, 0,193, analiz yapılırken kullanılmıştır.

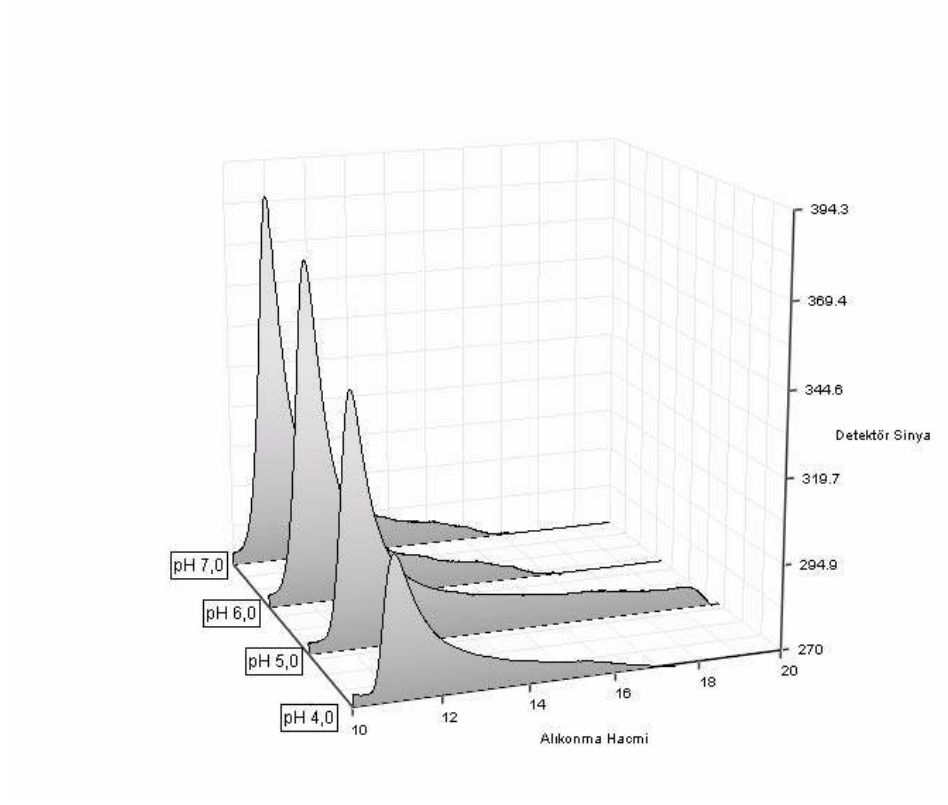
4. DENEY SONUÇLARI



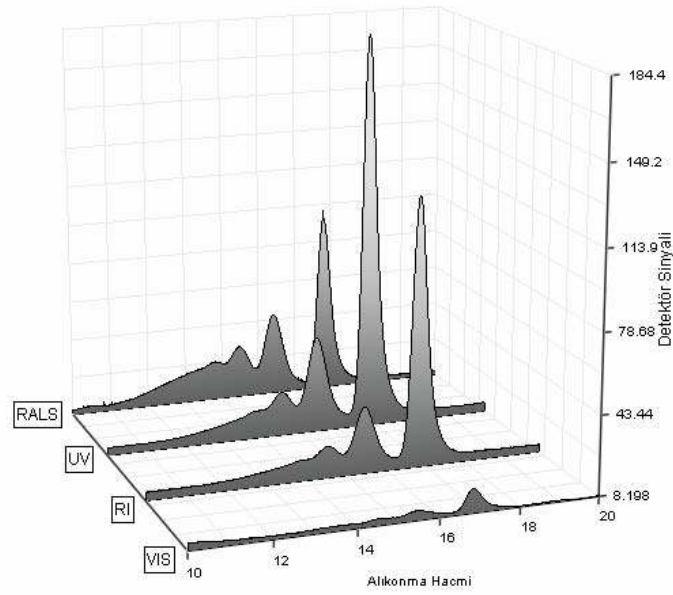
Şekil 4.1. Farklı pH’larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin (C=1 mg/mL) RI kromatogramları.



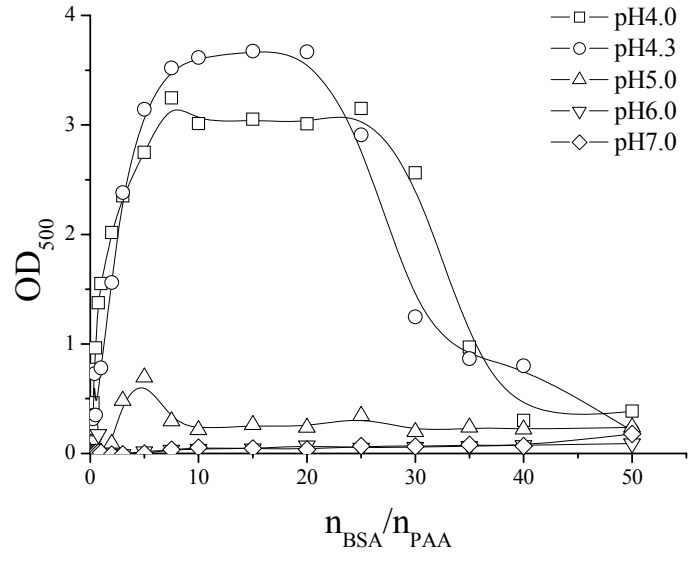
Şekil 4.2. Farklı pH’larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin (C=1 mg/mL) RALS kromatogramları.



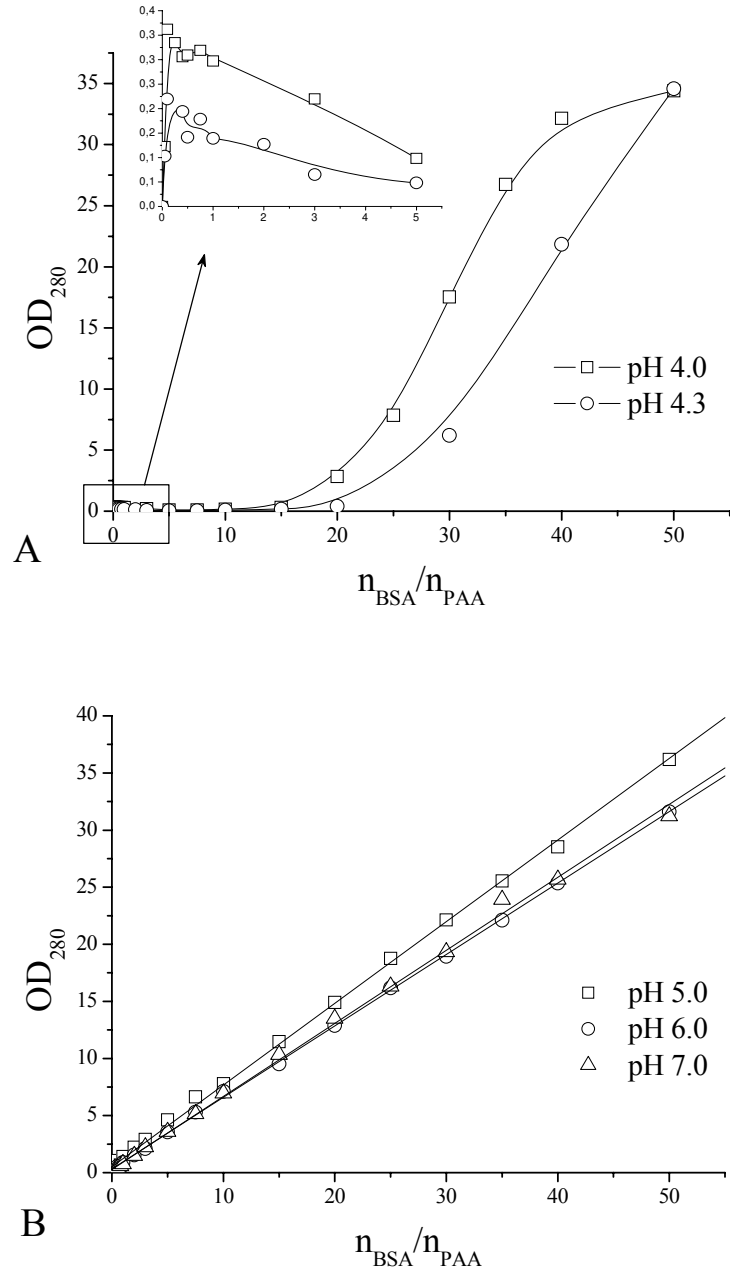
Şekil 4.3. Farklı pH'larda hazırlanmış PAA çözeltilerinin ($C=1$ mg/mL) VIS kromatogramları.



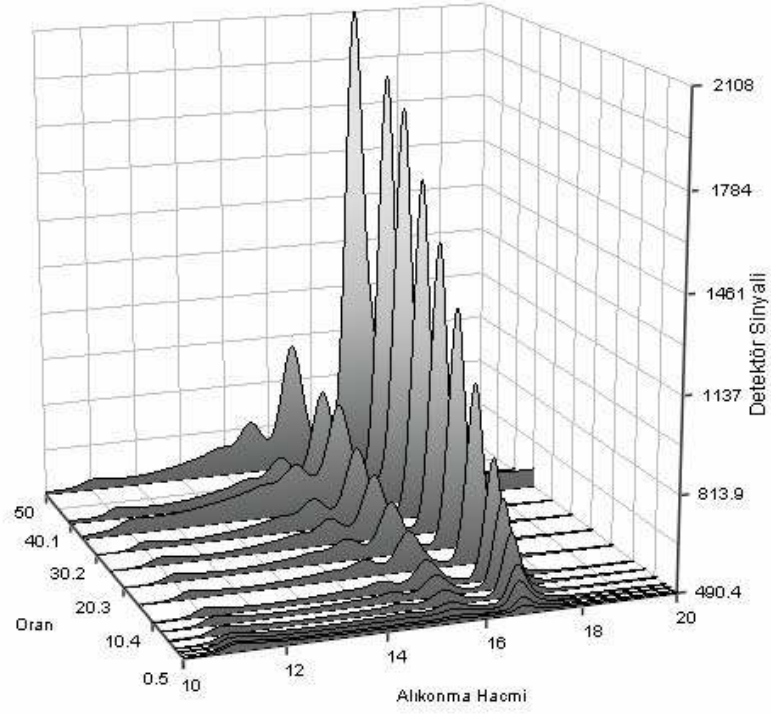
Şekil 4.4. pH 7,0'de hazırlanmış BSA çözeltisinin ($C=2,0$ mg/mL) VIS, RI, UV ve RALS kromatogramları.



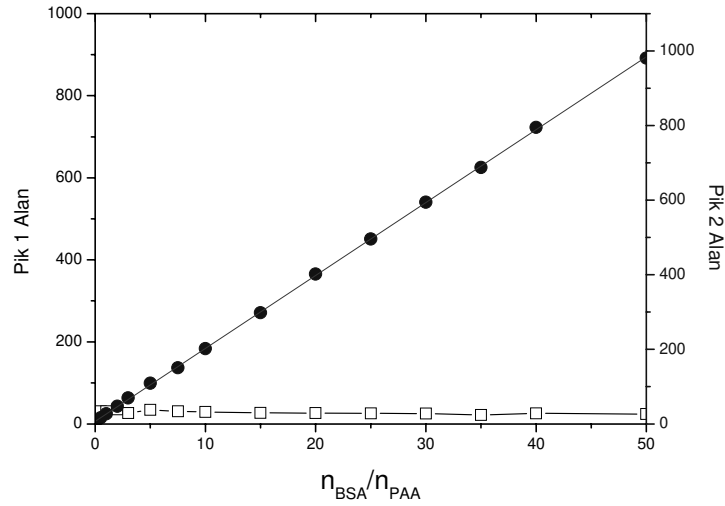
Şekil 4.5. BSA-PAA karışımlarının farklı pH'lardaki orana bağlı optik densite (OD₅₀₀) grafiği (Çimen, 2006).



