İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDRARDA HOMOGENTİSİK ASİDİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülfem Sultan BALTA

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDRARDA HOMOGENTİSİK ASİDİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülfem Sultan BALTA
50091048

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 Mayıs 2011
Tezin Savunulduğu Tarih : 10 Haziran 2011

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Nevin Öztekin (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr.F.Bedia Erim Berker (İTÜ)
Prof.Dr.Ayşen Yarat (MÜ)

HAZİRAN 2011

Aileme,

ÖNSÖZ

Bu çalışmamın ortaya çıkmasında ve tamamlanmasında aktardığı engin bilgi birikimi ve verdiği emekler için değerli hocam Doç. Dr. Nevin Öztekin' e,

Ayrıca, bu çalışmanın ilerlemesinde gösterdiği yardımlardan dolayı değerli hocam Prof. Dr. F. Bedia Erim Berker' e ,

Laboratuvarda geçirdiğim tüm stresli ve eğlenceli zamanlarda yanımda olan çalışma arkadaşlarıma ve uno ekibine,

Bu yolun başından beri birlikte vakit geçirdiğim dostlarıma ve,

Bugünlere gelmemde gösterdikleri ilgi, sevgi ve sonsuz sabırları için canım anneme, babama ve tüm aileme,

Çok teşekkür ederim.

Mayıs 2011 Gülfem Sultan Balta

(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ **3**
2.1 Elektroforetik Mobilite 3
2.2 Elektroosmatik Akış 4
2.3 Elektroosmatik Akış Varlığında Analitlerin Geçişi 6
2.4 Elektroosmatik Akış Hızına Etki Eden Faktörler 7
2.4.1 Elektrik alan 7
2.4.2 pH 7
2.4.3 Tamponun iyonik şiddeti 7
2.4.4 Sıcaklık 7
2.4.5 Organik modifiye edici madde ilavesi 7
2.4.6 Yüzey aktif madde ilavesi 8
2.4.7 Kapiler kolonun polimerik madde ile kaplanması 8
2.5 Ayrımda Etkin Olan Faktörler 8
2.5.1 Geliş süresi 8
2.5.2 Bant genişlemesi ve rezolüsyon 8
2.6 Cihaz Bölümleri 9
2.6.1 Voltaj kaynağı 9
2.6.2 Elektrotlar 10
2.6.3 Örnek injeksiyonu 10
2.7 Örnek Dedeksiyonu 10
2.8 Kapiler Elektroforez Teknikleri 11
3. HOMOGENTİSİK ASİT **13**
3.1 Homogentisik Asit ve Alkaptonüri 13
3.2 Klinik Metabolitler 15
3.3.1 İdrar 16
4. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON **17**
4.1 Tarama Tasarımları 18
4.1.1 Full faktöriyel tasarım 18
4.2 Optimizasyon 20
4.2.1 İki seviyeli faktöriyel noktalar 20
4.2.2 Star noktalar 21
4.2.3 Merkezi noktalar 21

4.3 Model Oluşturma 22
5. DENEYSEL 25
5.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 25
5.2 Kimyasal Maddeler 25
5.3 Elektroforetik Koşullar 25
5.4 Standartların Hazırlanması 26
5.5 İdrar Örneklerinin Hazırlanması 26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 27
6.1 Çalışma Tamponunun Belirlenmesi 27
6.1.1 Tampon pH' ının belirlenmesi 28
6.2 İdrarda HGA Piklerinin Saptanması 29
6.3 Deneysel Tasarım ve Metot Optimizasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar 29
6.3.1 Faktöriyel tasarım ile etkili faktörlerin bulunması 29
6.3.2 Optimizasyon 31
6.4 Metot Validasyonu 33
6.5 Tekrarlanabilirlik Değerleri 34
6.6 Geri Kazanım Değerleri 34
6.7 Dedeksiyon Sınırı Değeri (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ) 34
6.8 Hasta İdrar Örneğindeki HGA Miktarı 34
6.9 Sonuç 35
KAYNAKLAR 37

KISALTMALAR

CE	**:** Kapiler Elektroforez
CZE	**:** Kapiler Zon Elektroforez
CGE	**:** Kapiler Jel Elektroforez
MEKC	**:** Misel Elektrokinetik Elektroforez
ITP	**:** İzotakoforez
EOF	**:** Elektroosmotik akış
HGA	**:** Homogentisik Asit
HGO	**:** Homogentisik Asit Oksidaz
CCD	**:** Merkez Kompozit Dizaynı
LC	**:** Sıvı Kromatografi
GC	**:** Gaz Kromotografisi
GC-MS	**:** Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
FFD	**:** Full Faktöriyel Tasarım
BBD	**:** Box-Behmken Dizayn
PBD	**:** Plackett-Burman Tasarımı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon çeşitleri 10
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez teknikleri 11
Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri 18
Çizelge 4.2 : Full faktöriyel tasarım tablosu..... 19
Çizelge 4.3 : Faktörlerin gerçek değerleri 19
Çizelge 4.4 : Optimizasyon deneyleri için tasarlanan deney ve faktörlerin değerleri (α=1.414, -α=-1.414) 22
Çizelge 6.1 : Matematiksel model için katsayılar, faktörler ve faktörler arası etkileşimleri için p-değerleri 30
Çizelge 6.2 : İki faktörlü CCD için faktörlerin seviyeleri ve elde edilen yanıtlar..... 31
Çizelge 6.3 : Tekrarlanabilirlik değerleri..... 34
Çizelge 6.4 : Geri kazanım değerleri 34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kapiler yüzeyinin görünümü ve EOF' nin oluşumu. 5
Şekil 2.2 : Analitlerin EOF ile birlikte hareket yönleri. 6
Şekil 2.3 : Analitlerin bir elektroferogramdaki geliş sırası..... 7
Şekil 2.4 : CE' nin şematik gösterimi. 9
Şekil 3.1 : Homogentisik asidin kimyasal yapısı..... 13
Şekil 3.2 : Homogentisik asit metabolizması 14
Şekil 3.3 : Homogentisik asidin idrarda kalitatif tayini … 15
Şekil 4.1 : CCD için tasarım noktaları.....21
Şekil 6.1 : Farklı tamponlarda hazırlanan HGA örneğinin UV spektrumları..... 26
Şekil 6.2 : Farklı tamponlarda hazırlanan HGA örneğinin elektroferogramları …... 27
Şekil 6.3 : Farklı pH' lardaki H_3PO_4 tamponu ile hazırlanan örneklerin UV spektrumları 27
Şekil 6.4 : İdrar örneğinin elektroferogramları..... 28
Şekil 6.5 : Normal olasılık grafiği. 29
Şekil 6.6 : Rezolüsyona, konsantrasyon ve voltajın etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği 31
Şekil 6.7 : Rezolüsyona, konsantrasyon ve voltajın etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği 32
Şekil 6.8 : Homogentisik asidin kalibrasyon eğrisi… 32
Şekil 6.9 : Sağlıklı bireyden alınan idrar örneğinin, 0.1mM spike yapılmış idrar örneğinin, hasta idrar örneğinin elektroferogramları..... 34

İDRARDA HOMOGENTİSİK ASİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

ÖZET

Alkaptonüri, tirozin metabolizması ile ilgili, karaciğerde sentezlenen homogentisik asit oksidaz (HGO) enziminin eksikliği sonucunda ortaya çıkan kalıtsal metabolik bir hastalıktır. Bu enzimin eksikliği, özellikle bağ dokusunda, eklemlerde ve kemiklerde "homogentisik asit" (HGA)' in birikmesine sebep olur. Oldukça nadir görülen, otozomal çekinik olan kalıtımsal bir hastalıktır. Alkaptonüri tanısı, idrarda homogentisik asit analizi ile doğrulanabilir.

Alkaptonürinin ciddi belirtileri erişkin dönemde ortaya çıkmaktadır. Hastalar genellikle normal yaşam süresine sahiptir. Hastalığın ileri derecede sakatlığa neden olması nedeniyle erken tanı konulması; hastanın eğitimi, ağrıyı kontrol eden yaklaşımların ve uygun egzersizlerin öğretilmesi açısından önem taşır. Böylece hastanın uzun dönemde yaşam kalitesini arttırmak olasıdır.

Etkin bir analitik yöntem olan kapiler elektroforezin (CE) son yıllarda klinik analizlerine uygulandığı görülmektedir. CE' nin avantajları; yüksek ayırma etkinliği, yüksek ayrımcılık, kısa analiz süreleri, az miktardaki örnek ve çözücü tüketimidir. CE yüksek ayırma gücü nedeniyle özellikle kompleks yapıdaki örnek matrikslerinin analizi için uygun bir yöntemdir. Silika kapilerler kromatografik kolonlara göre çok ucuzdur, çalışma arasında kolayca yıkanır ve dolgu kolonlarda görünen matriks kirlenmesi problemi yoktur. Kapiler elektroforezin diğer ayırma tekniklerine göre olan bir üstünlüğü, kompleks matrisler içinde küçük moleküllerin örnek hazırlama aşamasında uzun işlemlere tabi tutulmadan sadece seyreltme ve filtrasyon yapılarak analiz edilebilmesidir.

Bu çalışmada, HGA'nın idrarda tayini için direkt UV dedeksiyon ile basit, hızlı, ekonomik ve güvenilir bir kapiler elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, deneysel tarama tasarımı ve ardından merkezi kompozit tasarım ile optimize edilmiştir. Yöntemin validasyonu optimize edilen şartlarda gerçekleşmiştir.

DETERMINATION OF HOMOGENTISTIC ACID IN URINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

Alkaptonuria is a metabolic disease caused by deficiency of homogentisic acid oxidase (HGO), which is associated with tyrosine metabolism in the liver. Deficiency of this enzyme is caused by "homogentisic acid" (HGA) deposition especially in the connective tissue. This is a rare otosomal recessive disease. Diagnosis of alkaptonuria can be confirmed by urine organic acid analysis.

Serious symptoms of alkaptonuria arises in adult period of patients. They generally have normal lifetimes. Education of patient, control of pain, and introducing appropriate exercises are crucial for early diagnosis since the disease triggers high degree of disability. By this way, improvement of life quality of patients in long period can be possible.

More recently, Capillary electrophoresis (CE), a highly effective analytical technique, has been employed for the clinical analysis. The advantage of the capillary electrophoresis is high separation efficiency, excellent resolution, short analysis time. It consumes small amounts of solvent and sample. CE is particularly suitable in the analysis of complex natural matrices, owing to its higher resolving power. Fused silica capillaries are less expensive than chromatographic columns, easily washed between runs and free of irreversible contamination of the matrix, unlike the packed column. Therefore, biological fluids can be directly analysed without any pretreatment step or with a simple process of sample pretreatment by capillary electrophoresis. One benefit of CE compared to other separation techniques seems CE' s greater ability to separate small compounds in complex matrices without any sample preparation.

In this study, we describe a simple, fast, and reliable capillary electrophoretic method with the direct UV detection for determination of homogentisic acid in urine. The method was optimized using a screening design followed by a central composite design.

1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez tekniği diğer kromatografik yöntemlerle kıyaslandığında nispeten daha yenidir ve tıbbi araştırmalarda giderek artan bir ilgi görmektedir. CE, son yıllarda tıbbi ve klinik araştırmalarda ve kalitatif madde tayinininde HPLC' ye alternatif olarak kullanılan bir tekniktir.

Canlıların yapısal özellikleri ve fonksiyonları genler tarafından denetlenmektedir. Bazı genlerin mutasyonları sonucu genetik materyalin üretilememesi ve/veya toksik metabolitlerinin birikmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklara kalıtsal metabolizma hastalıkları (KMH) adı verilir. KMH anne ve babadan kalıtsal olarak geçen ve çok nadir görülen hastalıklardır. KMH yaşam tehlikesi, zeka geriliği, fiziksel gelişimi olumsuz etkileme ve yaşam boyu sürecek çeşitli sorunlara yol açarlar. Bu yüzden bu hastalıkların erken tanısı çok önemlidir. Günümüzde yenidoğanlara doğumsal, hormonal ve metabolik bozukluklarının erken tanısı ve tedavisine yönelik olarak tarama testlerinin yapılması standart bir uygulama haline gelmiştir. Tarama testleri ile metabolik hastalıklar henüz kalıcı hasar yaratmadan tespit edilebilmektedir. Bu nedenle KMH' ın hızlı tanısı için, güvenilir, hızlı ekonomik alternatif analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir [1,2].

