

**PEPTİD YAPILI GASTROİNTESTİNAL SİSTEM
HORMONLARINDAN GRELİN VE MOTİLİN'İN
İNSAN PLAZMASINDA TAYİNİ İÇİN
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Doktora Tezi

Sakine ATİLA KARACA

Haziran 2022

**PEPTİD YAPILI GASTROİNTESTİNAL SİSTEM HORMONLARINDAN
GRELİN VE MOTİLİN'İN İNSAN PLAZMASINDA TAYİNİ İÇİN
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Sakine ATİLA KARACA

DOKTORA TEZİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2022**

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1807S252 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Sakine Atila Karaca'nın "Peptid Yapılı Gastrointestinal Sistem Hormonlarından Grelin ve Motilin'in İnsan Plazmasında Tayini için Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu" başlıklı tezi 31/05/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR
Üye :	Prof. Dr. Ali ÖZCAN
Üye :	Doç. Dr. Erol ŞENER
Üye :	Doç. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

PEPTİD YAPILI GASTROİNTESTİNAL SİSTEM HORMONLARINDAN GRELİN VE MOTİLİN'İN İNSAN PLAZMASINDA TAYİNİ İÇİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Sakine ATİLA KARACA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

Grelin ve motilin peptit yapılı gastrointestinal sistem hormonlarıdır. Yapısal olarak benzer olan bu moleküllerin memelilerde gastrointestinal hareketliliği uyarmada, gastrik boşalmayı hızlandırmada ve gastrik açlığı indüklemeye rol oynadığı bilinmektedir. Grelin ayrıca büyüme hormonu salgılanması, gut hareketliliğinin ayarlanması, mide ve bağırsak korunmasında da önemli oynamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında grelin ve motilin'in insan plazmasında miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemleri geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Floresans dedeksiyon için analitler floreskamin ile türevlendirilmiştir. İki yöntemde de ayırım C₈ kolonda (4,6 x 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), trifloroasetik asit içeren su ve asetonitrilden oluşan hareketli fazlar kullanılarak yapılmış ve gradient elüsyon uygulanmıştır. Dedeksiyon 390 nm eksitasyon ve 495 nm emisyon dalgaboylarında yapılmıştır. Grelin ve des-asil grelin için geliştirilen yöntem 20-800 ng/mL derişim aralığında doğrusaldır. Tayin sınırı grelin ve des-asil grelin için sırasıyla 11,32 ng/mL ve 9,81 ng/mL olarak belirlenmiştir. Motilin tayini için geliştirilen yöntem 2-200 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuş, tayin sınırı 1,84 ng/mL olarak hesaplanmıştır. İki yöntemin de özgünlük, kesinlik ve doğruluğu gösterilmiş, analit çözeltilerinin farklı çalışma koşullarındaki stabilitesi incelenmiştir. Motilin için geliştirilen yöntemin insan plazmasındaki uygulaması, beş sağlıklı gönüllüden toplanan plazmada motilin miktarlarının ölçülmesi ile gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Grelin, Motilin, Peptit, Miktar tayini, Kromatografi.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR QUANTIFICATION OF PEPTID STRUCTURED GASTROINTESTINAL SYSTEM HORMONES, GHRELIN AND MOTILIN IN HUMAN PLASMA

Sakine ATİLA KARACA

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

Ghrelin and motilin are peptide structured gastrointestinal system hormones and belong to the same peptide family (ghrelin/motilin peptide family). These structurally similar molecules are known to play a role in inducing gastrointestinal motility, accelerating gastric emptying, and inducing gastric lavage. Ghrelin is also known to play an important role in the protection of the stomach and intestines as well as the regulation of growth hormone secretion and gut mobility.

In this thesis, two High Performance Liquid Chromatography methods were developed and validated for the quantification of ghrelin and motilin in human plasma. Analites were derivatized with fluorescamine for fluorescence detection. Separation was performed on a C₈ column (4,6 x 150 mm, 3,5 µm particles) using water and acetonitrile containing trifluoroacetic acid as a mobile phase. Gradient elution was used in both methods. The method developed for ghrelin and des-acyl ghrelin determination was linear in the range of 20-800 ng/mL. The quantification limits for ghrelin and des-acyl ghrelin were found 11,32 and 9,81 ng/mL, respectively. The method developed for motilin was found linear in the range of 2-200 ng/mL. The quantification limit for motilin was 1,84 ng/mL. Specificity, precision and accuracy of both methods were evaluated and stability of the analyte solutions in different working conditions were investigated. The application of the method developed for motilin was demonstrated by measuring the amounts of motilin in human plasma samples collected from five healthy volunteers.

Keywords: Ghrelin, Motilin, Peptide, Quantification, Chromatography.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve kaynaklarını benden esirgemeyen, her alanda bana yol gösterici olan ve bu zorlu süreçte her zaman desteğiyle yanımda yer alan değerli danışman hocam Prof. Dr. Duygu Yeniceli Uğur'a teşekkürlerimi sunarım.