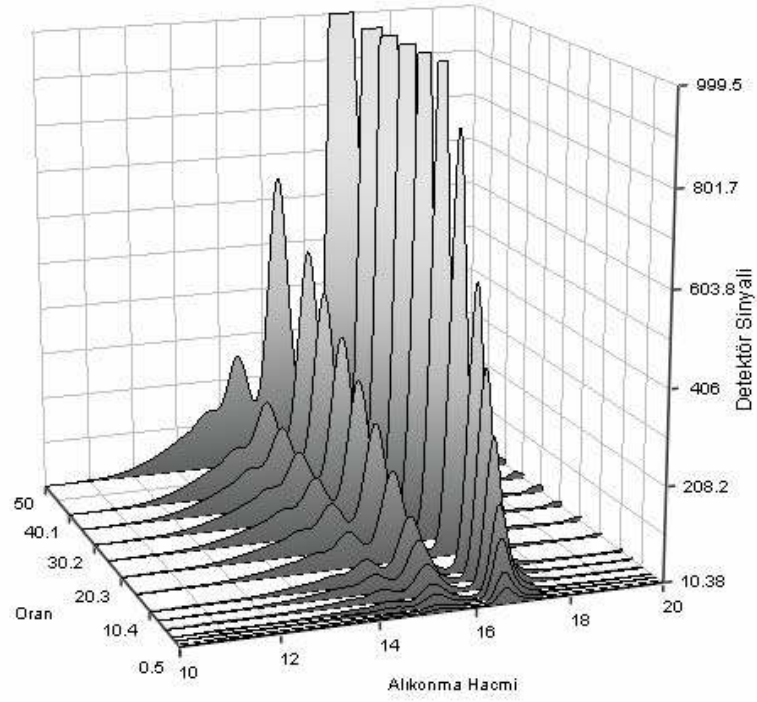
Şekil 4.6. Farklı pH'lardaki (A-pH 4 ve 4,3; B-pH 5, 6 ve 7) BSA-PAA karışımlarının matriks çözeltilerinin orana bağlı optik densite (OD₂₈₀) grafikleri. (Çimen, 2006)



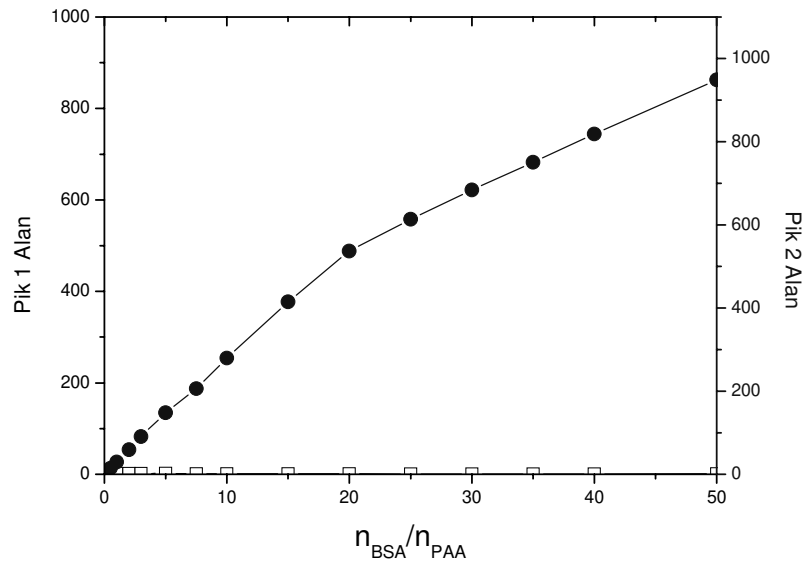
Şekil 4.7. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



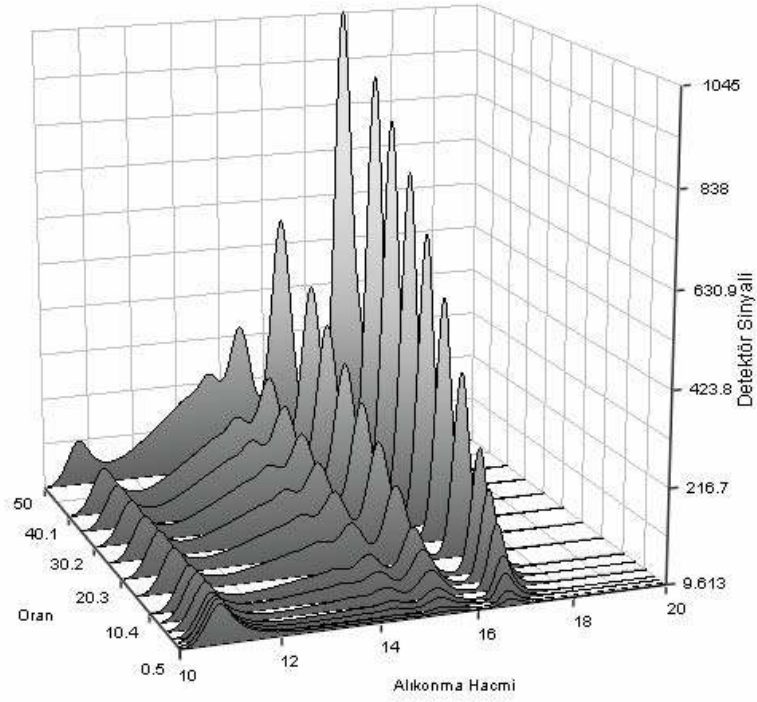
Şekil 4.8. pH 7’de RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



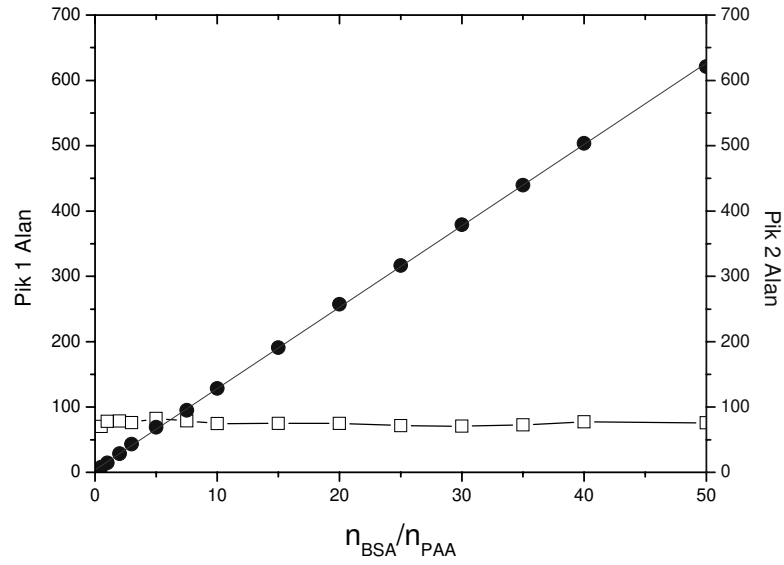
Şekil 4.9. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



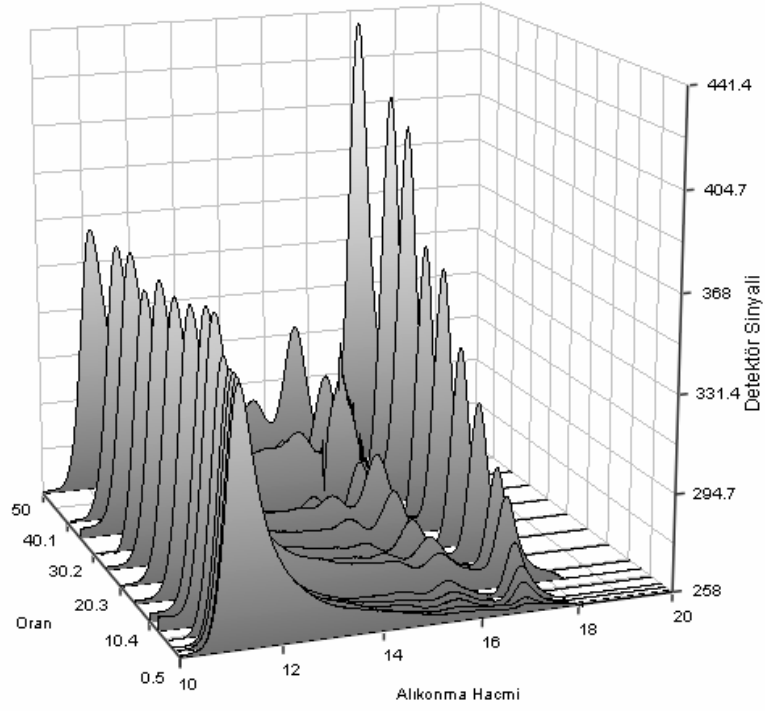
Şekil 4.10. pH 7’de UV kromatogramlarındaki (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



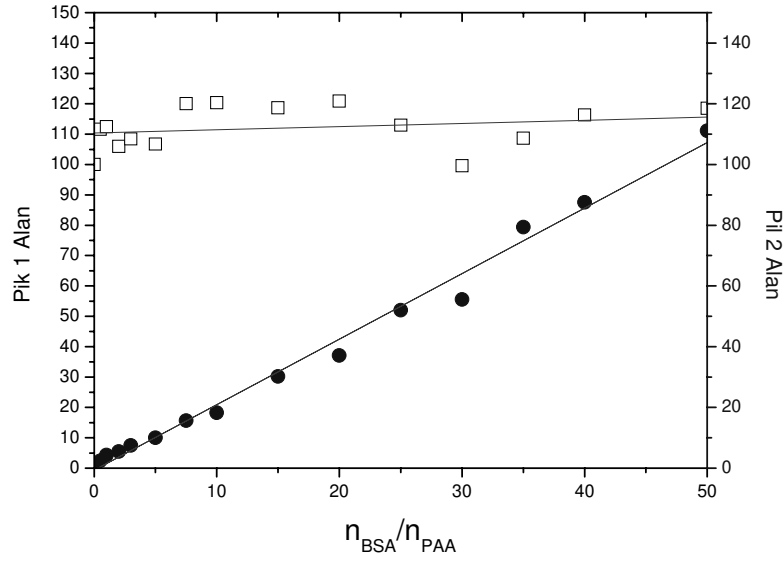
Şekil 4.11. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



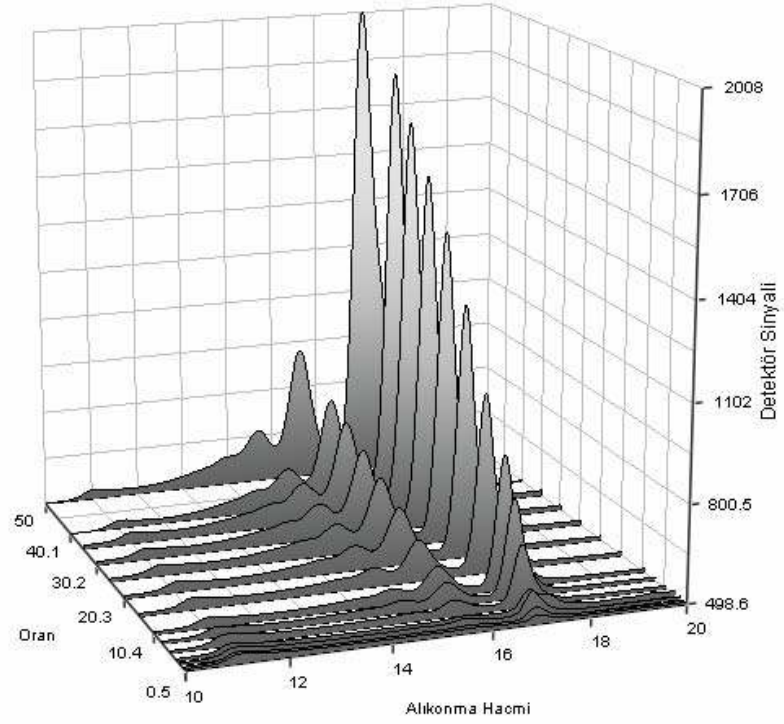
Şekil 4.12. pH 7’de RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



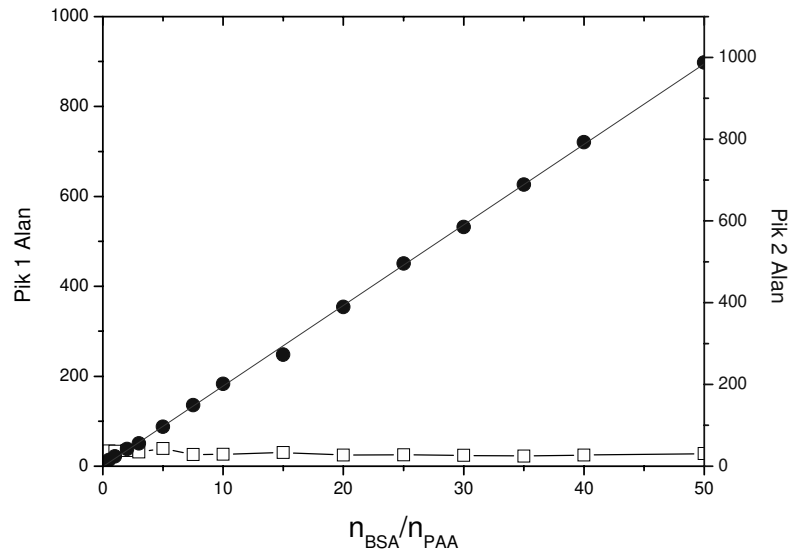
Şekil 4.13. pH 7’de hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



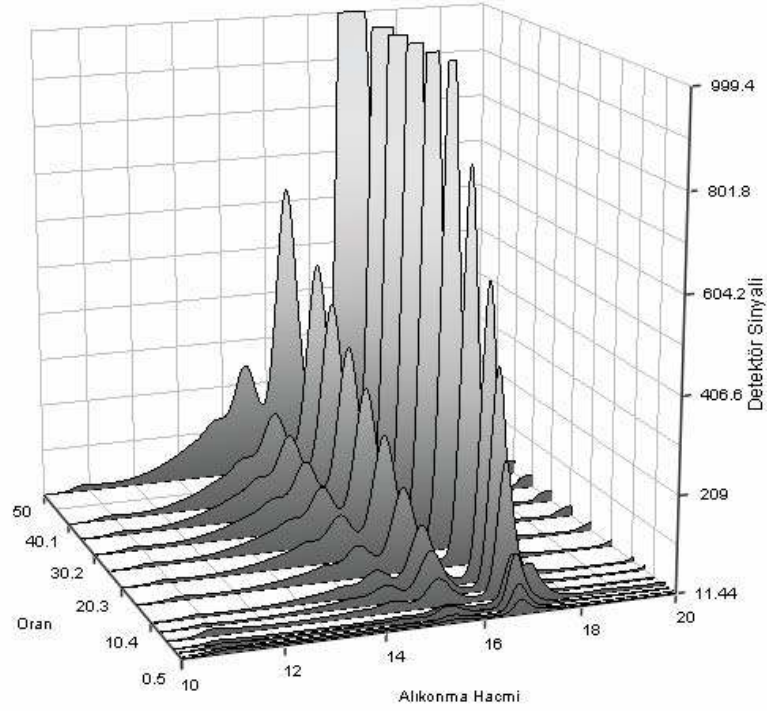
Şekil 4.14. pH 7’de VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