KHM' lar genellikle hasta serum ve idrarında belli metabolitlerin birikmesine yol açarlar. Hastalık metabolitlerinin analizi, klinik çalışmalar için hastalık işareti olarak tanımlanmasına yardım eder [3]. Metabolit analizinde en çok kullanılan teknikler GC-MS, kağıt ve ince tabaka kromatografi ve HPLC' dir [4,5,6].

Literatürde, hastalık metabolitlerinin tayininde kapiler elektroforez yöntemini kullanan birçok çalışma mevcuttur [7]. CE de diğer yöntemlere göre metabolik hastalıkların tanısında kullanılan hızlı, güvenilir ve ucuz bir analitik yöntemdir [7,8].

Alkaptonüri; fenilalanin ve tirozin metabolizmasının nadir görülen herediter bir bozukluğudur. 3q kromozomunda kodlanmış homogentisik asit oksidaz (HGO) genindeki otozomal resesif mutasyon sonucu oluşan bir KMH' dır [9,10]. Hastalığın belli başlı klinik bulguları arasında idrarda koyulaşma, kıkırdakta ve diğer bağ

dokularında pigmentasyon gözlenir. Alkaptonüri tanısı, idrarda HGA analizi ile doğrulanabilir.

Uzun yıllar, HGA' nın tayini biyolojik sıvı örneklerinde enzimatik spektrofotometri [11], kağıt kromatografi [12], ince kağıt kromatografi [13], gaz [14] ve sıvı kromatografi [15] gibi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Markus A.P.J ve arkadaşları HGA tayini için bir IR yöntemi geliştirmişlerdir [16]. Son yıllarda gelişen kapiler elektroforez yöntemi ile biyolojik sıvı örneklerinde hızlı ve daha ucuz metotlar ile organik asitlerin tayini yapılmaya başlanmıştır. CE metodu ile yapılan HGA tayinleri daha çok CE-MS [3], CE amperometri [17] gibi yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Günümüzde alkaptonüri tanısında en çok kullanılan yöntem GC-MS' dir. Ancak analiz ekstraksiyon ve ekstrakte edilen bileşenlerin modifikasyonu gibi karmaşık bir örnek hazırlama işlemi içerir. CE' de tayinler hızlı analiz, basit örnek hazırlama işlemi ve daha ucuz yöntemler ile yapılabilir.

Bu çalışmada amaç, alkaptonüri tanısı için CE ile direkt UV dedeksiyonu kullanarak idrarda HGA' nın kantitatif tayini için basit, hızlı ve güvenilir bir metot geliştirmektir. Metodu tarama ve merkezi kompozit tasarım kullanılarak optimize etmek ve optimize edilen metodun validasyonunu optimum şartlarda gerçekleştirmektir.

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez, sıvı veya yarı katı bir ortam içinde, elektriksel potansiyel etki ile çözelti içindeki yüklü taneciklerin belirli bir pH' da göç etmesi ve etkin yükleri ile büyüklüklerine göre ayrılmaları prensibine dayanır. İlk elektroforez cihazı Tiselius tarafından geliştirilmiş ve kendisine Nobel ödülü verilmiştir [18].

Elektroforetik ayırmalar, tabaka (slab) elektroforez ve kapiler elektroforez olarak iki farklı teknikle gerçekleştirilir. Tabaka elektroforez klasik yöntem olup uzun yıllar kompleks ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin ayrılmasında kullanılmıştır ve günümüzde de kullanılmaktadır. Kapiler elektroforez (CE) ise 1980' lerden itibaren hızla gelişen bir teknik olarak önemli bir ayırma yöntemi olarak kimyacılar ve yaşam bilimciler tarafından kullanılmaktadır [19].

CE, elektroforezin enstrümental versiyonudur. Dedeksiyonun analiz sırasında yapılabilmesi, yüksek ayırım verimi (10^5-10^6 teorik plaka sayısı) elde ediliyor olması, nicel ve nitel analize olanak sağlaması, kolay metot oluşturulabilir olması, çok az madde tüketimi ve ekonomik kapiler kolonlarla Li iyonundan DNA' ya kadar çok geniş bir spektruma uygulanabilir olması, CE tekniğinin avantajlarıdır [20,21].

2.1 Elektroforetik Mobilite

Elektroforetik ayırmaların temeli, analitlerin bir elektrik alanda, farklı hızlarda göç etmesine dayanmaktadır. Bir iyonun elektrik alandaki hızı aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$v = \mu_e . E \qquad \textbf{(2.1)}$$

Burada; v iyon göç hızı, μ_e elektroforetik mobilite, E ise uygulanan elektrik alandır. Taneciğin mobilitesi ortamdaki elektrik alan kuvvetinden ve sürtünme kuvvetinden etkilenir. Yüklü tanecik üzerine etkili olan elektrik alan kuvveti iyonun yükü ve uygulanan elektrik alan ile doğru orantılı ve sürtünme kuvveti ile ters orantılıdır [21].

Elektrik alan kuvveti;

$$F_E = q \cdot E \qquad \textbf{(2.2)}$$

ve küresel bir tanecik için sürtünme kuvveti

$$F_F = -6.\pi.\eta.r.v \qquad \textbf{(2.3)}$$

eşitlikleri ile verilir.

Burada, q iyon yükü, ŋ çözelti viskozitesi, r iyon çapı, v iyon hızını ifade eder. Sabit elektrik alan uygulandığında sürtünme ve elektrik alan kuvveti eşitlik **(2.4)**' deki gibi dengeye ulaşır. Böylece yüklü tanecikler sabit hızla hareket ederler.

$$F_E = F_F \qquad \textbf{(2.4)}$$

(2.2) ve **(2.3)** eşitlikleri **(2.4)** eşitliğinde yerine konup düzenlenir ise μ_e , eşitlik **(2.5)**' deki gibi tanımlanabilir.

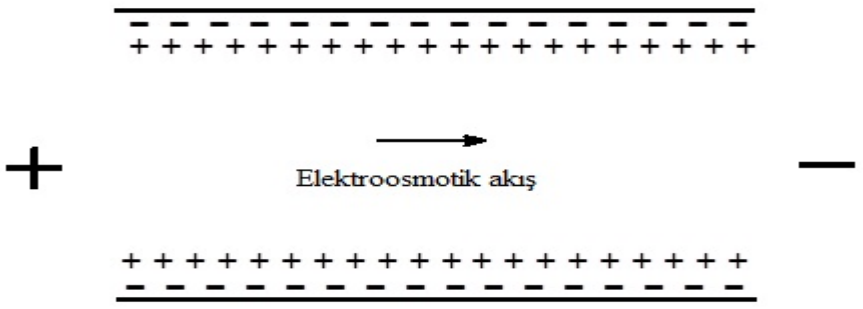
$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6.\pi.\eta.r} \qquad \textbf{(2.5)}$$

Viskozite sabit olduğundan, elektroforetik mobilite (μ_e), taneciğin yük ve büyüklük oranına (q/r) bağlı olacaktır. Analitler bu orana bağlı olarak elektrik alanda farklı hıza sahip olurlar. Küçük ve çok yüklü türler yüksek mobilitiye sahipken, büyük ve az yüklü türler düşük mobilitiye sahiptir. Tamponun pH' ının değişmesi analitlerin yükünü değiştirir ve böylece analitlerin elektroforetik mobilitileri de değişir [21,22].

2.2 Elektroosmatik Akış

Tampon çözelti içeren bir kapiler kolona yüksek bir potansiyel uygulandığında elektoroosmotik akış oluşur. Elektroosmotik akışın nedeni, silika kapiler duvarı ve çözelti yüzeyleri arasında meydana gelen elektriksel çift tabakadır. Silika yüzeyinde silanol grupları (Si-O-H) asidiktir. Silika kapilerin iç yüzeyi pH 2' nin üzerinde bir elektrolit ile temas ettiğinde, yüzeydeki silanol gruplarının (Si-O-) iyonlaşması sonucunda negatif yüklü hale gelir. Kapiler borunun yüzeyindeki bu negatif yük, tampon çözeltiden pozitif iyonları çekerek kapiler yüzeyinde bir elektriksel çift tabaka meydana getirir. Böyle bir kapilere yüksek voltaj uygulandığında, çift tabakanın difüze tabakadaki pozitif iyonlar, negatif elektrota doğru hareket ederler. Bu pozitif iyonlar çözünür oldukları için çözücüye de beraberinde sürüklerler.

Böylece kapiler içinde bir akış oluşur. Bu akışa Elektro Osmotik Akış (EOF) denir. EOF negatif elektrot doğrultusundadır. pH ne kadar yüksek ise, o kadar çok negatif yük kapiler duvarında birikir ve daha çok pozitif yük de tampon çözeltide yer alır. Bu, daha güçlü bir EOF meydana getirir. Kapiler yüzeyinin görünümü ve elektroosmatik akışın oluşumu Şekil 2.1' de görülmektedir [18,22].



Şekil 2.1 : Kapiler yüzeyinin görünümü ve EOF' nin oluşumu

EOF düz profilli bir akışa sahiptir. Bundan dolayı elektroosmotik akış, sıvı kromatografide olduğu gibi bant genişlemesine neden olmaz, dik ve dar pikler elde edilir. Bu da CE' de yüksek bir rezolüsyon elde edilmesinin nedenlerinden biridir [18].

Elektroosmatik akış hızı, elektriksel alan kuvveti ile doğru orantılı olup şu şekilde ifade edilir:

$$V_0=\mu_0.E \qquad \textbf{(2.6)}$$

Burada v_0; elektroosmatik akış hızını, μ_0; elektroosmatik mobiliteyi, E ise elektriksel alan kuvvetini ifade eder. Mobilitenin birimi $m^2.\ V^{-1}.s^{-1'}$ dir. Çözeltideki elektroosmatik mobilite, genellikle iyonik mobilitelerden daha büyüktür. Bu yüzden çözelti içindeki tüm tanecikler yükü ne olursa olsun bu güçlü akış hızı ile negatif elektroda doğru giderler. Bu taneciklerin hareket hızları şu şekilde gösterilebilir:

Pozitif iyonlar için : $v_i = (\mu_0+ \mu_i)\ .E$

Negatif İyonlar için : $v_i = (\mu_0- \mu_i)\ .E$ **(2.7)**

Nötral Partiküller için : $v_i = \mu_0.E$

İyonik türlerin tümüyle iyonik halde ve sonsuz seyreltilikte sahip oldukları büyüklüğe elektroforetik mobilite denir. Gerçek koşullarda, bu değer etkin elektroforetik mobilite (μ_e), olarak isimlendirilir. μ_e ortam pH' ına ve tampon bileşimine bağlıdır. Görünen mobilite, bir iyonun kapiler kolondaki geliş süresini

belirler ve türlerin etkin elektroforetik mobiliteleri ile kapiler içindeki elektroosmatik mobilite hesaba katılarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır.

$$\mu_g = \mu_o \pm \mu_e \qquad \textbf{(2.8)}$$

Geliş süresine bağlı olarak elektroosmatik akış

$$\mu_0 = \frac{L \times L_d}{V \times t_0} \qquad \textbf{(2.9)}$$

ve türlerin elektroforetik mobiliteleri;

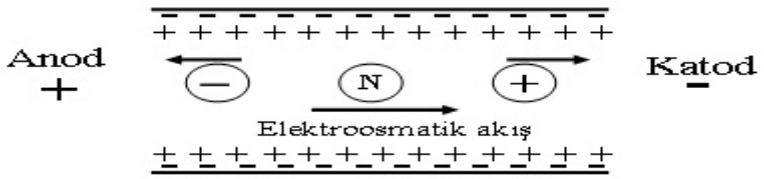
$$\mu_e = \frac{L \times L_d}{V \times t} \qquad \textbf{(2.10)}$$

eşitlikleri ile hesaplanır.

μ_0 : Elektroosmatik mobilite, L: Kapilerin toplam uzunluğu; L_d : Kapilerin dedektöre olan uzunluğu; V: Voltaj; t_0: Nötral maddenin geliş zamanı; t: Maddenin geliş zamanı [20-22].