Analitik Kimya'ya dair öğrettikleri bilgilerin yanı sıra ilk günden itibaren yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tez çalışmasında kıymetli katkıları bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek Ak, Doç. Dr. Erol Şener ve Dr. Öğr. Üyesi Arın Gül Dal Poçan'a teşekkür ederim. Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarım Prof. Dr. Göksel Arlı, Prof. Dr. Nafiz Öncü Can ve değerli çalışma arkadaşlarım Saniye Özcan ve İnci Barut'a destek ve yardımları için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na, kütle spektrometresi analizlerinin gerçekleştirildiği Anadolu Üniversitesi Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarı (DOPNA) yönetimine ve analizleri gerçekleştiren Öğr. Gör. Serkan Levent'e, laboratuvarları bünyesindeki cihazları kullanmama olanak sağlayan Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) yönetimine ve Süleyman Yur'a, biyolojik numunelerin toplanması konusundaki yardımları için Doç. Dr. Tuncer Temel ve Doç. Dr. Halide Edip Temel'e ve immünolojik yöntemlerin yürütülmesi için laboratuvarlarını bana açan Doç. Dr. Özlem Atlı Eklioğlu'na teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde bana değerli bir yol arkadaşı olan arkadaşım Merve Baysal'a hem manevi desteği hem de deneyler sırasındaki yardımları için teşekkür ederim. Aynı alanda çalışmaktan keyif aldığım ve birçok şeyi birlikte öğrendiğim kıymetli arkadaşlarım Sema Koyutürk, Z. Ceren Ertekin Özkan ve Sercan Yıldırım'a, uzaklarda bile hep yanımda gibi hissettiren ve çalışmalarlarıyla bana heyecan veren değerli arkadaşlarım Bahar Akyüz ve Ezgi Öner Bozkurt'a, destekleri ile her zaman yanımda olan ve bu süreçte motivasyonumu yüksek tutmamda yardımcı olan değerli arkadaşlarım Elif Kaya Tilki, M. Güçlü Özarda, Yasin Darı ve Aslıhan Kubilay'a, her ihtiyacım olduğunda bana kıymetli zamanlarını ayıran ve yardımcı olan Uzm. Dr. Ersem Giritli ve Sırma Giritli'ye teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında içtenlikle ve sabırla bana yardımcı olan, hep daha iyisi için teşvik eden ve en büyük destekçim olan eşim Ömer Faruk Karaca'ya teşekkür ederim. Her zaman beni cesaretlendiren ve destekleyen sevgili annem Nezihâ Atila, babam Cuma Ali Atila, teyzem Hatice Yağan ve kardeşim Ömer Selim Atila başta olmak üzere bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sakine ATİLA KARACA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Aminoasitler	3
2.2. Peptit ve Proteinler	4
2.3. Grelin/Motilin Peptit Ailesi	5
2.3.1. Grelin	5
2.3.1.1. Yapı	5
2.3.1.2. Kimyasal özellikler	6
2.3.1.3. Biyolojik fonksiyonlar	6
2.3.2. Motilin.....	7
2.3.2.1. Yapı	7
2.3.2.2. Kimyasal özellikler	7
2.3.2.3. Biyolojik fonksiyonlar	7
2.4. Peptitlerin Analiz Yöntemleri.....	8
2.4.1. İmmünolojik yöntemler.....	8

2.4.2. Kromatografik yöntemler	9
2.4.3. Kütle spektrometresi	9
2.5. Grelin ve Motilin Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler.....	9
2.6. Floresans Türevlendirme.....	13
2.6.1. Floresans türevlendirme ile ilgili genel bilgiler	13
2.6.2. Peptitlerin floresans özellikleri ve türevlendirilmesi.....	13
2.7. Kemometri ve Deneysel Tasarım.....	16
2.7.1. Deneysel tasarımın basamakları	16
2.7.1.1. Sorunun tanımlanması	17
2.7.1.2. Yanıt değişkeninin seçilmesi.....	17
2.7.1.3. Faktörlerin ve faktör seviyelerinin seçilmesi	17
2.7.1.4. Deneysel tasarımın seçilmesi	17
2.7.1.5. Deneylerin yapılması	18
2.7.1.6. Verinin istatistiksel analizi	18
2.7.1.7. Sonuçların değerlendirilmesi ve öneriler.....	18
2.7.2. Deneysel tasarımlar	18
2.7.2.1. Tarama tasarımları	19
2.7.2.1.1. Tam faktöriyel tasarımlar	19
2.7.2.1.2. Parçalı faktöriyel tasarımlar	21
2.7.2.2. Yanıt yüzey tasarımları.....	21
2.7.2.2.1. Merkezi bileşen tasarımı.....	22
2.7.2.2.2. Box-Behnken tasarımı	23
2.7.3. Matematiksel modelleme.....	24
2.7.4. İsteklilik fonksiyonları.....	28
3. GEREÇLER.....	30
3.1. Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler	30