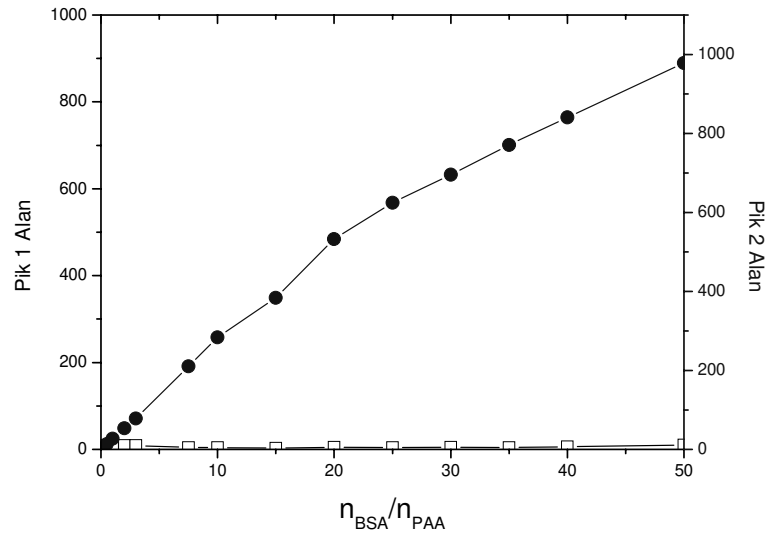
Şekil 4.15. pH 6'da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



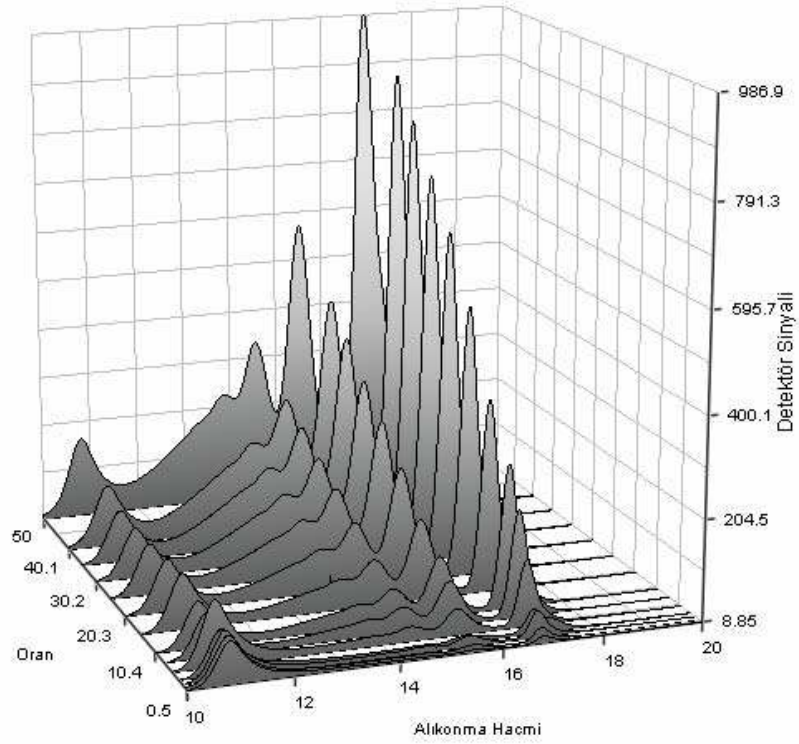
Şekil 4.16. pH 6'da RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



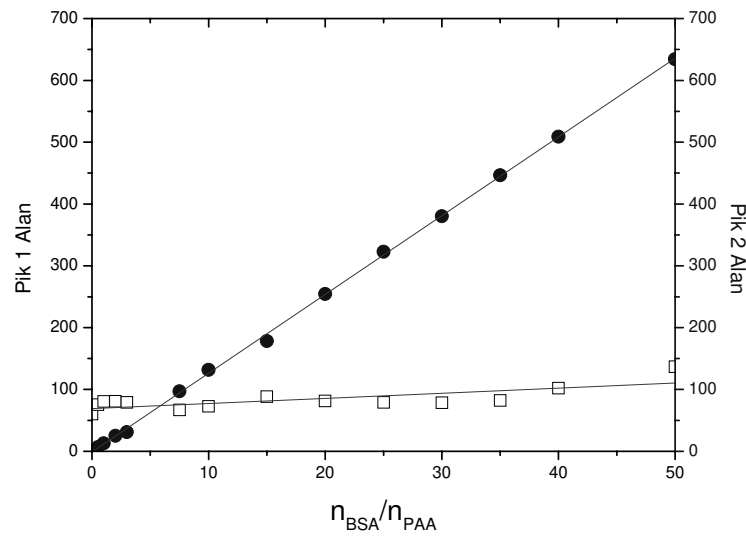
Şekil 4.17. pH 6’da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değışken) karışımının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağılı değışimi



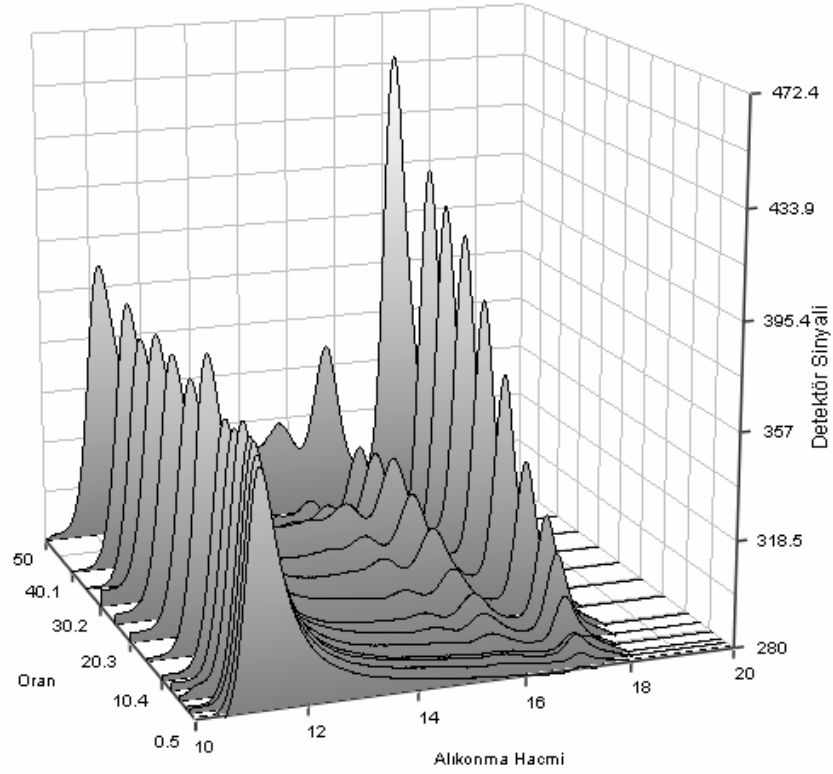
Şekil 4.18. pH 6’da UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağılı değışimi



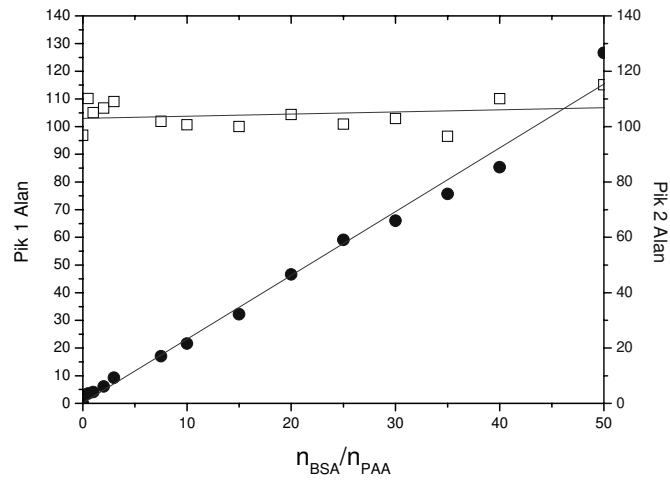
Şekil 4.19. pH 6'da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



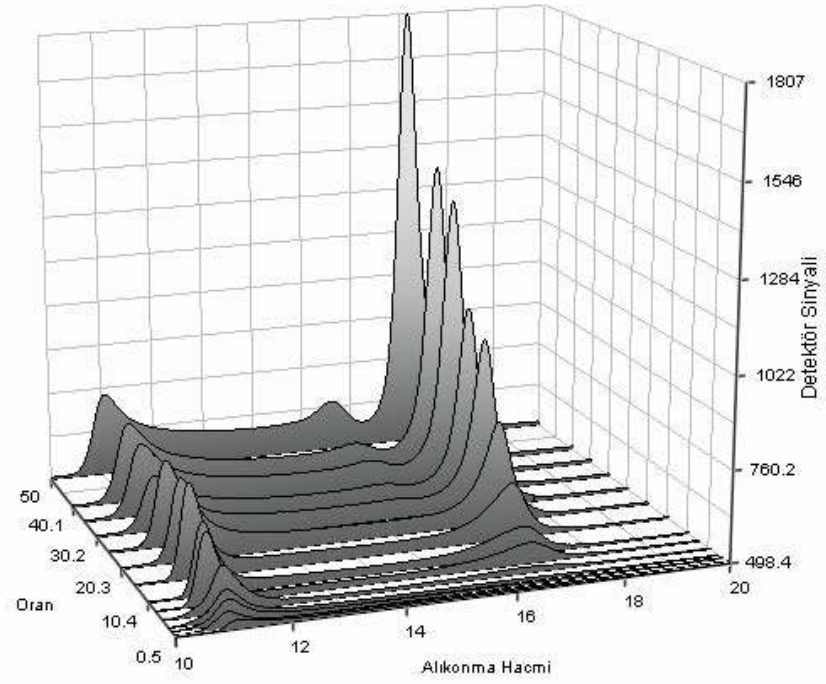
Şekil 4.20. pH 6'da RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



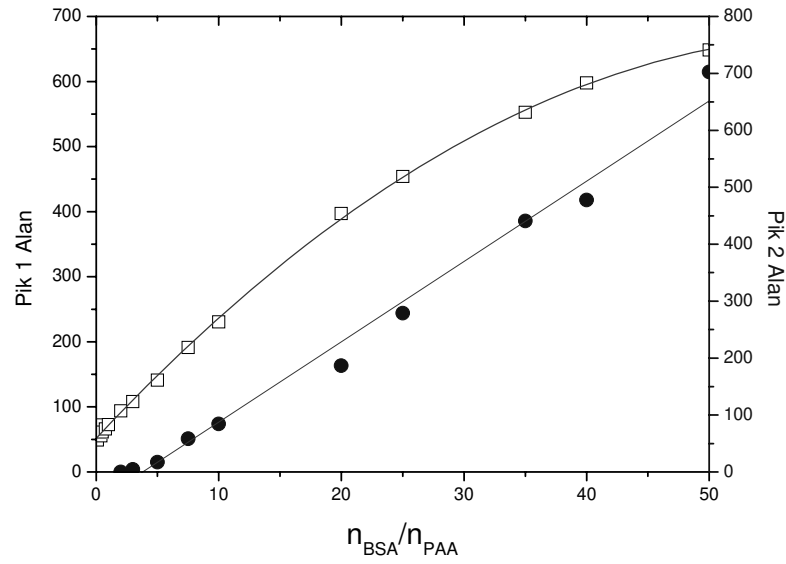
Şekil 4.21. pH 6'da hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



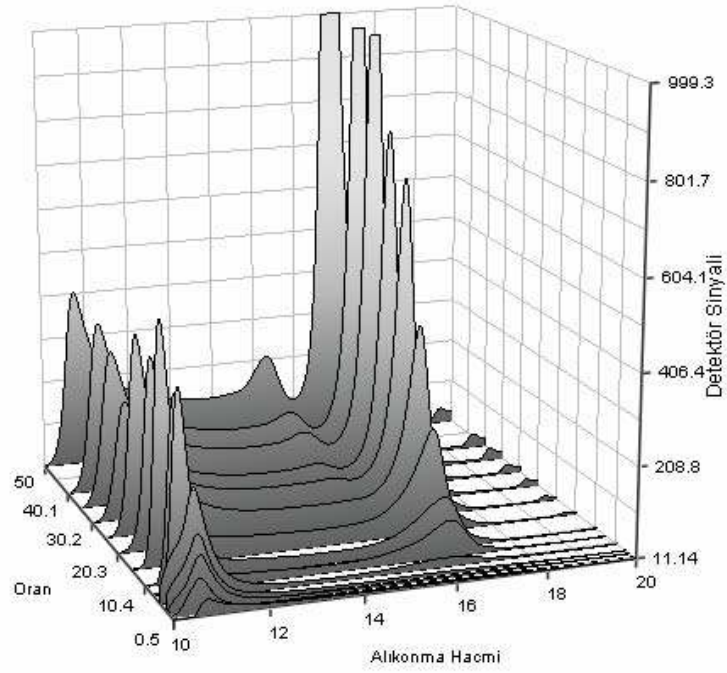
Şekil 4.22. pH 6'da VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - $\square$) ve BSA monomerinin (pik 2 - $\bullet$) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