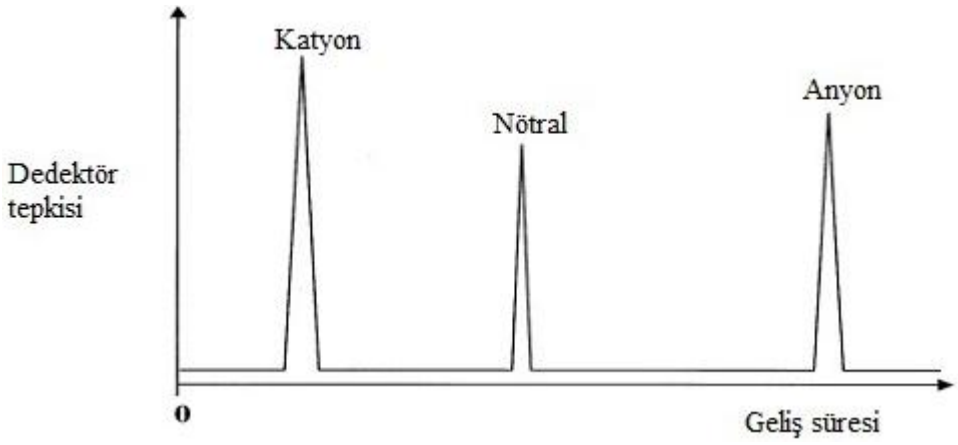
2.3 Elektroosmatik Akış Varlığında Analitlerin Geçişi

Duvar yükü negatif olan silika kapilerde, elektroosmatik akış hızı anottan katoda doğrudur.



Şekil 2.2 : Analitlerin EOF ile birlikte hareket yönleri

Katot bölgesine yakın yerleştirilen dedektöre elektroforetik mobilitesi EOF yönünde olan katyonlar ilk olarak ulaşır. Daha sonra gelen nötral moleküllerin kendi elektroforetik mobiliteleri olmadığından EOF ile hareket ederler. Takiben gelen anyonların elektroforetik mobiliteleri EOF' ye ters yönde olduğundan dedektörden en geç bu iyonlar geçerler. Böylelikle, kapilerin pozitif ucundan injekte edilen bütün türden yükleri içeren örnek karışımı tek bir çalışma metoduyla tayin edilmiş olur. Şekil 2.3' de analitlerin dedektöre geliş sıraları görülmektedir [22].



Şekil 2.3 : Analitlerin bir elektroferogramdaki geliş sırası

2.4 Elektroosmatik Akış Hızına Etki Eden Faktörler

Elektroosmatik akış hızına etki eden faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

2.4.1 Elektrik alan

Elektrik alan artarken elektroosmatik akış hızında da bir artma gözlenir [22].

2.4.2 pH

pH' ın artması akış hızının artmasına neden olur. pH, elektroosmatik akış hızının ayarlanmasında en çok kullanılan parametredir [21,22].

2.4.3 Tamponun iyonik şiddeti

Tamponun iyonik şiddetinin arttırılması, zeta potansiyelini düşürür buna bağlı olarak da elektroosmatik akış hızında azalma görülür [22].

2.4.4 Sıcaklık

Sıcaklığın arttırılması, her 1 ºC için % 2-3 oranında viskozitenin azalmasına sebep olur ve elektroosmatik akış hızının artmasına neden olur [20,22].

2.4.5 Organik modifiye edici madde ilavesi

Suyla karışabilen metil alkol, etil alkol, aseton gibi organik çözücülerin tampon çözeltiye katılması ile tampon çözeltinin zeta potansiyeli ve viskozitesini değiştirir. Bu sebeple EOF hızı da değişir. Genellikle organik çözücülerin ilave edilmesi EOF' yi yavaşlatır [22].

2.4.6 Yüzey aktif madde ilavesi

Ortama yüzey aktif madde ilavesiyle, bu maddeler kapiler yüzeyine adsorplanarak EOF hızını değiştirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler EOF hızını artırırken katyonik yüzey aktif maddeler azaltır veya akış hızının yönünü değiştirebilirler [22].

2.4.7 Kapiler kolonun polimerik madde ile kaplanması

EOF' yi azaltmanın veya kontrol etmenin diğer bir yolu ise kapiler yüzeyini polimerik maddelerle (poletilenimin, polietilenglikol, poliakrilamid gibi) kaplamaktır. Kapiler kolonların hidrofilik ve hidrofobik polimerlerle kaplanmasıyla elektroosmatik akış hızı yavaşlayabilir, yok olabilir veya tersine çevrilebilir [22].

2.5 Ayrımda Etkin Olan Faktörler

2.5.1 Geliş süresi

Ayrımda etkin olan ilk faktör, yüklü türlerin birbirinden farklı olarak kazandıkları elektroforetik mobiliteler sonucu gözlenen geliş zamanı farklılıklarıdır [21].

2.5.2 Bant genişlemesi ve rezolüsyon

Ayırma etkinliği (bant genişlemesi) sıvı kromatografide olduğu gibi teorik plaka sayısı ile ifade edilir. Elektroforezde aynı zamanda bant genişlemesinin ana sebebi difüzyondur. Pik dispersiyonu, σ^2:

$$\sigma^2 = 2.D.t = \frac{2.D.L.l}{\mu_g.V} \qquad \textbf{(2.11)}$$

D: analitin difüzyon katsayısı, t: analitin göç zamanı.

Teorik plaka sayısı, N, ile difüzyon arasındaki ilişki;

$$N = \frac{L_d^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_e.L_d.V}{2D.L} \qquad \textbf{(2.12)}$$

Teorik plaka sayısı, difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Pik genişlemesine etki eden diğer faktörtörler, özellikle protein çalışmalarında rastlanan duvar adsorpsiyonu ve injeksiyon hacmidir.

Tekniğin asıl amacı ayırımcılık olup, rezolüsyon aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

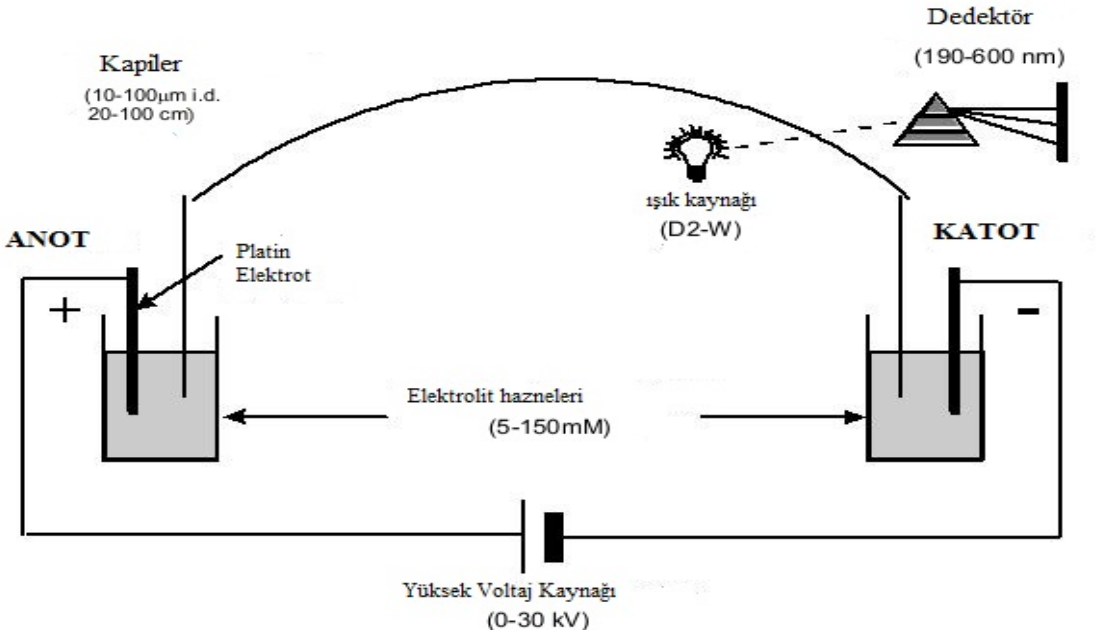
$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \qquad \textbf{(2.13)}$$

R: rezolüsyon; t_1: ilk maddenin geliş zamanı; t_2 : ikinci maddenin geliş zamanı;

w_1: ilk pikin genişliği; w_2 : ikinci pikin genişliği [20-22].

2.6 Cihaz Bölümleri

Kapiler elektroforez cihazı; dedektör, yüksek voltaj güç kaynağı, elektriksel potansiyeli ileten elektrotlar ve kapilerlerin içine girdiği iki tampon kabından meydana gelir. Kapilerin iki ucu, iki farklı tampon kabına batırılır ve bu iki tampon kabında bulunan elektrotlar arasına bir dış kaynaktan uygulanan yüksek voltaj ile; örnek, dar bir bant veya bölge olarak kapilerin bir ucundan injekte edildiğinde diğer ucuna doğru harekete başlar ve bu uçta dedeksiyon gerçekleşir. Cihazın basit bir şeması Şekil 2.4' te görülmektedir.



Şekil 2.4 : CE' nin şematik gösterimi [23].

2.6.1 Voltaj Kaynağı

Uygulanan voltaj, CE' de elde edilen ayrım veriminde en önemli etkendir. Bir iyonun mobilitesi, uygulanan voltaj ve bu voltaj sonucunda oluşan elektirik alan kuvveti ile ilişkilidir. CE' de uygulanan elektrik alan 200-600 V/cm arasındadır [20].

2.6.2 Elektrotlar

Platin elektrotlar kullanılır. Suyun ayrışması ile reaksiyonlar gerçekleşir [22]. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile;

$$2H_2O \rightarrow O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \quad \textbf{(2.14)}$$

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2(g) + 2OH \quad \textbf{(2.15)}$$

2.6.3 Örnek İnjeksiyonu

Numune, kapiler kolona hidrodinamik injeksiyon veya elektrokinetik injeksiyon ile injekte edilir. Hidrodinamik injeksiyonda, kapiler kolonun iki ucu arasında basınç farkı oluşturulur ve örneğin kolona alınımı sağlanır. Basınç farkı, örnek kabına basınç uygulayarak, tampon kabına vakum uygulayarak veya örnek ve tampon kabı seviyeleri farklandırılarak yaratılır.

Elektrokinetik injeksiyonda, voltaj uygulanarak örnek kapiler içerisine alınır. Uygulanan voltaj yürütme voltajından daha düşüktür [22].

2.7 Örnek Dedeksiyonu

Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon çeşitleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 : Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon çeşitleri [24].

Teknik	Duyarlılık(M)
UV Absorbsiyon Dedeksiyonu	10^{-6}-10^{-4}
Floresans Dedeksiyonu	10^{-12}-10^{-15}
LIF Dedeksiyonu	10^{-9}-10^{-7}
Elektrokimyasal Dedeksiyon	10^{-8}-10^{-6}
Radyoizotop Dedeksiyonu	10^{-9}-10^{-7}
Kütle Spektrometre Dedeksiyonu	10^{-9}-10^{-5}

En çok kullanılan yöntemler UV absorpsiyon ve LIF dedeksiyonudur. Hassasiyetleri oldukça yüksektir. Aromatik bileşikler, proteinler, nükleik asitler, aminoasitler, DNA, peptitler, kolay indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddeler, protein, peptit, ilaç, iyonik organik bileşikler, aminler, şekerler, organik ve inorganik iyonlar hızlı ve kolay bir şekilde analiz edilebilirler.

2.8 Kapiler Elektroforez Teknikleri

CE' de çalışma amacına bağlı olarak kullanılan başlıca teknikler Çizelge 2.2' de verilmiştir.

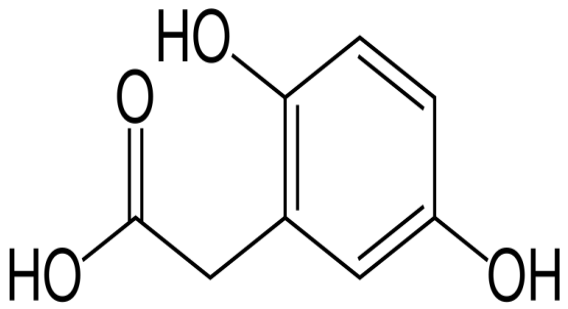
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez teknikleri [25].