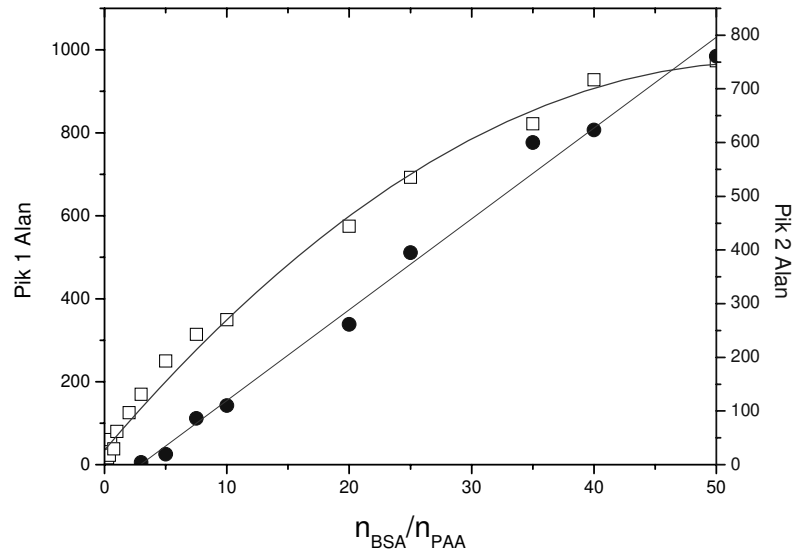
Şekil 4.23. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



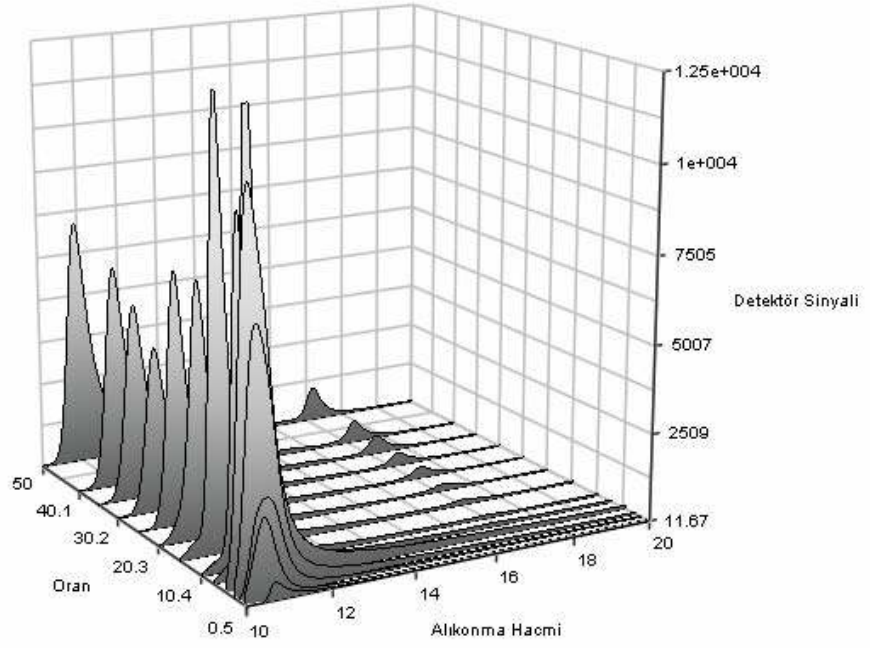
Şekil 4.24. pH 5'te RI kromatogramlarındaki PAA(pik 1 - $\square$) ve BSA monomerinin (pik 2 - $\bullet$) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



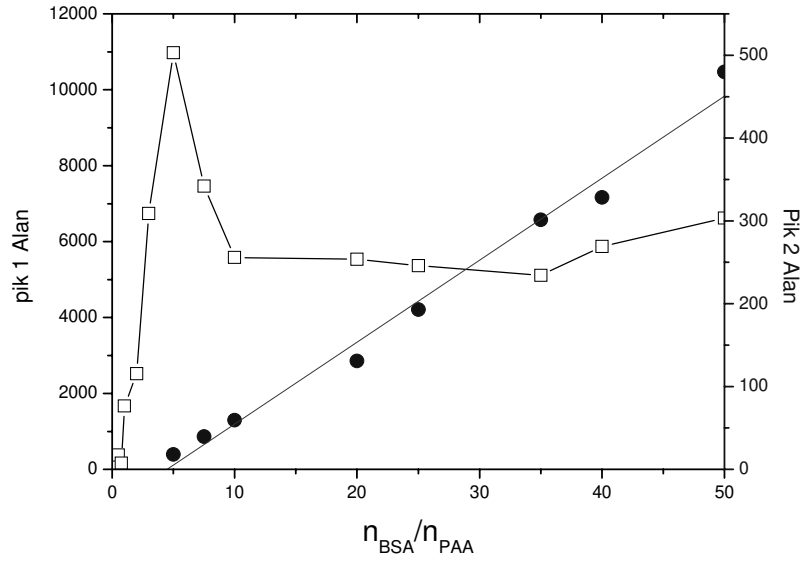
Şekil 4.25. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



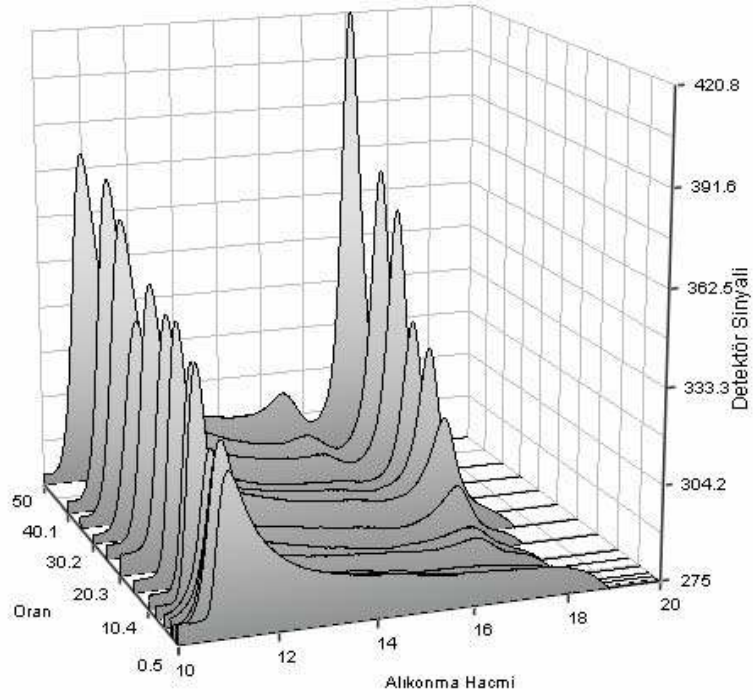
Şekil 4.26. pH 5'te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



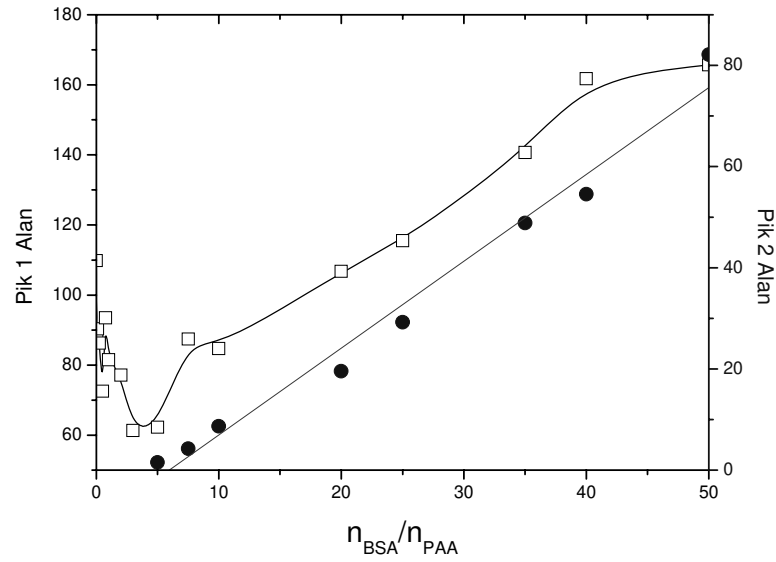
Şekil 4.27. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



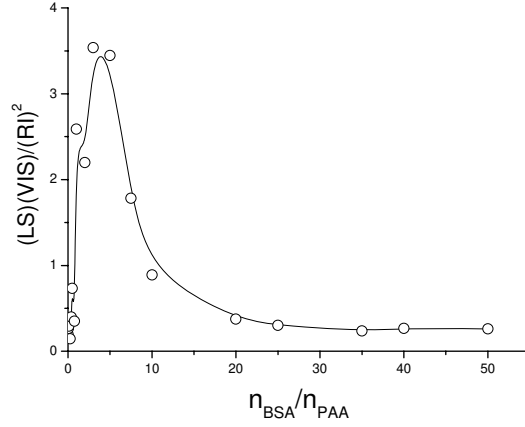
Şekil 4.28. pH 5'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



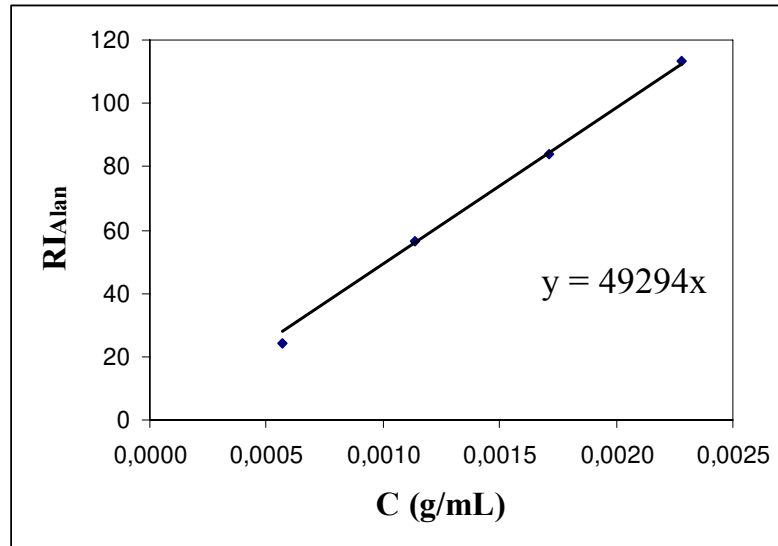
Şekil 4.29. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



Şekil 4.30. pH 5'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



Şekil 4.31. $(LS)(VIS)/(RI)^2$ değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} orana bağlı olarak değişimi.



Şekil 4.32. PAA çözeltilerinden elde edilen RI kromatogramlarındaki pikin konsantrasyona göre değişimi

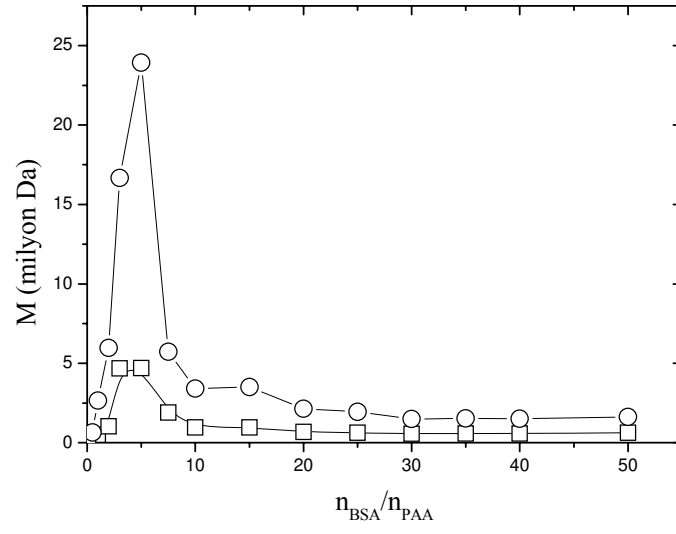
Grafikten elde edilen ve orijinden geçen doğrunun eğimi 49294'tür. Buna göre PAA'nın pH 5,0'deki dn/dc değeri

$$49294 = \frac{3249550}{1,3333} \cdot (dn/dc) \cdot 0,1 \Rightarrow (dn/dc) = 0,2023 \text{ mL/g}$$

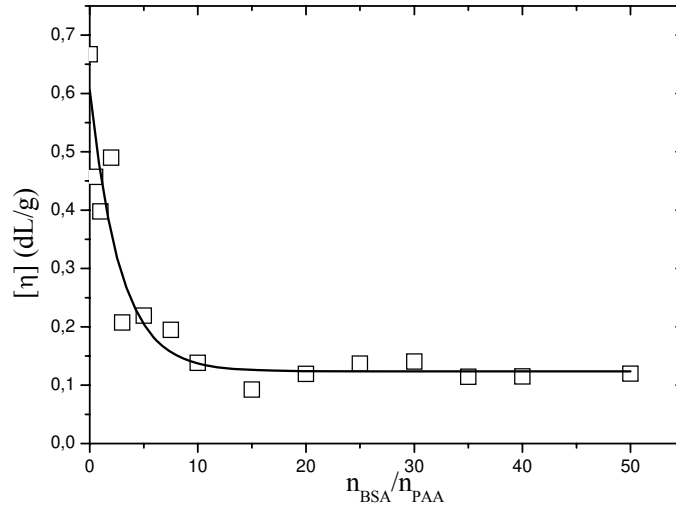
olur.

Çizelge 4.1 pH 5'te PAA, BSA ve BSA-PAA komplekslerine ait dört detektörlü SEC ile elde edilmiş değerler.

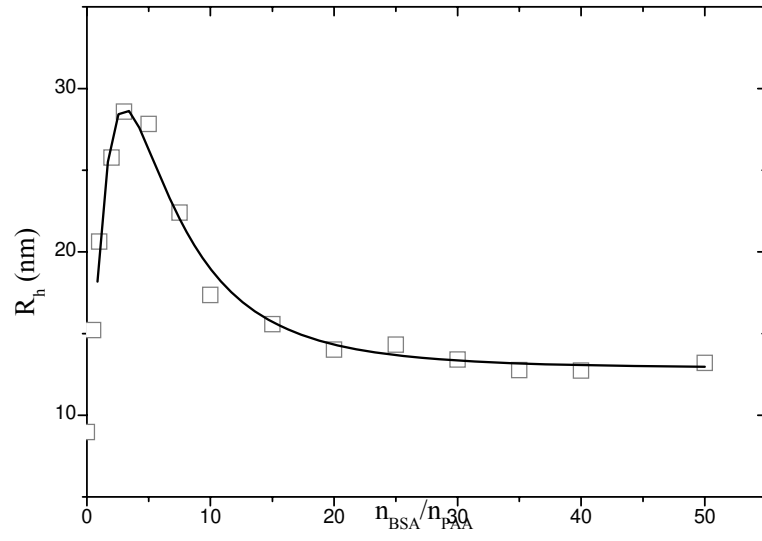
n_{BSA}/n_{PAA}	M_n (Da)	M_w (Da)	M_w/M_n	$[\eta]$ (dl/g)	R_h (nm)	a (M-H Sabiti)
PAA	24.287	99.824	4,11	0,6671	8,967	0,568
BSA (Monomer)	66.359	66.403	1,001	0,0325	3,238	0
0,5	286.751	639.690	2,231	0,4572	15,207	0,566
1,0	504.475	2.658.000	5,268	0,398	20,627	0,551
2,0	1.035.000	5.968.000	5,764	0,4897	25,779	0,081
3,0	4.690.000	16.670.000	3,554	0,2073	28,581	-0,248
5,0	4.706.000	23.930.000	5,084	0,2191	27,825	-0,973
7,5	1.896.000	5.729.000	3,022	0,1948	22,397	-0,325
10	972.039	3.410.000	3,508	0,138	17,367	0,067
15	961.778	3.507.000	3,646	0,0925	15,576	0,788
20	672.823	2.147.000	3,191	0,1193	14,019	0,01
25	629.311	1.952.000	3,102	0,1368	14,327	0,048
30	563.852	1.489.000	2,642	0,1403	13,417	0,124
35	575.973	1.524.000	2,645	0,1144	12,763	0,369
40	581.495	1.507.000	2,591	0,115	12,738	0,295
50	624.782	1.628.000	2,606	0,1199	13,212	0,285



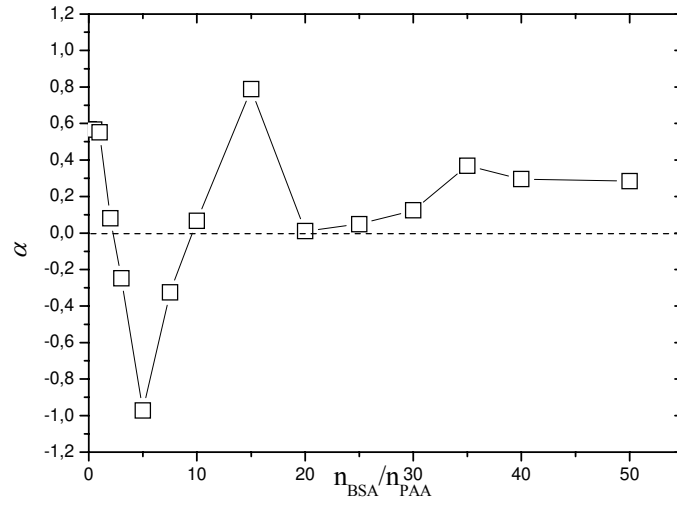
Şekil 4.33. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin M_w ($\circ$) ve M_n ($\square$) değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.



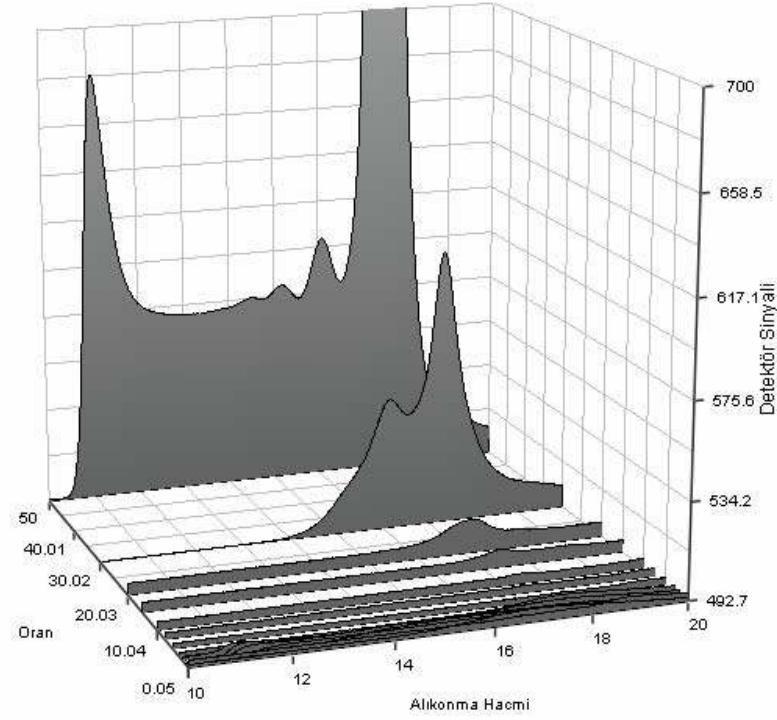
Şekil 4.34. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin intrinsik viskozite değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.



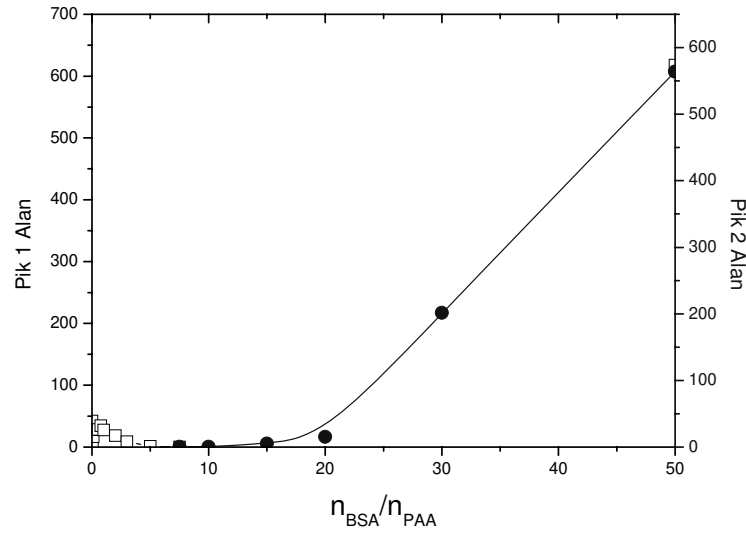
Şekil 4.35. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin boyutlarının (hidrodinamik yarıçaplarının) n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.



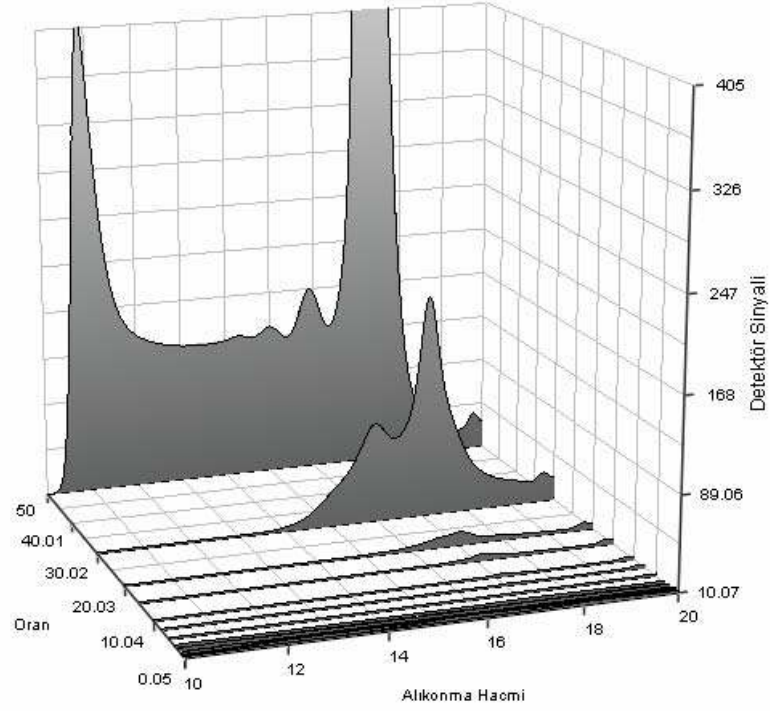
Şekil 4.36. pH 5'te hazırlanmış BSA-PAA komplekslerinin Mark-Houwink-Sakurada α üstelinin n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı değişimi.



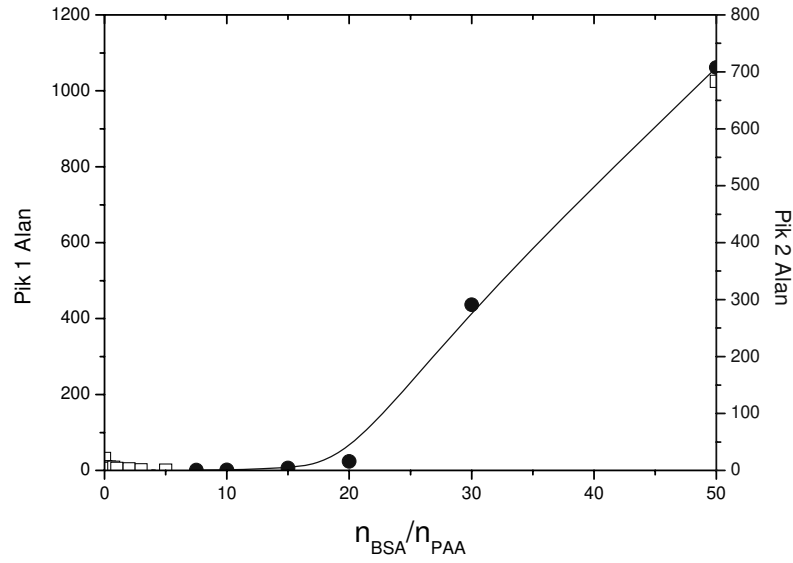
Şekil 4.37. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



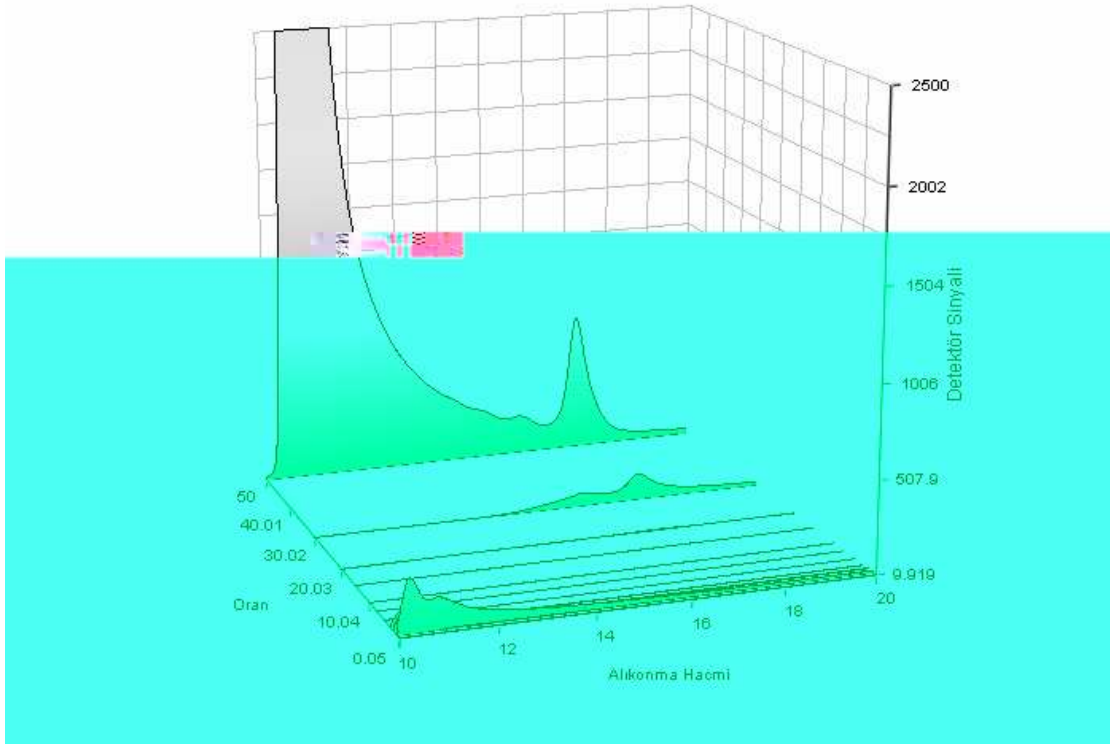
Şekil 4.38. pH 4,3'te RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