CE Yöntemi	Tarifi
Kapiler bölge elektroforezi (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)	Ayırma, çözünenlerin elektroforetik hareketliliklerine bağlı olarak gerçekleşir ve kapiler içerisinde elektroforetik tampon içinde çözünmüş iyonik türlerin farklı hızlarla göç etmelerine dayanır.
Kapiler jel elektroforezi (Capillary Gel Electrophoresis, CGE)	Ayırma çözünenlerin büyüklüklerine bağlı olarak, çapraz-bağlanmış yapılı jel ile doldurulmuş kapiler içindeki deliklerden geçmeleriyle olur.
Miselli elektrokinetik kapiler elektro-kromatografi (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECK)	Temel ayırma mekanizması çözünenlerin miselli faz ile çözgen fazı arasındaki paylaşıma dayanır. CE'de bu yöntem sayesinde yük taşıyan moleküller birbirinden ayrılabildiği gibi, nötr moleküllerin ayrımı da mümkün olabilmektedir.
Kapiler elektrokromatografi (Capillary Electrochromatography, CEC)	Kapiler boru kromatografik dolgu maddesi (yada durağan faz) ile doldurulmuş veya kaplanmıştır. Kılcal boru içindeki akış elektroozmotik akış sayesinde (kimi zaman basınç takviyesi de kullanılarak) temin edilir. Kolondaki tutunma süresi , elektroforetik göç ve kromatografik tutunmanın bir bileşimi olarak belirlenir.
Kapiler izoelektirik (Capillary isoelectric focusing, CIEF)	Amfoter maddelerin izoelektrik noktalarına göre veya pI odaklama değerlerine göre ayrımı sağlanır. Elektrik alan uygulanacak kolon boyunca pH mevili olusturulur.
Kapiler izotakoforez (Capillary Isotachophoresis CITP)	Ayırma sürekli olmayan tampon çözelti içinde, çözünenlerin elektroforetik hareketliliklerine bağlı olarak hareket etmelerine dayalı olarak gerçekleşir. Bu şekilde iki çözgen arasında aynı hızlarda ilerleyen bir dizi bitişik bölge (örnek bölgeleri) oluşur.

3. HOMOGENTİSİK ASİT

3.1 Homogentisik Asit ve Alkaptonüri

Alkaptonüri; homogentisik asit oksidaz enzim eksikliğine bağlı gelişen, nadir görülen (250.000-1.000.000 insanda bir) otozomal çekinik metabolik bir hastalıktır. Homogentisik asidin kimyasal yapısı Şekil 3.1' de görülmektedir. Eksikliğin sebebi, homogentisik asit oksidaz (HAO) geninde değişiklik (mutasyon) olmasıdır. Bu enzim, homogentisik asidin (HGA) maleilasetik aside dönüşümünü sağlamaktadır (Şekil 3.2). Enzim eksikliği sonucu HGA vücutta birikir, idrarla atılmaya başlar. Doku ve idrardaki HGA oksijenle karşılaşınca benzokinona dönüşür. Benzokinonlar ise melanin benzeri polimerler oluşturur. Melanin benzeri polimerler bilhassa bağ dokusuna yerleşerek okronozis denilen, dokuda kahverengi-siyah renkte koyulaşmaya yol açar [26]. Okronozis terimi, 1866 yılında ilk kez Virchow tarafından bağ dokusunda sarı kahverengi pigment birikimi olarak tanımlanmıştır. Okronozis genellikle erişkinlerde görülür [10].



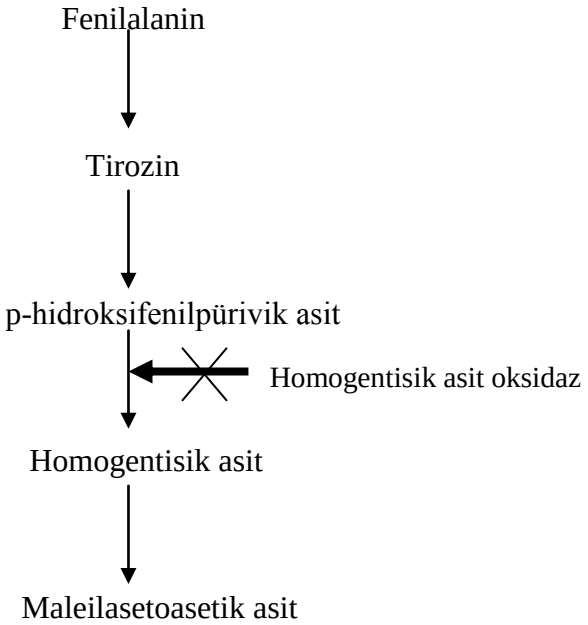
Şekil 3.1 : Homogentisik asidin kimyasal yapısı [27].

Artan yaşla birlikte hastalarda özellikle omurga ve diz, kalça gibi ağırlık taşıyan eklemlere yönelik, daha nadir olarak da omuz eklemlerine ve diğer üst ekstremite eklemlerine yönelik şikayetler ortaya çıkar [10].

İdrarda homogentisik asidin varlığı alkaptonüriyi gösterir. HGA ve ürünlerinin birikmesi doku renginde siyahlaşma dışında kemik, eklem, omurga ve kalp kapaklarında bozulma yapar. İdrarda siyahlık, sklerada ilerleyici beneklenme ve

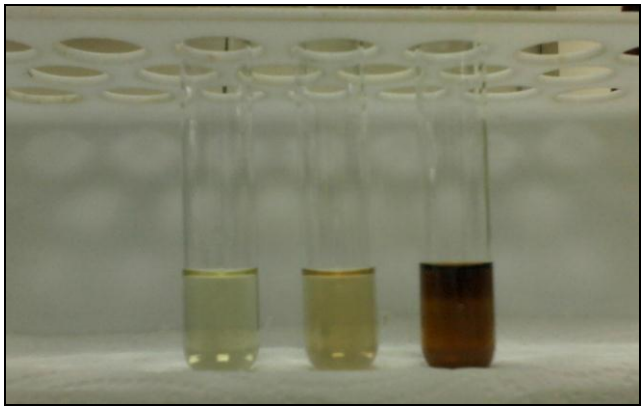
okronotik eklem bozukluğu karakteristik ve en sık karşılaşılan bulgulardır. Alkaptonüri, vücutta başlıca eklem kıkırdağı ve kalbi etkiler. HGA' nın özellikle bağ dokusunda birikmesi eklem, deri, göz, kardiovasküler sistem, genitoüriner sistem, solunum sistemi ve nadir olarak da santral sinir sistemi, diş ve endokrin sistem tutulumlarına neden olabilir. Hastaların yaşam sürelerini etkilemez.

Alkaptonürinin ciddi belirtileri erişkin dönemde ortaya çıkmaktadır. Çocukluk çağında ilk belirti, idrarda siyahlaşma ve bebek bezinde siyah lekelenmelerdir. Homogentisik asidi bulunduran idrar alkali ortamda hızla siyahlaşır. İdrar, ilk yapıldığında normal sarı renkteyken, birkaç saat içerisinde siyah renge dönüşür veya alkali madde teması ile kahverengiye dönüşür (Şekil 3.3) [26, 28].



Şekil 3.2 : Homogentisik asit metabolizması [21].

Şekil 3.3' de hastadan alınan bekletilmemiş, iki gün dışarıda bekletilmiş ve içerisine sodyum hidroksit eklenmiş idrar örnekleri görülmektedir. İdrara NaOH eklenmesi ile idrar rengi siyaha dönmüştür. Hastalığın teşhisinde, idrarda yüksek miktarda bulunan homogentisik asidin (alkapton) kantitatif tayini çok önemlidir. Fenilalanin ve tirozin metabolizmasındaki homogentisik asit oksidaz enziminin eksikliği, idrarda homogentisik asit miktarını arttırır. Son yıllarda yeni moleküler diagnostik tekniklerin gelişimiyle de semptomlar ortaya çıkmadan hastalığı tanımlamak mümkün hale gelmiştir [10]. Alkaptonürinin özel bir tedavisi yoktur. Ağrı kontrolu, fizyoterapi, hastanın ev programı konusunda eğitimi tedavi seçeneklerini oluşturur. Deneme aşamasında olan çeşitli tedavi yöntemleri şunlardır:



Şekil 3.3 : Homogentisik asidin idrarda kalitatif tayini

1. Yüksek dozda vitamin C (100mg/kg), homogentisik asidin oksidasyonunu ve polimerizasyonunu in vitro olarak engeller ancak uzun dönem kullanım sonuçları bilinmemektedir. N-asetilsistein ve vitamin E' nin de in vitro olarak homogentisik asidin polimerizasyonunu ve birikimini engellediğini gösteren çalısmalar vardır.

2. NTBC (Nitrotrifluoromethylbenzoylcyclohexanedione).

3. "HGA oksidaz" enzimini rekombinant teknoloji ile yerine koyma.

4. Tirozin ve fenilalaninden fakir, düşük proteinli diet önerilmektedir, ancak uygulamada pratikliği ve yararı tartışılmaktadır [28].

5. Bugün en etkin tek tedavi nitisinon tedavisidir. Bu ilaç, tirozin yıkım yolunda homogentisat oluşumunu sağlayan 4-hidroksifenil piruvat dioksigenaz enzimini engelleyerek etki eder. Nitisinon' un iki önemli yan etkisi vardır. Birincisi, serum tirozin düzeyini arttırarak gözde kuruluk, batma, ışığa hassasiyet, korneada yozlaşma ve kristal oluşumasıdır. İkincisi ise, suni olarak tirozinemi tip III oluşturur. Bu hastalığın en çok görülen etkileri beyin üzerindedir. Bu her iki önemli yan etkiden sakınmak için hastanın aldığı proteinin azaltılması tavsiye edilmektedir. Fakat tedaviye en uygun başlanma yaşı, ne kadar sürmesi gerektiği ve olası başka yan etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Gerekebilecek diğer tedavi yöntemleri ağrı kesiciler ve eklem, kas, bağ şikayetleri için cerrahi işlemlerdir [10,28].

3.2 Klinik Metabolitler

Analizlerde kullanılan klinik metabolitler idrar, kan serumu ve beyin omurilik sıvısıdır. Analizi en kolay yapılan metabolit ise idrardır.

3.3.1 İdrar

Böbrekler, insan vücudunda boşaltım sistemindeki önemli organlardan biridir. Fizyolojik dengeyi, toksinler ve metabolitler gibi istenmeyen bileşiklerin atılmasını sağlarlar. Atılan idrarda birbirinden farklı yapıda olan inorganik iyonlar, organik asitler, amino asitler, pürin ve pirimidinler gibi binlerce bileşik bulunur. Karakterisitk olan bazı metabolitlerin idrarda birikmesi birçok hastalığın belirtisi olabilmektedir.
Sağlıklı bireylerden alınan idrar örneği ile hasta bireylerden alınan örnek karşılaştırıldığında bulunan farklılıklar, hastalıkların teşhisinde önemli bir kriterdir [7].

İdrardaki protein konsantrasyonu, diğer biyolojik sıvılara (serum, beyin omurilik sıvısı) göre daha düşüktür. Örnek hazırlanması sadece seyreltme işlemini içermektedir, fakat; idrarda birçok bileşen olması nedeniyle analizlerin yapılması kolay olmamaktadır [7]. UV ve LIF ve MS dedektörle birleştirilmiş kapiler elektroforez ile idrardaki metabolitlerin analizi yapılabilmektedir [29,30].

4. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON

Kemometri, mümkün olduğu kadar az deney yapılarak çeşitli yöntemlerden elde edilen kimyasal verilere istatiksel ve matematiksel tekniklerin uygulanması ile bu verilerden daha fazla yararlı bilgilerin elde edilmesine olanak tanıyan bir disiplindir. Kemometri yalnızca veri değerlendirmede değil, deney tasarımında da yol gösterici olarak kullanılmaktadır [31].

Deneysel tasarım klasik ve kemometrik yöntemler olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Klasik yöntem ile, her bir parametrenin deney üzerindeki etkisini araştırmak için diğer bütün parametreler sabit tutularak, her seferinde bir parametre denenir. Klasik yöntemler ile yapılan deneysel çalışmalarda parametreler arasındaki etkileşimler göz ardı edilmekte, aynı zamanda çok zaman harcanmakta ve daha pahalıya mal olmaktadır.