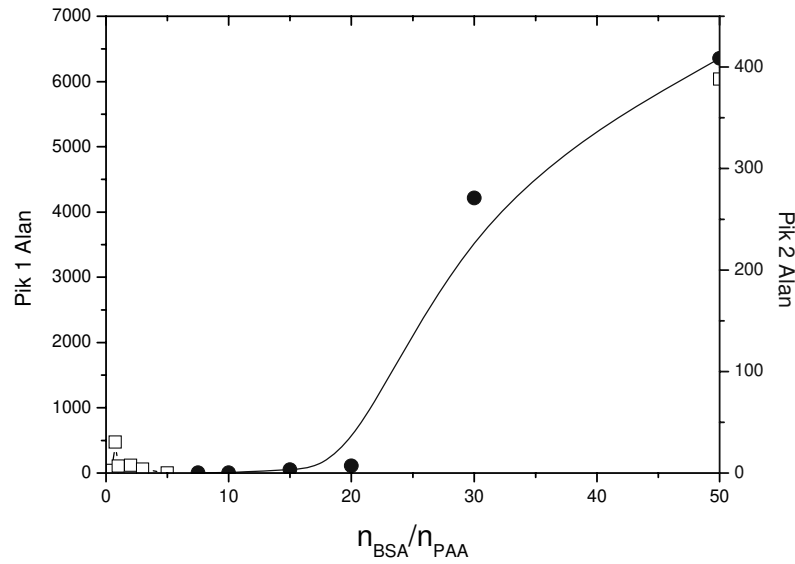
Şekil 4.39. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



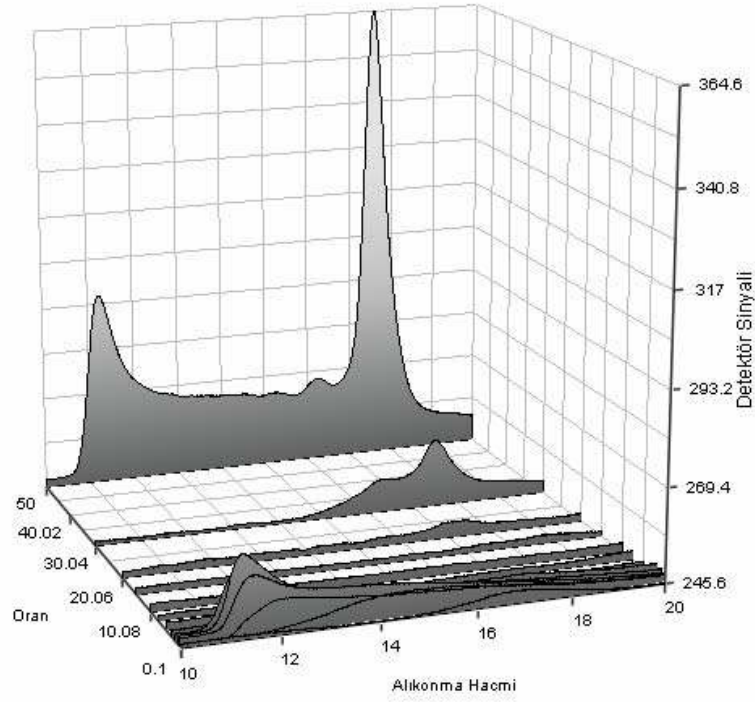
Şekil 4.40. pH 4,3'te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



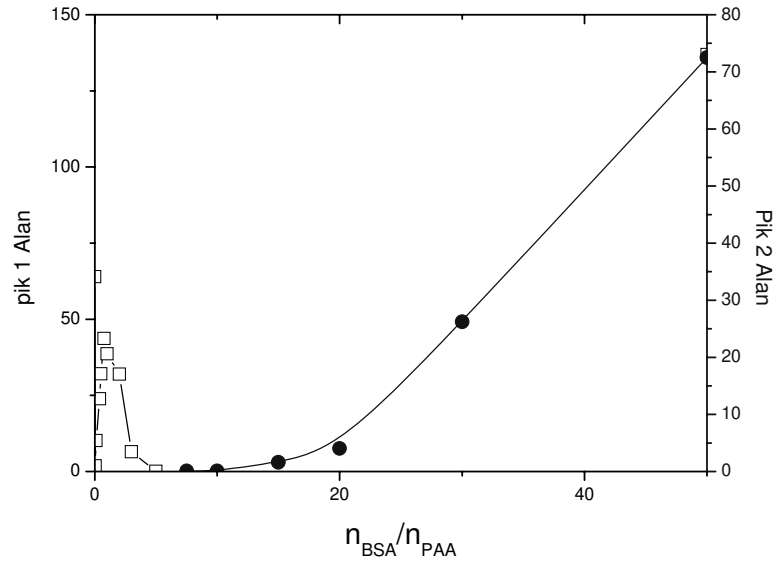
Şekil 4.41. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



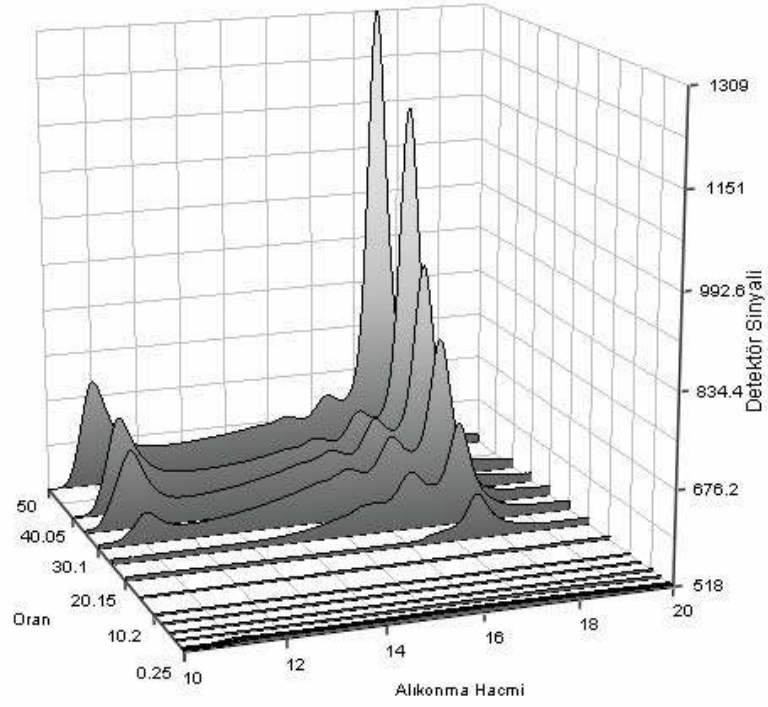
Şekil 4.42. pH 4,3'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



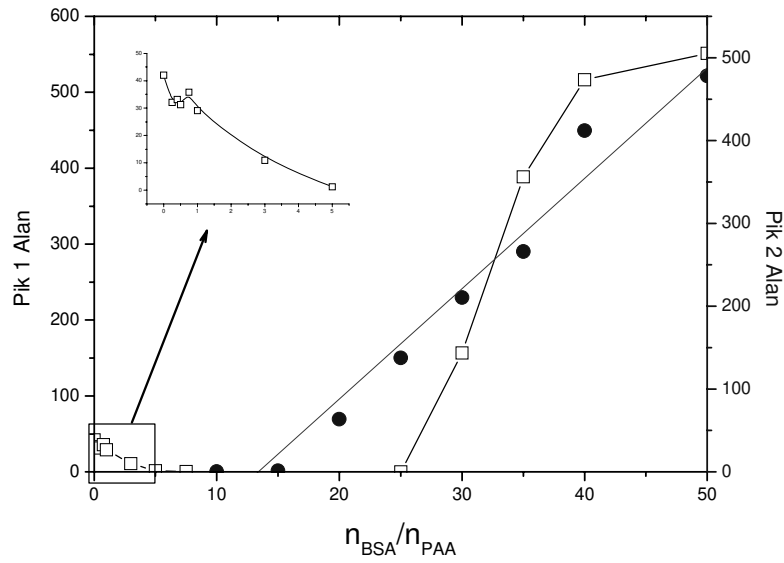
Şekil 4.43. pH 4,3'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



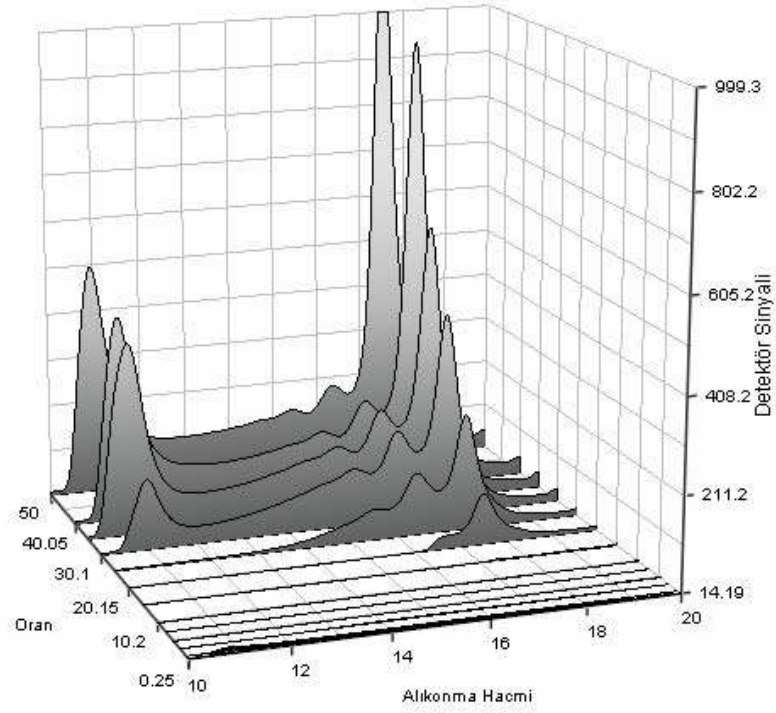
Şekil 4.44. pH 4,3'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



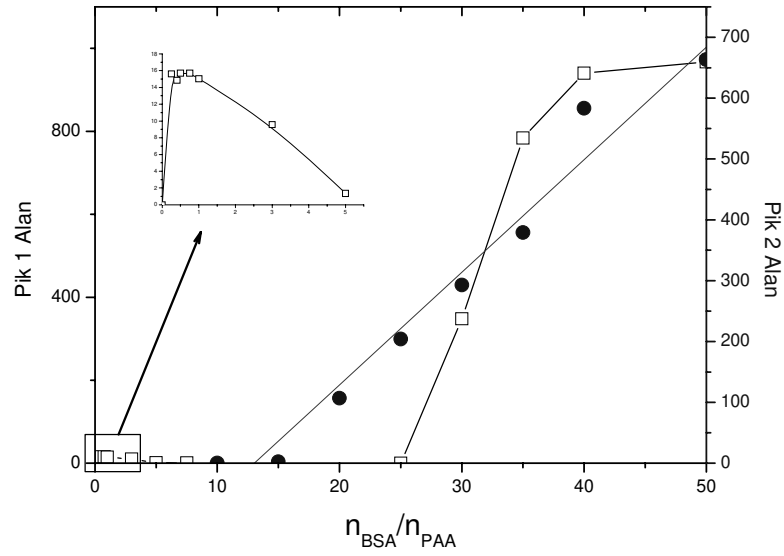
Şekil 4.45. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RI detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



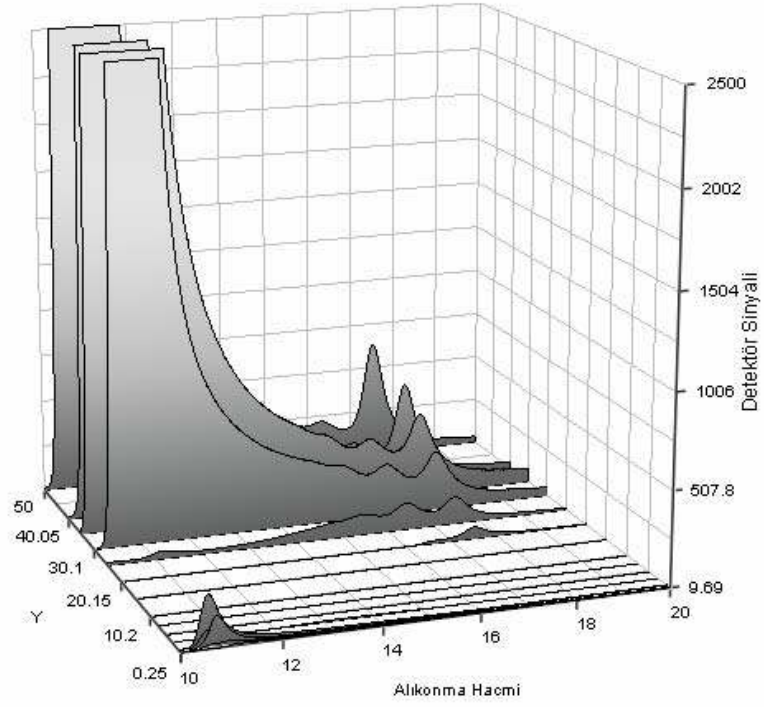
Şekil 4.46. pH 4'te RI kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - $\square$) ve BSA monomerinin (pik 2 - $\bullet$) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



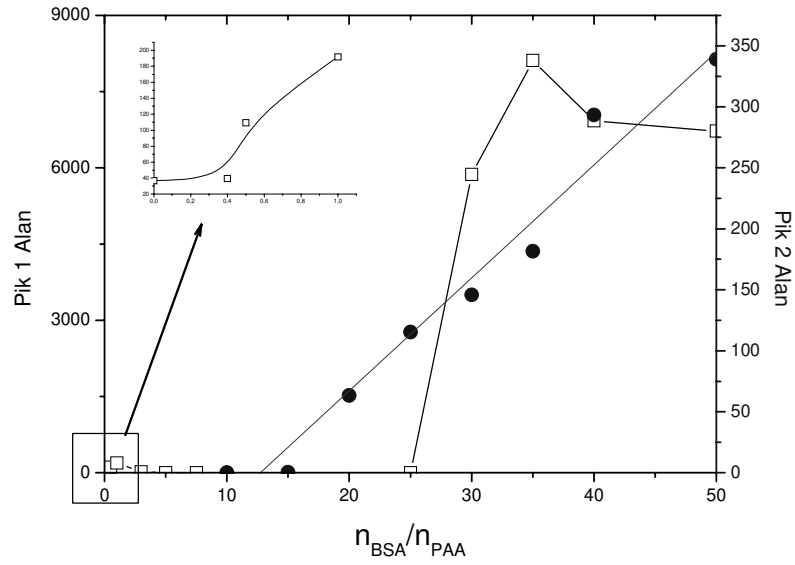
Şekil 4.47. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının UV detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



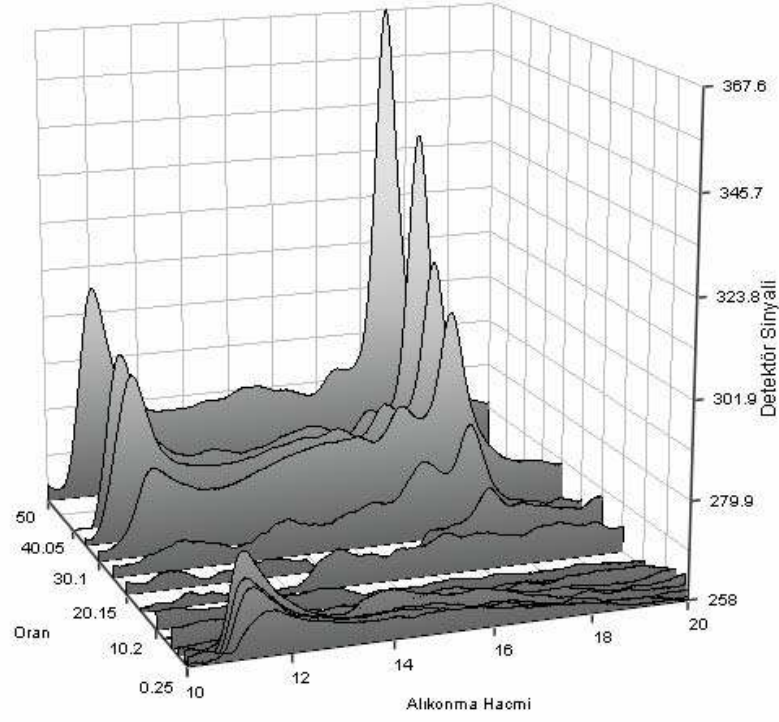
Şekil 4.48. pH 4'te UV kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



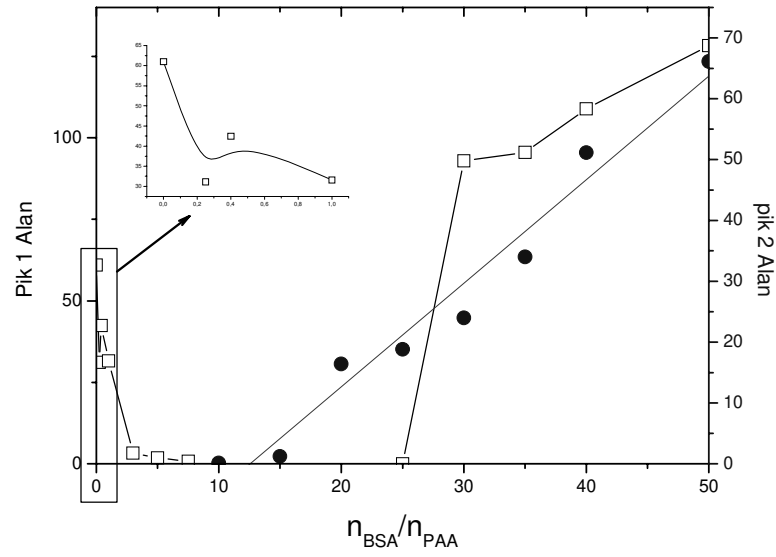
Şekil 4.49. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının RALS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



Şekil 4.50. pH 4'te RALS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



Şekil 4.51. pH 4'te hazırlanmış BSA-PAA (PAA sabit, BSA değişken) karışımlarının VIS detektöründen elde edilmiş kromatogramlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi



Şekil 4.52. pH 4'te VIS kromatogramlarındaki PAA (pik 1 - □) ve BSA monomerinin (pik 2 - ●) pik alanlarının orana (n_{BSA}/n_{PAA}) bağlı değişimi

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

BSA-PAA'nın suda çözünebilen karışımları spektrofotometrik (Çimen, 2006) ve SEC-UV/LS/RI/IV metotları ile incelenmiştir. Bu metotlar polianyon-protein karışımı bileşenlerinin düşük derişimlerinde (bağıl olarak) fraksiyon bileşiminin incelenmesine olanak sağlayan farklı deneysel koşullardır. Bizim amacımız farklı polimer/protein oranlarında BSA-PAA karışımlarının moleküler özelliklerindeki bağıl değışiklikleri incelemek ve dört detektörlü SEC teknolojisi uygulamalarını araştırmaktır.

Poliakrilik asidin farklı pH'lardaki RI, RALS ve VIS kromatogramları şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te gözükmemektedir. UV detektörü BSA'nın maksimum absorbans yaptığı 280 nm'ye ayarlı olduğu için ve PAA da 280 nm'de absorbans yapmadığı için PAA'nın UV detektöründe kromatogramları elde edilememiştir. RI ve RALS detektörlerinden alınan kromatogramlarda piklerin alıkonma hacimleri ve büyüklükleri arasında belirgin fark bulunmamakla beraber VIS kromatogramlarında pH değeri düştükçe PAA pikinin alanının azaldığı görölmektedir. VIS detektöründen elde edilen değerler hem konsantrasyona hem de viskoziteye bağılıdır (Eşitlik 2.16). Dört pH'daki kromatogramlarda örnek konsantrasyonu sabit tutulduğu için pik alanlarındaki bu değışim örneklerin viskozitesindeki değışimi göstermektedir. Viskozitenin azalması, pH değeri daha asidik bölgeye kaydıkça polianyonun karboksil gruplarının asosiye olarak zinciri daha kompakt hale getirdiğini göstermektedir. BSA çalışılan tüm pH'larda aynı alıkonma hacminde ve yaklaşık aynı pik büyüklüğünde kromatogramlarla karakterize edilmiştir, bu sebeple sadece pH 7'de elde edilen kromatogramın gösterilmesi yeterlidir (Şekil 4.4).

BSA-PAA sistemleri öncelikle türbidimetrik ve spektrofotometrik olarak incelenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Şekilde görüldüğü gibi pH 7'de farklı n_{BSA}/n_{PAA} oranları BSA-PAA karışımlarının çözünürlüğünü etkilememektedir. Şekil 4.7, 4.9, 4.11 ve 4.13 sırasıyla RI, UV, LS ve VIS detektörleri tarafından saptanmış olan bileşenlerin farklı oranlardaki BSA-PAA karışımlarının kromatogramlarını göstermektedir. PAA-BSA çözeltisi iki pik ile karakterize edilmektedir. Karışım bileşenlerinin alıkonma hacmi (RV) değışmemekte ve serbest BSA ile serbest PAA'nın alıkonma hacimlerine eşit olarak kalmaktadır. Şekil 4.8, 4.10, 4.12 ve 4.14 farklı detektörlerden elde edilen BSA monomer ve PAA piklerinin alanlarının n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağıl olarak değışimini göstermektedir. PAA pikinin alanı polimer çözeltisinin BSA ile titrasyonu ile değışmemektedir. Aynı zamanda karışımdaki protein miktarının artırılmasıyla BSA monomer pikinin alanı da lineer olarak artmaktadır. Bu nedenle pH 7'de her ikisi de negatif yüklü olan polimer ile protein molekülleri arasındaki elektrostatik itme kuvveti kararlı

polikompleksin oluşumunu engellemektedir ve PAA ile BSA molekülleri çözelti içinde serbest olarak bir arada bulunmaktadır. Sonuçlar sedimentasyon (Mustafaev, 1978) ve HPLC analiz sonuçları (Akkılıç, 2006) ile örtüşmektedir.

pH 6'daki BSA-PAA çözeltileri

değere ulaşmıştır. Eşitlik 5.1'deki değerlerin orana bağlı olarak çizilen grafiği de bir maksimumdan geçmektedir (Şekil 4.31).

$$(LS)(VIS)/(RI)^2 = (K_{LS} K_{VIS} / K_{RI}^2) M_w [\eta] \propto R_g \quad (5.1)$$

Bu eşitlikte (LS) ışık saçılması kromatogramındaki, (VIS) viskozite kromatogramındaki ve (RI) ise kırılma indisi kromatogramındaki pik alanını göstermektedir.

Proteinin düşük derişimde olduğu değerlerden başlayarak protein miktarındaki artış, $n_{BSA}/n_{PAA} \leq 5$ 'te oluşan polikompleks partiküllerinin molekül kütlesinde de bir artışa neden olmaktadır ve bir limit değere ulaşmıştır. Oluşan komplekslerin yapısı, n_{BSA}/n_{PAA} oranının daha fazla yükselmesiyle önemli ölçüde değişmektedir. Çözeltideki protein derişimine bağlı olarak kompleks partiküllerinin molekül ağırlığında azalma meydana gelmekte ve sabit bir değere ulaşmaktadır.

Şekillerden görüldüğü üzere, LS pik alanı artartarken VIS pik alanı azalmaktadır. Buradan da anlaşıldığı gibi belli bir orandan sonra eklenen protein miktarındaki artış LS değerini düşürürken VIS değerinde artışa neden olmaktadır. Deneysel veriler polikompleks partikülleri arasındaki moleküler toparlanmanın da hesaba katılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Agregat oluşumu, uç uca veya yan yana toparlanmaya bağlı olarak, intrinsik viskozitede artışa ya da azalmaya neden olabilir ve partikülün asimetrisinde azalma ya da artışla sonuçlanabilir. $n_{BSA}/n_{PAA} \leq 5$ 'te, intrinsik viskozitenin azalmasına sebep olarak, BSA-PAA kompleks partiküllerinin yan yana agregat oluşturduğunu kabul etmekteyiz. Bu agregatların $n_{BSA}/n_{PAA} > 5$ 'teki disosiye olması, polikompleks partiküllerine belirli bir miktarda protein eklenmesi sonucu meydana gelmektedir ve BSA'nın fazlası kromatogramlarda serbest BSA piki olarak görülmektedir.

Şekil 4.32'de PAA'nın dn/dc değerinin hesaplanmasında kullanılan konsantrasyon-RI pik alanı grafiği gözükmemektedir. Bu grafikten elde edilen dn/dc değeri ve BSA'nın dn/dc değeri kullanılarak çizelge 4.1'deki değerler elde edilmiştir. Bu çizelgedeki değerler grafik halinde şekil 4.33, 4.34, 4.35, 4.36'da gözükmemektedir. Molekül kütlesi ve boyut değerlerinin bir maksimumdan geçerek sabit bir değere ulaşmaktadır. a değeri ise negatif değerlerden geçerek yine sabitlenmiştir. Bu grafikler yukarıda anlatılan mekazzınayı doğrulamaktadır. Agrege olmuş yapıların a değerinin negatif çıktığı bilinmektedir. Komplekslerin viskozitesi oran 5'e kadar azalıp sabitlenmektedir.

pH 4 ve 4.3'te PAA'nın BSA ile olan çözeltisinin titrasyon eğrisine bakıldığında reaksiyon karışımının bileşimi üç kısımda incelenebilir (Şekil 5.1). Suda çözünmeyen BSA-PAA

karışımının süpernatant analizi SEC-RI/UV/LS/VIS sistemleri ile gerçekleştirilmiştir.

pH 4,3'te farklı detektörlerden elde edilen kromatogramlar şekil 4.37, 4.39, 4.41 ve 4.43'te görülmektedir. Bu kromatogramlardaki piklerin alanlarının n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak değişimi şekil 4.38, 4.40, 4.42 ve 4.44'ta gösterilmektedir. Kromatogramlar ve grafikler göz önüne alındığında I. bölgede ($n_{BSA}/n_{PAA} \leq 5$) sistemin homojen kaldığı ve çözünen madde konsantrasyonunun oran arttıkça azaldığı söylenebilir. II. bölgedeki ($5 < n_{BSA}/n_{PAA} \leq 20$) kromatogramlarda hiçbir detektörde sinyal gözlenmediği için tüm polimerik bileşenlerin çözünmeyen faza geçtiği söylenebilir. Oranın $n_{BSA}/n_{PAA} = 20$ 'den daha büyük değerlerinde sistemin tekrara çözünür faza geçtiği kromatogramlardan görülmektedir. Çözünen fazdan çözünmeyen faza ve çözünmeyen fazdan çözünen faza geçiş daha detaylı olarak pH 4'ten elde edilen kromatogramlardan incelenmiştir.

pH 4'te I. bölgede ($n_{BSA}/n_{PAA} \leq 5$) matriks çözeltisi homojendir ve kromatogramlarda serbest PAA'nın RV'sine karşılık gelen bir alıkonma hacminde bir pik vermektedir. SEC sonuçlarında görüldüğü üzere karışımda serbest BSA molekülleri bulunmamaktadır. Pik alanlarının polimer/protein oranına göre değişimi, SEC detektörlerinde farklı karakter göstermektedir. RI detektöründe elde edilen kromatogramlarda (Şekil 4.45) pik alanları n_{BSA}/n_{PAA} oranlarındaki artışla azalmaktadır. Bu durum ayrılan partiküllerin derişimindeki azalmayı kanıtlamaktadır (Şekil 4.46).