Deneysel tasarımın amacı deney sayısını, maliyeti azaltmak ve zamandan tasarruf sağlamaktır [32]. İstatiksel deneysel tasarım yöntemleri ile, deneysel çalışmalarda tüm parametreler aynı anda incelenebilir. Klasik yöntemlerde karşılaşılan problemler, istatiksel deney tasarım yöntemleri ile giderilebilir. Kemometrik yöntemlerin avantajı belli bir modele gerek duyulmamasıdır. Model elde edildiği zaman optimizasyonu, regresyon modelleri ile gerçekleştirmek çok kolaydır. Modelde bir bağımlı değişken (yanıt) ve çeşitli bağımsız değişkenler (faktörler) vardır [33,34].

CE ayırma şartlarının optimizasyonunda kullanılan bağımlı değişkenler; ayırma etkinliği, geliş zamanı, rezolüsyon v.b. değişkenlerdir. Bunları etkileyebilen parametreler ise ayırma voltajı, tampon bileşimi, iyonik kuvvet, sıcaklık, kapiler uzunluğu, injeksiyon zamanı gibi geniş bir aralıkta değişen ayırma şartlarıdır. Optimum ayırma şartlarını belirlemek için kullanılan klasik yöntem, bir parametreyi değiştirirken, diğer parametreleri adım adım sabit tutmaktır. Ayırma şartlarını bu klasik yöntemi kullanarak araştırmak çok fazla deneysel işlem gerektirir ve deneyler yorucu, bıktırıcı ve zaman alıcıdır. Bu yöntemde başka bir etkileşim görüldüğü

zaman verilen herhangi bir değişkenin etkisi diğer değişkenlerin büyüklüğüne bağlı olduğu için tek değişkenli optimizasyon uygun değildir [35].

Kemometrik deneysel tasarım teknikleri ile yukarıda bahsedilen eksiklikler ortadan kaldırılabilir. Deney sayısı kemometrik yöntemler ile oldukça azaltılabilir. Kemometrik deneysel tasarım teknikleri, bir yöntemin geliştirilmesinin başlangıç aşamalarını ve analiz verilerinden, çok miktarda anlamlı bilginin çıkarılmasını içerir. Bunu az sayıdaki matematiksel çalışma ile pek çok parametrenin ard arda taranması takip eder [31,35].Yüksek verimli deneysel çalışmalar, kemometrik deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla yapılabilir. Deneysel tasarımın önemi, tarama tasarımları, optimizasyon, zaman tasarufu ve modelleme olarak dört madde ile açıklanabilir [33].

4.1 Tarama Tasarımları

Tarama tasarımları, deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörlerin belirlenmesi için kullanılır. Bu amaçla kullanılan tasarımlar full faktöriyel (FFD), fraksiyonel faktöriyel ve Plackett-Burman (PBD) tasarımlarıdır. Bu çalışmada kulanılan tarama tasarımı full faktöriyel tasarımdır.

4.1.1 Full faktöriyel tasarım

Full faktöriyel tasarım**,** sonuç (yanıt) üzerine etki eden faktörlerin hangileri ve ne kadar etkili olduğunun anlaşılmasında kullanılan iki seviyeli bir tarama tasarımıdır. Tasarımda deney sayısı $N= n^k$ formülü ile verilir. Burada n seviye sayısını, k faktör sayısını gösterir. İki seviyeli bir tasarımda, genel olarak deney sayısı 2^k ile hesaplanır. Seviyeler düşük seviye -1 ve yüksek seviye +1 olarak kodlanır. İki faktör için deney sayısı $2^2= 4$, üç faktör için 8' dir. Bu çalışmada dört faktör kullanılmıştır. Dört faktör için deney sayısı 16' dır.

Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	-1	0	1
pH	6	7	8
Tampon konsantrasyonu(mM)	10	20	30
Voltaj(kV)	20	24	28
İnjeksiyon basıncı(mbar)	40	60	80

Çizelge 4.2 : Full faktöriyel tasarım tablosu

Deney No	X_1	X_2	X_3	X_4
1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1
3	1	-1	1	1
4	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1
6	-1	1	-1	1
7	1	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	1
9	1	1	1	-1
10	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1
12	-1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1
14	-1	1	-1	-1
15	1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1

Çizelge 4.3 : Faktörlerin gerçek değerleri

Deney No	X_1	X_2	X_3	X_4	y
1	8	30	28	80	1,08
2	6	30	28	80	0,95
3	8	10	28	80	0,66
4	6	10	28	80	0,65
5	8	30	20	80	1,40
6	6	30	20	80	1,51
7	8	10	20	80	1,06
8	6	10	20	80	1,04
9	8	30	28	40	1,39
10	6	30	28	40	1,30
11	8	10	28	40	0,93
12	6	10	28	40	1,01
13	8	30	20	40	2,06
14	6	30	20	40	2,67
15	8	10	20	40	1,53
16	6	10	20	40	1,86

Birinici adımda, incelenen her bir faktör için düşük ve yüksek seviyeler belirlenir. Çizelge 4.1' de bu çalışmada incelenen faktörler ve seviyeleri görülmektedir.

İkinci adımda, kodlanmış seviyelere göre tasarım tablosu oluşturulur. Burada yüksek seviye (+1) ve düşük seviye (-1) dir (Çizelge 4.2).

Üçüncü adımda kodlanmış değerler yerine, faktörlerin gerçek değerleri yerleştirilerek deneysel çalışmalar gerçekleştirilir [33].

4.2 Optimizasyon

Optimizasyon tarama tasarımları ile bulunan önemli faktörlerin optimum değerleri, optimize edilerek iyileştirilebilir. Çok sayıda faktör incelendiğinde, klasik yöntemler zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır. İki seviyeli tasarımlar, her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Önemli faktörler belirlendikten sonra optimum değerlerin bulunması için merkezi kompozit tasarım (CCD) kullanılır. CE ayırmalarında en çok kullanılan deneysel tasarım yöntemleri PBG, BBD, CCD, FFD tasarımlarıdır [34-39]. Optimizasyon iki nedenle yapılır. Birincisi, deney sonucunu etkileyen faktörlerin optimum değerlerini bulmaktır. İkinci neden ise, her bir faktörün sonuca etkisini gösteren matematiksel modelin oluşturulmasıdır. Faktöriyel tasarımlar tekrarlanan deney sayısı ve parabolik etkileri incelemez. Önemli faktörler belirlendikten sonra parabolik etkiler ve faktörler arasındaki etkileşimler hesaplanır.

Merkezi kompozit tasarımda üç tür tasarım noktası vardır:

1. İki seviyeli full faktöriyel yada fraksiyonel faktöriyel
2. Star (eksenel) noktalar
3. Merkezi noktalar

Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki formülle belirlenir.

Deney sayısı= 2^k+2k+1 **(4.1)**

4.2.1 İki seviyeli faktöriyel noktalar

Bu noktalar 2^k ile gösterilir. Burada seviyeler (-1) ve (+1) olarak faktörlerin minimum ve maksimum değerlerini gösterir. İki faktörün olduğu durumda, 4 faktöriyel tasarım noktası vardır (Şekil 4.1).

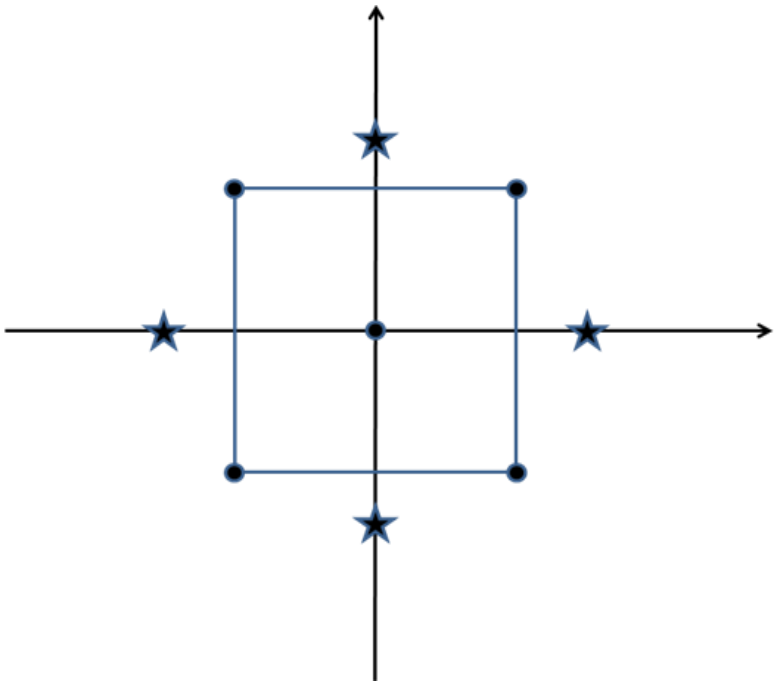
4.2.2 Star noktalar

Star noktalar, 2^k ile gösterilir ve seviyeler ±α değerlerini alır. α değeri $\pm\sqrt[4]{2^k}$ formülü ile hesaplanır. α, minimum ve maksimum değerlerin dışında bir değerdir ve genellikle 1' den büyüktür. α' nın değeri star noktaların yerini belirler. Bu noktalar modelin eğriliğini belirlemede kullanılır. Bu tasarım dairesel bir simetriye sahiptir.

4.2.3 Merkezi noktalar

(4.1) nolu formülde 1 ile gösterilen kısımdır. Orta seviyedeki deney sayısını gösterir. Seçilen faktörlerin 0 seviyesindeki noktalardır. 0 ile gösterilen seviye, faktörler için belirlenen minimum ve maksimum değerlerin ortalaması alınarak bulunur. Merkezi noktalar, deneysel hataları tespit etmek için 4 -6 kez tekrarlanır.

Bu çalışmada, merkezi kompozit tasarımın 2^k full faktöriyel yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde ilk adım, bağımlı değişken (yanıt) üzerinde etkisi olduğu düşünülen bağımsız değişkenleri (faktörleri) ve bunların seviyelerini belirlemektir. Tampon konsantrasyonu ve ayırma voltajı olarak iki faktör seçildiğinden, 2^2 full faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Rezolüsyon, yanıt (bağımlı değişken, y) olarak alınmıştır. Faktörlerin çalışma aralıkları ve 5 farklı seviyedeki değerleri Çizelge 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.1 : CCD için tasarım noktaları.

α değeri $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ eşitliğinden $\alpha = \sqrt[4]{2^2}$ = 1.414 olarak bulunmuştur. 2^k full faktöriyel noktaları göstermektedir. Bu çalışmada regresyon analizi Microsoft EXCEL ile yapılmıştır.

2^2 full faktöriyel tasarımda, faktörler iki seviyeli (+1,-1) olup deney sayısı 4' tür. Bu çalışmada, 4 faktöriyel nokta, 2*2=4 star noktası, 6 merkezi nokta seçilerek toplam deney sayısı 14(4+4+6) olarak belirlenerek Çizelge 4.4' de tasarlanan deney ve faktörler, deneysel kısımda gösterilen Çizelge 6.2' de deney planı oluşturulmuştur.

Çizelge 4.4 : Optimizasyon deneyleri için tasarlanan deney ve faktörlerin değerleri

	Kodlanmış değerler		Deneysel değerler		
Deney no	X_1(voltaj) kV	X_2(kons.) mM	X_1	X_2	Tasarım Noktaları
1	-1	-1	20	10	Faktöriyel
2	-1	1	20	40	Faktöriyel
3	1	-1	28	10	Faktöriyel
4	1	1	28	40	Faktöriyel
5	-α	0	18,3	25	Star
6	α	0	29,7	25	Star
7	0	-α	24	3,79	Star
8	0	α	24	46,41	Star
9	0	0	24	25	Merkez
10	0	0	24	25	Merkez
11	0	0	24	25	Merkez
12	0	0	24	25	Merkez
13	0	0	24	25	Merkez
14	0	0	24	25	Merkez

4.3 Model Oluşturma

Tarama tasarımı ve optimizasyon sonucu her bir faktörün etkisi matematiksel modelle ifade edilebilir. Böylece deneysel sonucun yanında, hesapla, tahmini sonuç da bulunmuş olur. Beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği kontrol edilir.