UV kromatogramlarındaki (Şekil 4.47) piklerin alanları öncelikle artmakta ve daha sonra polianyonun titrasyonu ile azalmaktadır (Şekil 4.48). Bu, polimer sarmallarının arasında protein moleküllerinin bulunduğu bir kanıttır ve polimer makromolekülünün UV absorpsiyon kapasitesini artırmaktadır.

Şekil 4.49 ve 4.51'de LS ve VIS detektörlerinden elde kromatogramlar görülmektedir. LS pik alanı artarken (Şekil 4.50) VIS değerlerinde bir azalma (Şekil 4.52) görülmektedir. Aynı zamanda türbidite de protein/polimer oranı ile orantılı olarak artmıştır. Kromatogramlardaki pik, suda çözünebilir BSA-PAA kompleksine karşılık gelmektedir ve çözünmeyen komplekslerle bir arada bulunmaktadır. Çözünebilir karışımda serbest PAA olup olmadığını analiz edememekteyiz, çünkü serbest PAA SEC'te polimer-protein kompleksi ile aynı RV'de çıkmaktadır. $n_{BSA}/n_{PAA} < 5$ olan oranlarda kompleks molekülleri arasında agregasyon gerçekleşmekte ve bu yapılar suda çözünmeyen komplekslerin oluşumuna (faz geçişine) öncü olmaktadır.

$n_{BSA}/n_{PAA} > 5$ 'teki (bölge II) karışımın kromatogramlarından da anlaşılacağı gibi çökelti

ayrıldıktan sonra çözeltide polimerik bileşen (polianyon, protein, suda çözünebilir BSA-PAA kompleksleri) bulunmamaktadır. Bu bölgede bütün polimer molekülleri çözünmeyen kompleks fraksiyonunda tutulmuştur. $n_{BSA}/n_{PAA} \geq 20$ olan oranlarda, protein ilavesiyle kromatogramlarda serbest BSA molekülleri görülmektedir. Farklı detektörlerden elde edilen protein piki alanı komponentlerin oranının artışıyla birlikte lineer olarak artmaktadır (Şekil 4.46, 4.48, 4.50, 4.52).

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi $n_{BSA}/n_{PAA}=20$ 'den büyük oranlarda protein eklendiğinde çözeltinin türbiditesinde azalma görülmektedir ve sistem yine homojen hale dönmektedir (bölge III). $n_{BSA}/n_{PAA} \geq 30$ oranlarında elde edilen süpernatant kromatogramları iki pik şeklindedir. Geç çıkan ve RV'si 17 mL olan partiküller serbest BSA piklerine karşılık gelirken, daha erken çıkan ve RV'si 11 mL olan partiküller PAA'nın pikine karşılık gelmektedir (Şekil 4.45, 4.47, 4.49, 4.51).

Şekil 4.46, 4.48, 4.50 ve 4.52 erken çıkan pikin alanlarının orana bağlı değişimini göstermektedir. $n_{BSA}/n_{PAA}=40$ olana kadar eklenen BSA ile birlikte her iki pikin alanında da bir artış görülmektedir ve RI ile UV kromatogramlarında erken geç çıkan pik diğerinde çok daha büyüktür. $n_{BSA}/n_{PAA} > 20$ olan oranlarda protein öncelikle suda çözünmeyen komplekslerle bir arada, daha büyük oranlarda da hem suda çözünen hem de çözünmeyen komplekslerle bir arada bulunmaktadır. Sistemin tamamı suda çözünür hale geçtikten sonra daha fazla BSA ilavesi, erken çıkan pikin alanında fark edilir bir artışla sonuçlanmazken geç çıkan pikin alanı artmaktadır.

Sonuç olarak, pH 7,0 ve 6,0'de stabil kompleks oluşumu gerçekleşmemektedir. Bunun sebebi olarak bileşenler arasındaki kuvvetli elektrostatik kuvvetlerin stabil kompleks oluşumunu engellemesidir.

pH 5,0'te suda çözünen BSA-PAA kompleksleri oluşmuştur ve belli bir oran aralığında ($0 < n_{BSA}/n_{PAA} < 10$) molekül kütlesi ve boyut değerleri bir maksimumdan geçmektedir. Artan oranla birlikte oluşan polikomplekslerin boyut ve molekül kütleleri sabit kalmaktadır. Şunu söyleyebiliriz ki; oran 5'e kadar ortamda serbest BSA molekülleri yoktur ve oluşan polianyon-protein kompleksleri diğer polikompleks molekülleriyle yan yana agregat olmaktadır. Ortamda serbest BSA'nın bulunduğu daha büyük oranlarda ise BSA molekülleri polikompleks molekülleri arasındaki agregasyonu engellemektedir.

pH 4,3 ve 4,0'te ise büyük ve küçük oranlarda suda çözünür kompleksler bulunmaktadır (bölge I ve III). Büyük oranlarda oluşan suda-çözünür kompleksler sadece serbest BSA

molekülleri ile birlikte var olabilmektedirler, çünkü daha ufak oranlarda BSA molekülleri sulu sistemde bulunurken kompleks partikülleri bulunmamaktadır. Ortamdaki serbest BSA moleküllerinin konsantrasyonu belli bir değeri aştıktan sonra çözünmeyen BSA-PAA kompleksleri çözünür hale geçmektedir.

KAYNAKLAR

- Abuchouwski, A., van Es, T., Palezul, N.C., Davis, F.F., (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 3578-81.
- Andrianov, A. K., Marin, A., Roberts, B. E., (2005), "Polyphosphazene Polyelectrolytes: A Link between the Formation of Noncovalent Complexes with Antigenic Proteins and Immunostimulating Activity", *Biomacromolecules*, 6, 1375-1379.
- Akkılıç, N., (2006), Bovin Serum Albumin ile Poliakrilik Asidin Suda Çözünen Komplekslerinin ve Kovalent Konjugatlarının HPLC Yöntemi ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Arakawa, T., Wen, J., (2001), "Determination of Carbohydrate Contents from Excess Light Scattering", *Anal. Biochem.*, 299, 158–161.
- Bae, Y. H., Okano, T., Hsu, R., Kim, S. W., (1987), *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, 8, 481-5.
- Berdick, M., Morawetz, H., (1953), *J. Phys. Chem.*, 57, 959.
- Buijtenhuijs, F.A., van de Riet, A.M.C., (1999), "Aqueous Size Exclusion Chromatography", *MolMass Proceedings*.
- Commandur, B., Arneodo, C., Benoit, J. P., Thies, C., (1989), "A study of the viscosity of gelatin-based complex coacervates", *Controlled Release of Bioactive Materials*, Chicago, Abstract 132, 89.
- Çimen, N.S., (2006), Proteinlerin Poliakrilik Asit İle Suda Çözünmeyen Kompleksleri, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., (1994), *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*, Hanser Publishers, Munich.
- Dellacherie, E., (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 602.
- Dubin, P.L., Cooper, C.L., Kayitmazer, A.B., Turksen, S., (2005), "Polyelectrolyte-protein complexes", *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10, 52-78.
- Falb, R. D., Grode, G. A., Takahashi, M. vd., (1968), *Characteristics of Heparinized Surfaces*, *Advances in Chemistry* 87, American Chemical Society, Washington.
- Gözükara, E. M. (1997), *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Higgs, P.G., Joanny, J.F., (1991), "Theory of polyampholyte solutions", *J. Chem. Phys.*, 94, 2, 1543.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Belova, V.V., and Evdakov, V.P., (1978), *Biophysics (Moscow)*, 23, 789.
- Kabanov, V. A., Zezin, A. B., (1984), *Pure Appl. Chem.*, 56, 343.
- Kabanov, V.A., Skobeleva, V.B., Rogacheva, V.B., Zezin, A.B., (2004), "Sorption of proteins by slightly cross-linked polyelectrolyte hydrogels: Kinetics and mechanism", *J. Phys. Chem.*, B 108, 1485-1490.
- Kendrick, B.S., Kerwin, B.A., Chang, B.S., Philo, J.S., (2001), "Online Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography Light Scattering and Differential Refractometry Methods to Determine Degree of Polymer Conjugation to Proteins and Protein-Protein or Protein-Ligand Association States", *Anal. Biochem.*, 299, 136–146
- Koetz, J., Linow, K. J., Burkart, P., Li Ping, H., (1986), "Effects of charge density and

structure of side-chain branching on the composition of polyanion-polycation complexes”, *Polymer*, 27, 10, 1574.

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

Kratochvil, P., (1987), *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*, Elsevier, Amsterdam.

Lenk, T., Thies, C., (1987), *Coulombic Interactions in Macromolecular Systems*, American Chemical Society, Washington, DC.

Lough, W.J., Wainer, W., (1992), *High Performance Liquid Chromatography-Fundamental Principles and Practice*, Blackie Academic & Professional, New York.

McCormick, C.L., Salazar, L.C., (1992), “Water soluble copolymers: 44. Ampholytic terpolymers of acrylamide with sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate and 2-acrylamido-2-methylpropanetrimethyl-ammonium chloride”, *Polymer*, 33, 4384.

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

Morawetz, H., Hughes, W.L.J., (1952), “The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin”, *J. Phys. Chem.*, 56, 64-69.

Mourey, T. H., (2004), “SEC Molecular-Weight-Sensitive Detection”, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 9, 97-135.

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

Mustafaev, M.I., (2004), “Functionally Biopolymer Systems”, *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 4, 1.

Mustafaev, M.I., Goncarov, V.V., Evdakov, V.P., Kabanov, V.A., (1975), *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, 225, 721.

Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Belova, V.V., Evdakov, V.P., (1978), *Biophys.*, 23, 789.

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

Osada, Y., Tsuchida, E., Sanada, K., (1972), “Interaction of poly(styrene sulfonate) with polycations carrying charges in the chain backbone”, *J. Polym. Sci. A-1*, 10, 11, 3397-3404.

Pasch, H., Trathnigg, B., (1999), *HPLC of Polymers*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Peng, Y., Zhang, L., (2003), “Characterization of a polysaccharide-protein complex from *Ganoderma tsugae* mycelium by size-exclusion chromatography combined with laser light scattering”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 56, 243-252.

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

Qian, R.L., Mhatre, R., Krull, I.S., (1997), “Characterization of antigen-antibody complexes by size-exclusion chromatography coupled with low-angle light-scattering photometry and viscometry”, *J. Chrom. A*, 787, 101-109.

- Radeva, T., (2001), *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., (1988), "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *Int. J. Biol. Macromol.*, 10, 305.
- Schreiber, G., Selzer, T., Albeck, S., (2000), "Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes", *Nat. Struct. Biol.*, 7, 537-541.
- Shieh, J., Glatz, C.E., (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 606.
- Teraoka, I., (2002), *Polymer Solutions An Introduction To Physical Properties*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Theisen, A., Johann, C., Deacon, M.P., Harding, S.E., (1999), *Refractive Index Increment Data-Book*, Nottingham University Pres.
- Thies, C. vd., (1994), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Trathnigg, B., (2000), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Tsuchida, E., Osada, Y., (1974), "The role of the chain length in the stability of polyion complexes", *Makromol. Chem.*, 175, 2, 593-601.
- Veis, A., (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 596.
- Vijayalakshmi, M. A., (2002), *Biochromatography Theory and Practice*, Taylor and Francis London & NY.
- Wen, J., Arakawa, T., Philo, J. S., (1996), "Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions", *Anal. Biochem.*, 240, 155-166.

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.psrc.usm.edu/macrog/weight.htm>
- [2] <http://www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Dihedral.jpg>
- [3] <http://web.umr.edu/~jstoffer/MW/Mark.html>
- [4] http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrodynamic_radius
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyelectrolyte>
- [6] <http://www.pslc.ws/macrog/electro.htm>
- [7] <http://www.polymersnetbase.com/pme>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 11.10.1981

Doğum yeri İstanbul

Lise 1999-1995 İstanbul Tekstil Anadolu Meslek Lisesi

Lisans 1998-2003 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 2003- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum(lar)

2005-Devam ediyor YTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi Araştırma Görevlisi