İstatiksel deneysel tasarımdan elde edilen veriler çoklu lineer regresyon yöntemi kullanılarak değerlendirilir. Yanıtlar polinomiyel fonksiyonlar ile tanımlanır. Tarama tasarımları için aşağıdaki polinomiyel eşitlik;

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad \textbf{(4.2)}$$

Merkezi kompozit tasarımı için ise;

$$y = b_0 + \sum_1^k b_i x_i + \sum_1^k b_{ii} x_i^2 \sum_{i<j}^k b_{ij} x_i x_j \quad \textbf{(4.3)}$$

şeklinde verilir. Burada y: yanıt; $x_1, x_2 \ldots\ldots x_k$: faktörler; $b_i \ldots b_k$: regresyon modeli ile belirlenen katsayılar; $b_{ij}x_ix_j$: faktörler arasındaki etkileşimi; $b_{ii}x_i^2$ ise modelin eğriliğini tanımlar [31].

Hesaplamalar için faktörler arasındaki etkileşimleri de içine alan bir tasarım matrisi oluşturularak veriler analiz edilir ve yukarıdaki matematiksel modellerden biri oluşturulur.

b katsayıları tasarım matrisi, bir kare matris ise aşağıdaki lineer denklem ile hesaplanabilir.

$$y=D.b \quad \textbf{(4.4)}$$

$$b=D^{-1}.y \quad \textbf{(4.5)}$$

y: yanıt D: Tasarım matrisi b:katsayılar

Tasarım matrisi, kare matris değil ise katsayıların hesaplanması aşağıdaki şekilde yapılır:

$$y=b.X \quad \textbf{(4.6)}$$

Buradan b katsayısı

$$b=(X'X)^{-1}X'.y \quad \textbf{(4.7)}$$

(4.7) eşitliğinden hesaplanır. Bulunan b katsayıları, doğru denkleminde yerine konulur.

Full faktöriyel tasarımda, her bir faktörün ve faktörlerin etkileşimlerinin, deney sonucuna etkileri incelenir. Full faktöriyel tasarım faktör sayısı 4-5 olduğunda kullanılılır. Bundan daha fazla faktör varsa, örneğin, 7 faktör için 128 deney, 10 faktör için 1024 deney yapmak gerekir. Bu durumda diğer tasarımlar kullanılır [33].

Bu çalışmada optimum değerler polinomal eşitliğin yani modelin x_1 ve x_2 göre kısmi türevlerinin alınıp, sıfıra eşitlenmesiyle bulunmuştur [41].

5. DENEYSEL

5.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Deneysel çalışmalarda, UV-Visible Dedektör (Lambda1000, Bishoff, Leonberg, Germany) ile birleştirilmiş Prince Technologies (Emmen, Netherland) kapiler elektroforez injeksiyon sistemi kullanılmıştır. Tampon çözeltileri Metrohm marka pH-metre ile hazırlanmıştır. Analizlerin gerçekleştiği silika kapiler kolonlar, Polymicro teknolojiden temin edilmiştir.

Deiyonize su, Purelab Option Q7-15 cihazından elde edilmiştir.

5.2 Kimyasal Maddeler

Homogentisik asit Fluka'dan, Benzoik ve Hippürik asit Merck' ten temin edilmiştir. Fosforik asit ve Tris (hidroksimetil) aminometan Riedel-de Haën, Sodyum hidroksit ve Borat Merck marka kullanılmıştır.

5.3 Elektroforetik Koşullar

Ayırmada kullanılan silika kapiler çapı 75µm I.D.× 60 cm toplam (etkin boyu 46 cm) uzunluktadır. Çalışma tamponu olarak 10-50 mM H_3PO_4 kullanılmış olup ve tamponun pH'ı 1.0M NaOH ile ayarlanmıştır. Çalışma tamponu her gün yeni hazırlanarak kullanılmıştır.

Silika kapiler, her günün başında ve sonunda 15 dakika 1.0M NaOH ile ardından 5 dakika deiyonize su ile son olarak da 10 dakika çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Kapilerin sıcaklığı 25°C' de sabitlenmiştir. Dedeksiyon, UV dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışılan dalga boyu 190 nm olarak seçilmiştir.

5.4 Standartların Hazırlanması

Homogentisik asitten 1.68 mg alınarak 10 ml'ye tamamlanıp, 1.0 mM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hippürik ve Benzoik asit için de aynı yöntem izlenmiştir.

5.5 İdrar Örneklerinin Hazırlanması

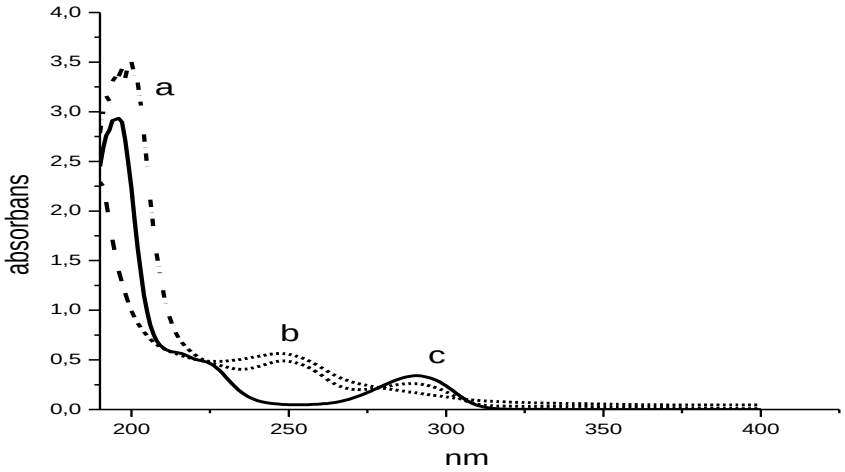
Sağlıklı ve hasta bireylerden alınan idrar örnekleri 100 kat seyreltilerek kullanılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HGA' nın Şekil 3.1' de görülen molekül yapısına göre CE ile UV dedektör kullanarak tayin edilebileceği anlaşılmaktadır. pK_a değerinin de 4.40 olması nedeniyle pH 6 ve üzerindeki pH değerlerinde negatif yüklü olacağı söylenebilir. Bu durumda HGA normal bir silika kapilerde polarite değiştirilmeden tayin edilebilir. Şekil 6.2' de de görüldüğü gibi, uygulanan voltaja bağlı olarak HGA piki 3-6 dakika arasında gelmektedir.

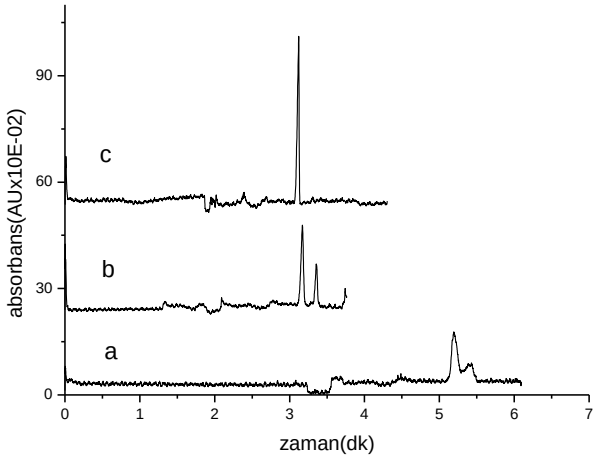
6.1 Çalışma Tamponunun Belirlenmesi

Çalışma tamponunu belirleyebilmek için 3 farklı tampon çözelti denenmiştir. 20 mM Fosforik asit pH: 7.0, 20 mM Tris pH: 8.0, 20 mM Borat pH: 9.4 tamponları ile injeksiyonlar yapılmış ve bu injeksiyonlar sonucunda elde edilen pikler neticesinde, örneklerin UV spektrumları alınmıştır (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 : Farklı tamponlarda hazırlanan HGA örneğinin UV spektrumları (a) Tris (b) Borat (c) Fosforik asit.

Borat, tris ve fosforik asit tamponları ile injeksiyonlar yapıldı. Borat ile çalışıldığında pikin omuzlu gelmesi, tris ile iki pik gözlenmesi örneğin bu tamponlarda bozulduğunun göstergesidir (Şekil 6.2).

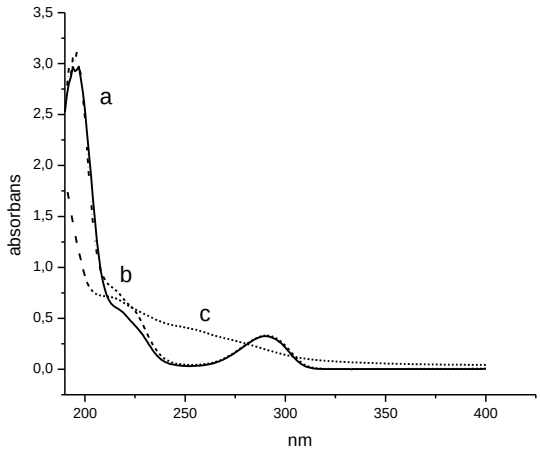


Şekil 6.2 : Farklı tamponlarda hazırlanan HGA örneğinin elektroferogramları (a) 20 mM Borat pH=9.4, 20kV, 100mbar, 0.10dk, 190nm (b) 20 mM Tris pH=8.0, 28kV, 100mbar, 0.10dk, 190nm (c) 20 mM H_3PO_4 pH=7.0 28kV, 100mbar, 0.10dk, 190nm.

Fosforik asit tamponu ile yapılan injeskiyon ve alınan UV spekturmunda 190 nm' de yüksek bir absorbans olduğu gözlenmiştir. Bu tamponda 250 nm' de bir pik görülmemiştir. Bu nedenlerle, çalışma tamponu olarak H_3PO_4 olarak belirlenmiştir.

6.1.1 Tampon pH' ının belirlenmesi

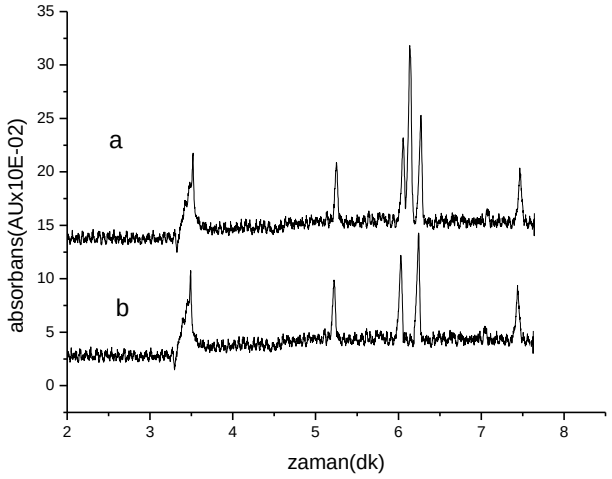
Çalışma tamponun pH' ını belirleyebilmek için farklı pH' larda hazırlanan tamponların alınan UV spekturumlarında, yüksek pH' larda hazırlanan örneklerin 190 nm' deki absorbansının önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Çalışma tamponun pH' ı 7.0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.3 : Farklı pH' lardaki H_3PO_4 tamponu ile hazırlanan örneklerin UV spekturumu (a) pH= 7 (b) pH=3 (c) pH=11.

6.2 İdrarda HGA Piklerinin Saptanması

HGA' nın idrar örneğindeki yerini tespit etmek için bir idrar örneği injekte edilmiştir. Bu elektrofereogram Şekil 6.4' de görülmektedir. İdrarda çeşitli organik asitlerin ayrılmasının gerçekleştirildiği bir çalışmada, HGA' nın hippurik asit ve ürik asit arasında geldiği görülmektedir [42]. Şekil 6.4.a' daki elektroferogramdan HGA' nın bu iki asit arasında geldiği görülmektedir. Fakat, Hippurik asit ile HGA pikleri tam olarak ayrılmamışlardır. Bu asitlerin ayrılmalarını optimize etmek için merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Sadece 14 deney yapılarak optimum şartlar tespit edilmiştir.



Şekil 6.4 : İdrar örneğinin elektroferogramları **(**a) 0.05mM HGA spike yapılmış idrar örneği (b) İdrar örneği (20mM H_3PO_4, pH=7.0, 60mbar, 20kV).

6.3 Deneysel Tasarım ve Metot Optimizasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar

Deneysel tasarım yönteminde izlenen yöntemler ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir.

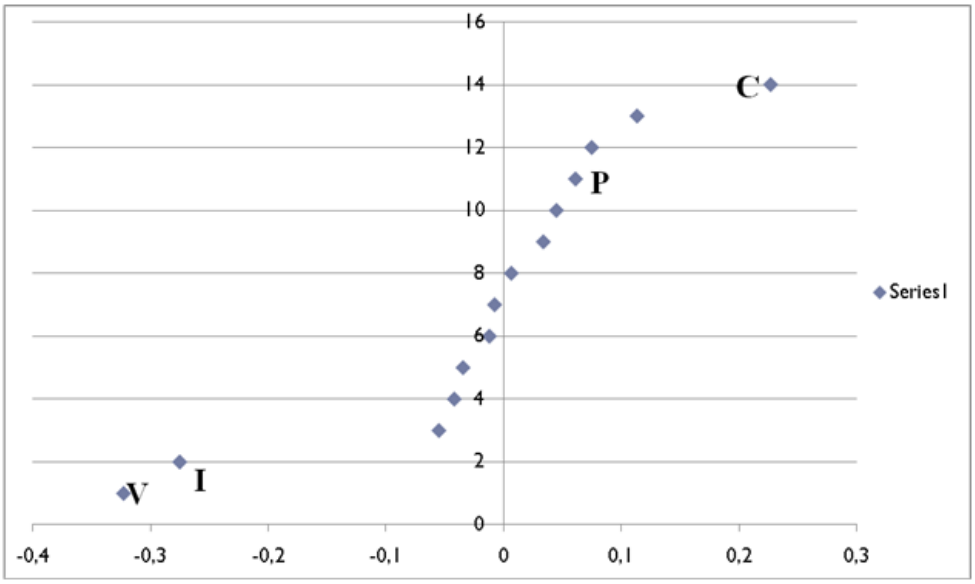
6.3.1 Faktöriyel tasarım ile etkili faktörlerin bulunması

Bölüm 4.1.1'de açıklanan yöntemle Çizelge 4.2' de verilen tasarım tablosu kullanılarak faktörler ve aralarındaki etkileşimleri incelemek için iki seviyeli full faktöriyel tasarım kullanılmış ve bu amaçla 16 deney gerçekleştirilmiştir. Bu tarama tasarımı ile faktörler arasındaki mümkün olan etkileşimler belirlenmiştir. Rezolüsyon **(2.15)** nolu eşitlikten hesaplanmıştır. Faktörler için tasarım matriksi ve yüksek ve düşük seviye değerleri, hesaplanan yanıtla birlikte kodlu değerler Çizelge 4.3' de,

deneysel değerler de Çizelge 4.2' de verilmiştir. Deneyler rasgele sıra ile gerçekleştirilmiştir. Tarama analizi Microsft EXCEL programı kullanılarak analiz edilmiş ve bulunan faktörler ve tüm etkileşimleri için katsayılar ve p değerleri Çizelge 6.1' de belirtilmiştir.

Çizelge 6.1 : Matematiksel model için katsayılar, faktörler ve faktörler arası etkileşimleri için p-değerleri

	Katsayılar	*P-değeri*
Kesim	1,3189	0,0060
P	-0,0551	0,1401
C*	**0,2265**	**0,0346**
V*	**-0,3228**	**0,0243**
I *	**-0,2752**	**0,0285**
P*C	-0,0078	0,6397
P*V	0,0745	0,1044
P*I	0,0608	0,1274
C*v	-0,0421	0,1813
C*I	-0,0347	0,2175
V*I	0,1131	0,0691
P*C*V	0,0446	0,1716
P*C*I	0,0063	0,7003
P*V*I	-0,045	0,1687
C*V*I	0,0335	0,2245
P*C*V*I	-0,0123	0,8313



Şekil 6.5 : Normal olasılık grafiği

Katsayılar için çizilen normal olasılık grafiğinden etkili faktörlerin C, V ve I olduğu görülmektedir. Ayrıca etkili faktörler p-değerlerinden de belirlenebilir. Hangi

faktörlerin etkili olduğunun belirlenmesi p-değerlerine bakılarak da bulunabilir. Etkili faktörlerin p-değerleri 0,05 anlamlılık düzeyinden küçük olmalıdır. P-değeri küçük olan faktörler C, V ve I' dır. Tüm etkileşimlerin p-değeri>0,05 dir. Bu sonuçlardan, faktörler arasındaki etkileşimlerin rezolüsyona bir etkisi olmadığını söyleyebiliriz. Böylece tarama tasarımının analiz sonuçlarından, tampon konsantrasyonu (C), injeksiyon (I) ve uygulanan voltajın (V) en etkili faktörler olduğu belirlenmiştir.

6.3.2 Optimizasyon

Optimum şartların bulunması için Çizelge 4.4' de belirtilen merkezi kompozit tasarım kullanılarak deneysel çalışmalar yapıldı. Pik rezolüsyonunu (yanıtı) etkileyen faktörler olarak, tampon konsantrasyonu ve ayırma voltajı alınarak injeksiyon basıncı ve tampon pH' ı deneyler boyunca sabit tutuldu.

Çizelge 6.2'de tasarlanan deneyler ve faktörlerin gerçek değerleri gösterilmektedir. Deneyler rastgele sıra ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 6.2 : İki faktörlü CCD için faktörlerin seviyeleri ve elde edilen yanıtlar.

	Kodlanmış değerler		Deneysel değerler		
Deney no	X_1(voltaj) kV	X_2(kons.) mM	X_1	X_2	Rezolüsyon
1	-1	-1	20	10	0,98
2	-1	1	20	40	1,94
3	1	-1	28	10	1,13
4	1	1	28	40	2,18
5	-1.414	0	18,3	25	1,70
6	1.414	0	29,7	25	1,73
7	0	-1.414	24	3,79	0
8	0	1.414	24	46,41	2,25
9	0	0	24	25	1,63
10	0	0	24	25	1,62
11	0	0	24	25	1,64
12	0	0	24	25	1,65
13	0	0	24	25	1,65
14	0	0	24	25	1,66

Piklerin geliş zamanları ve genişlikleri kullanılarak **(2.15)** formülünden rezolüsyon değerleri hesaplandı.

Yanıtlar ve faktörler arasındaki ilişkileri belirlemek için yanıt yüzey metodu kulllanıldı. Tasarımda kullanılan voltaj ve konsantrasyon değerleri için; V(voltaj), K (konsantrasyon), V^2, K^2 değerleri hesaplandı.

Değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon denklemi aşağıdaki şekilde

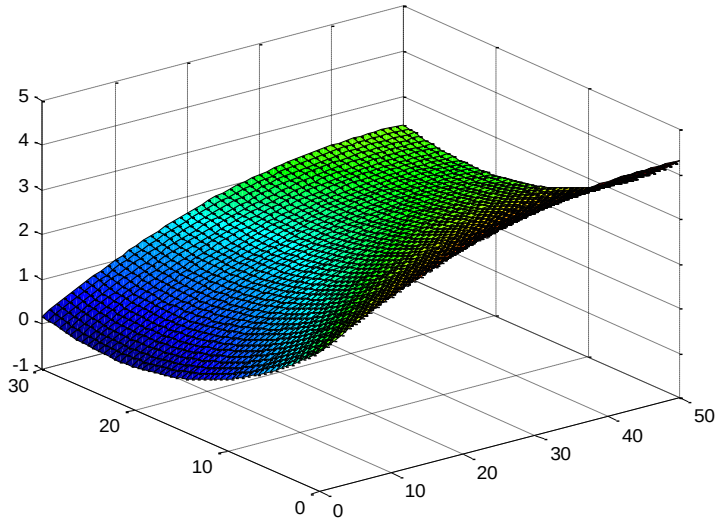
$$Rs = 2.126 - 0.195V + 0.0930K + 0.00434V^2 - 0.00099K^2 \quad \textbf{(6.1)}$$

üretilmiştir:

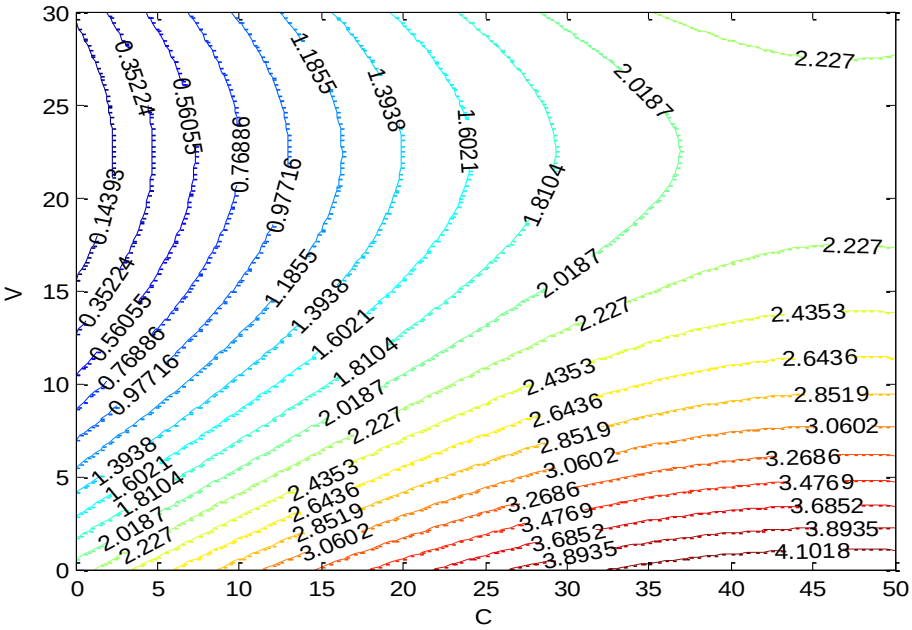
Çoklu belirleme katsayısı olan R^2 , 0,94368 olarak hesaplanmıştır. Bu katsayı Rs' deki değişimin ne kadarının faktörlerce açıklanacağını gösterir. Bu matematiksel modelin uygun olduğunu söyleyebiliriz.

Şekil 6.6' da rezolüsyona etki eden konsantrasyon ve voltajın üç boyutlu grafiği gösterilmiştir. Bu grafik iki faktörün hem birbirleri, hem de yanıt üzerindeki etkilerini göstermektedir. Grafikte belirtilen renk aralıkları farklı rezolüsyon değerlerini göstermektedir. Örneğin; kırmızı bölgeler yüksek, mavi renkli bölgeler düşük rezolüsyon değerlerini göstermektedir. Şekil 6.7' de ise kontur grafiği görülmektedir. Bu şekillerden de görüldüğü gibi düşük tampon konsantrasyonu ve yüksek voltaj aralığında ayrılmanın iyi olmadığı ama düşük voltaj aralığında, tüm konsantrasyon değerleri boyunca rezolüsyonun iyi olduğu olduğu görülmektedir.

Optimum noktalar, bölüm 4.3' de ifade edildiği gibi V(voltaj) = 22 kV ve K(tampon kons.) = 47 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 6.6 : Konsantrasyon ve voltajın etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği.

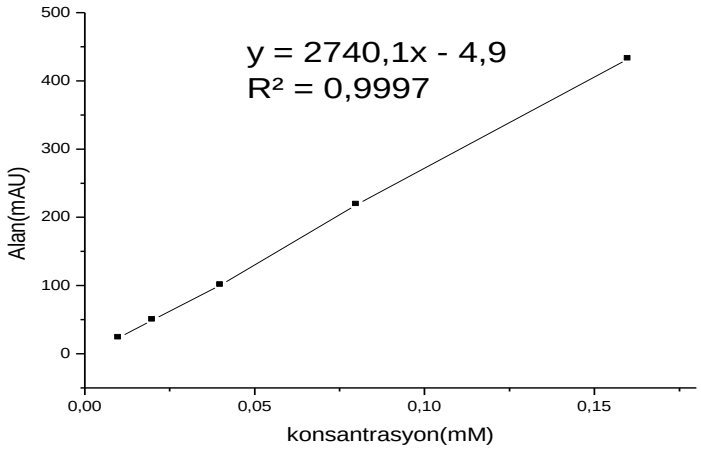


Şekil 6.7 : Rezolüsyona, konsantrasyon ve voltajın etkisini gösteren kontur grafiği.

Bu optimum şartlar kullanılarak hasta idrar örneğinde metot validasyonu yapılmıştır.

6.4 Metot Validasyonu

İdrardaki homogentisik asit miktarını tayin edebilmek için 0,01-0,02-0,04-0,08-0,16 mmol/ml konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Şekil 6.8' de görülmektedir.



Şekil 6.8 : Homogentisik asitin kalibrasyon eğrisi.

Kalibrasyon denklemi y = 2740,1x - 4,9 olarak bulunmuştur. Doğrusal regrasyon değeri 0.9997dir.

6.5 Tekrarlanabilirlik Değerleri

Tekrarlanabiliriliği hesaplayabilmek için homogentisik asit standardı ardarda yedi kez injekte edilmiştir. Geliş süresi ve alanların %RSD olarak tekrarlanabilirlik değerleri Çizelge 6.3' de görülmektedir.

Çizelge 6.3 : Tekrarlanabilirlik değerleri.

	A(Pik Alanı)%RSD	t(Geliş Süresi)%RSD
Gün içi	1,19	0,37

6.6 Geri Kazanım Değerleri

1:100 seyreltilmiş hasta idrar örneklerine, üç farklı konsantrasyonda standart madde ilavesi yapılarak geri kazanım analizleri yapılmıştır. Çizelge 6.4' de idrar örneği üzerine ilave edilen homogentisik asit miktarlarının geri kazanım değerleri görülmektedir.

Çizelge 6.4 : Geri kazanım değerleri.

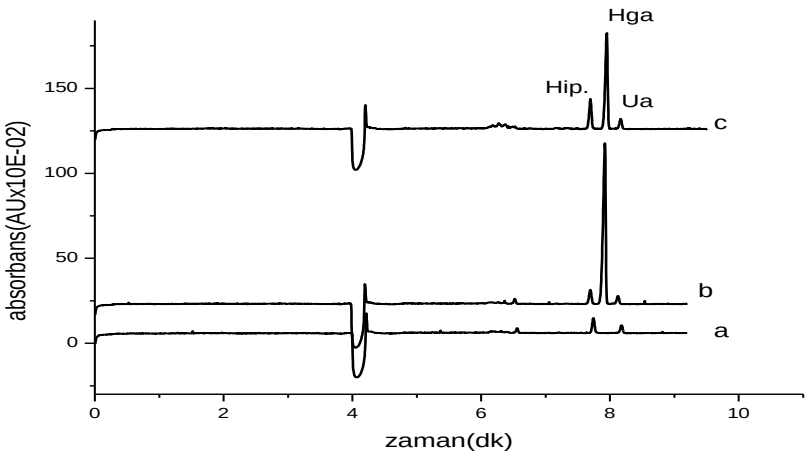
eklenen madde konsantrasyonu	%geri kazanım
0.01 mmol/ml	93.0
0.02mmol/ml	95.1
0.04mmol/ml	96.8

6.7 Dedeksiyon Sınırı Değeri (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Metot için LOD değeri, gürültünün üç katı sinyal kabul edilerek hesaplanmıştır. Homogentisik asit için LOD değeri $3.3x10^{-3}$ mM (0.56µg/ml) olarak tayin edilmiştir. LOQ değeri ise $1.1x10^{-2}$ mM (1.85µg/ml) olarak bulunmuştur.

6.8 Hasta İdrar Örneğindeki HGA Miktarı

Optimize ve valide edilen yöntem ile alkaptonüri tanısı konulmuş bir hasta idrar örneğinde HGA tayini uygulaması yapılmıştır. Şekil 6.9c' de hasta idrar örneğinin elektroferogramı görülmektedir. Bu idrar örneğindeki HGA konsantrasyonu 5.78 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 6.9 : (a) Sağlıklı bireyden alınan idrar örneği, (b) 0.1mM HGA spike yapılmış idrar örneği, (c) hasta idrar örneği.

6.9 Sonuç

Bu çalışmada alkaptonüri hastalığının teşhisi için idrar örneklerinde HGA' nın nicel analizi için direkt UV dedeksiyonu kullanarak basit, güvenilir, ucuz ve hızlı bir CE metodu geliştirilmiştir.

Metodun optimizasyonu merkezi kompozit tasarım kullanılarak sadece 14 deney yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yanıt yüzeyi ile pikler arasında iyi bir rezolüsyon sağlayan optimum elektroforetik şartları belirlenmiştir. Optimum şartlar 47 mM fosforik asit (pH=7.0) ve 22 kV ayırma voltajı olarak bulunmuştur. Bu tespit edilen şartlar altında yöntem valide edilmiştir. Optimum şartlar altında 46 cm uzunluğunda bir kapilerde 6 dakika gibi kısa bir sürede hızlı bir analiz sağlanmıştır. Yöntem hasta idrar örneklerinde HGA tayini için uygulanmıştır. İdrar örnekleri, sadece su ile seyreltilerek injekte edilmiştir. Optimize ve valide edilen yöntem, alkaptonüri hastalığının tanısında HGA' nın analizi için uygun bir yöntem olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] **Url-1** http://www.genbilim.com/content/view/6771/33/, alınıdğı tarih 10.03.2011

[2] **Cansever M.S., Aktuğlu-Zeybek A. Ç., Erim F. B.,** 2010. Determination of NTBC in serum samples from patients with hereditary tyrosinemia type I by capillary electrophoresis**,** *Talanta* 80 1846–1848.

[3] **T. He, d. Quinn, E. Fu, Y.K. Wang**, 1999. Analysis of diagnostic metabolites by capillary electrophoresis–mass spectrometry, *J Chromatog B*, 727 43-52.

[4] **J.F. Holland, J.J. Leary, C.C. Sweeley**, 1986. *J. Chromatogr.*,379 3.

[5] **T. Niwa**, 1986. *J. Chromatogr*., 379 313.

[6] **Jellum E., Kvittingen E.A., Thoresen O., Guldal G., Horn L., Seip R., Scand O. Stokke,** 1986. *J. Clin. Lab. Invest*.,46 (Suppl. 184) (1986) 11.

[7] **Ramautar R., Demirci A., Gerhardus J. de Jong**, 2006. Capillary electrophoresis in metabolomics, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. **25**, No. 5, 2006.

[8] **Cansever Ş., Erim F.B.**, 2005. Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I, *J.Chromatogr.B*, 818 (2): 309-311, 2005.

[9] **Keller JM, Macaulay W, Nercessian OA, Jaffe IA**, 2005. New Developments In Ochronosis. *Review Of The Literature*. Rheumatol Int 2005; 25: 81-85.

[10] **Unlu İ., Nacır B., Ulaşlı A. M., Erdem H. R.**, 2008: Okronotik Spondiloz ve Artropati: Olgu Sunumu Fırat Tıp Dergisi;13 (3): 220-223.

[11] **Seegmıller J. E., Zannoni Vixcent G., Laster Leonard, Akd Beht N. La Du** , 1961. An Enzymatic Spectrophotometric Method For The Determination Of Homogentisic Acid In Plasma And Urine, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. **236**, No. 3, March 1961.

[12] **Consden R., Forbes H. A. W., Glynn L. E. , Stanıer Wınıfred M.** 1951**,** "Observations On The Oxidation Of Homogentisic Acid In Urine" Vol.**50**.

[13] **Feldman J.M., Bowman J.,** 1973**.** Urinary Homogentisic Acid: Determination By Thin Layer Chromatography *Clin.Chem*., 19/5,459-462(1973).

[14] **Olah A.V., Ilyes I, Szoke A., Csizy I., Toth J., Varga J.** , 2003. Urinary Homogentisic Acid In Alkaptonuric And Healty Children, *Clin Chem Lab Med* 2003, 41: 356-359.

[15] **Zoutendam P. H., Bruntlett C. S., Kissinger P. T.,** 1976. Determination Of Homogentisic Acid In Serum And Urine By Liquid Chromatography With Amperometric Detection, *Analytıcal Chemistry,* Vol. **48**, No. 14, December 1976.

[16] **Markus A. Patrick J.A., Swinkels D. W., Jakobs B. S., Wevers R. A., Trijbels J.M.F., Willems H. L.**, 2001. New technique for diagnosis and monitoring of alcaptonuria: quantification of homogentisic acid in urine with mid-infrared spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 429 (2001) 287–292.

[17] **Y. Huang, X. Jiang, W. Wang, J. Duan, G. Chen**, 2006. *Talanta*,70 (2006) 1157–1163.

[18] **Özden S., Ertan R., Akı-Şener E., Yalçın İ.,** 2004. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi**,** *Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2*.

[19] **Tanbay E.,** 2010. Protein Ayırma Saflaştırma Yöntemleri, Elektroforez ve İki Yönlü Elektroforez(2d), *Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kayseri.

[20] **Aydın H.M.,** 2007. Unlarda Katkı Maddesi Bromatın Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[21] **Cansever M.Ş.,** 2010. Metabolik Hastalıkların Teşhisinde Kapiler Elektroforez *Doktora Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[22] **Heiger D.** ,2000. *High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction*, Agilent Technologies, Germany.

[23] **Url-2**<http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm>, alındığı tarih 28.04.2011

[24] **Başkan S.,** 2005. Adaçayının (Salvia Officinalis) antioksidan bileşikleri rosmarinik ve karnosik asitin kapiler elektroforez ile tayini, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[25] **Karakaş B., Certel M.**, 2006. Kapiler Elektroforez Tekniği ve Gıda Analizlerinde Kullanım Olanakları, Tahıl Proteinlerinin Analizine Getirdigi Açılımlar Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu.

[26] **Eyüp A., H. Y.,** 2010. İdrarı Siyahlaştıran Hastalık: Alkaptonüri *Güncel Pediatri Dergisi*, 2010; 8: 78-80.

[27] **Url-3**<http://www.wikidoc.org/index.php/Homogentisic_acid>, alınıdğı tarih 15.02.2011

[28] **Aytuğ A.F., Gürbüz O., Ergun T., Kotiloğlu E.**, 2002. Endojen okronozis: Bir alkaptonüri olgusu. *TÜRKDERM* ; 36:276-279 2002.

[29] **Dolnik V., Dolnikova J.**, 1995. *J. Chromatogr*., A 716 (1995) 269.

[30] **Baena B., Cifuentes A., Barbas C.**, 2005. Analysis Of Carboxylic Acids In Biological Fluids By Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis* 2005, *26*, 2622-2636.

[31] **Harons V.**, 2003. *Aspects of optimization of separations of drugs by chemometrics*, Acta Universitatis Upsaliensis, UPPSALA.

[32] **Mongomery, D., C.**, 2005. *Design and Analysis of Experiments*, 6th Ed. Hoboken, NJ : John Wiley & Son.

[33] **Brereton R. G.** 2003. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.* John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.

[34] **Hanrahan Eds. G., Gomez F. A.** , 2010. *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis* ,John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

[35] **Hanrahan G., Montes R., and Gomez F.A**., 2008. Chemometric experimental design based optimizationtechniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications, *Anal Bioanal Chem* (2008) 390:169–179.

[36] **Gong W.J., Zhang Y.P., Choi S.H., Zhang, Y.J., Lee, K.P**., 2006. Application of response surface methodologies in capillary electrophoresis, *Mıcrochımıca Acta*, Vol: **156** Issue: 3-4 Pages: 327-335 2006.

[37] **Sentellas S., Saurina J.**, 2003: Chemometrics in capillary electrophoresis. Part A: Methods for optimization, *Journal Of Separatıon Scıence* ,Vol: **26** 875-885 2003.

[39] **Capella-Peir´o M.E., Devasish B., Rubert M. F. , Esteve-Romero J.**, 2006. Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B*, 839 (2006) 95–101.

[40] **Fukuji T.S., Tonin F.G., Tavares M.F.M**. , 2010: Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis *Journal Of Pharmaceutıcal And Bıomedıcal Analysıs , Vol.: 51* Issue: 2 Special Issue: Sp. Iss. SI Pages: 430-438 JAN 20 2010.

[41] **Morgan E. ,** 1997. "*Chemometrics : Experimental Design",* John Wiley & Sons Ltd. London.

[42] **Barbas C., Garcıa A., Miguel L., Simo C.,** 2002. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis,*Journal of Chromatography B*, 780 (2002) 73–82.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Gülfem Sultan Balta

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 1987

Lisans Üniversite: Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Kimya,Biyoloji