3.3. Kullanılan Bilgisayar Programları.....	31
4. YÖNTEM.....	32
4.1. Grelin Tayini.....	32
4.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	32
4.1.2. Çalışma çözeltilerinin hazırlanması.....	33
4.1.3. Türev koşulları	33
4.1.4. Kromatografik koşullar.....	33
4.1.5. Analitik yöntem validasyonu.....	34
4.1.5.1. Kesinlik ve doğruluk.....	34
4.1.5.2. Doğrusallık.....	34
4.1.5.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	35
4.1.5.4. Özgünlük.....	35
4.1.5.5. Stabilite	35
4.1.5.6. Geri kazanım	35
4.1.6. Analitlerin insan plazmasında tayini	36
4.2. Motilin Tayini	36
4.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	36
4.2.2. Çalışma çözeltilerinin hazırlanması.....	36
4.2.3. Numunelerin hazırlanması.....	37
4.2.4. Türev koşulları	37
4.2.5. Kromatografik koşullar.....	37
4.2.6. Analitik yöntem validasyonu.....	37
4.2.6.1. Kesinlik ve doğruluk.....	38
4.2.6.2. Doğrusallık.....	38
4.2.6.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	38
4.2.6.4. Özgünlük.....	38
4.2.6.5. Stabilite	39

4.2.6.6. Geri kazanım	39
4.2.7. Analitlerin insan plazmasında tayini	39
5. BULGULAR ve YORUM.....	40
5.1. Türev Koşullarının Optimizasyonu.....	40
5.1.1. Türev ajanının seçilmesi ve ön denemeler	40
5.1.2. Parçalı faktöriyel tasarım.....	53
5.1.3. Box-Behnken tasarımı	55
5.2. Grelin Tayini.....	60
5.2.1. Kromatografik yöntemin optimizasyonu.....	60
5.2.2. Yöntem validasyonu	63
5.2.2.1. Kesinlik ve doğruluk.....	63
5.2.2.2. Doğrusallık.....	64
5.2.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	65
5.2.2.4. Özgünlük.....	65
5.2.2.5. Stabilite	66
5.2.2.6. Geri kazanım	67
5.2.3. Yöntemin uygulanması.....	69
5.3. Motilin Tayini	70
5.3.1. Kromatografik yöntemin optimizasyonu.....	70
5.3.2. Yöntem validasyonu	77
5.3.2.1. Kesinlik ve doğruluk.....	77
5.3.2.2. Doğrusallık.....	78
5.3.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı.....	79
5.3.2.4. Özgünlük.....	79
5.3.2.5. Stabilite	80
5.3.2.6. Geri kazanım	80
5.3.3. Yöntemin uygulanması.....	81

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....83

KAYNAKÇA.....87

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Yaygın olarak bulunan 20 amino asidin isimleri ve kısaltmaları.	3
Tablo 2.2. Grelin ve motilin analizinde kullanılan sıvı kromatografisi yöntemleri.	12
Tablo 2.3. Peptitlerin floresans türevlendirilmesinde kullanılan bazı türev ajanları ve özellikleri.	15
Tablo 2.4. İki seviyeli iki faktörlü tam faktöriyel tasarımda deney planı.	20
Tablo 2.5. İki seviyeli üç faktörlü tam faktöriyel tasarımda deney planı.	20
Tablo 2.6. Üç faktörlü merkezi bileşen tasarımında deney planı.	23
Tablo 2.7. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımında deney planı.	24
Tablo 2.8. Çoklu regresyon kullanılarak deneysel veri için oluşturulmuş matematiksel model için varyans analizi.	27
Tablo 5.1. Grelin'in türev bileşenlerine ait kütle/yük değerleri.	51
Tablo 5.2. Parçalı faktöriyel tasarımda kullanılan faktörler ve seviyeleri.	53
Tablo 5.3. Parçalı faktöriyel tasarıma göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.	53
Tablo 5.4. Parçalı faktöriyel tasarım için hesaplanan katsayılar.	54
Tablo 5.5. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.	55
Tablo 5.6. Box-Behnken tasarımına göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.	56
Tablo 5.7. Box-Behnken tasarımı için hesaplanan katsayılar.	57
Tablo 5.8. Optimizasyon sonucu beklenen ve gözlenen yanıt değerleri.	59
Tablo 5.9. Grelin ve des-asil grelin için hesaplanan sistem uygunluk parametreleri.	63
Tablo 5.10. Grelin ve des-asil grelin için kesinlik ve doğruluk verileri.	64
Tablo 5.11. Grelin ve des-asil grelin için doğrusallık verileri.	65
Tablo 5.12. Grelin ve des-asil grelin için stabilite verileri (n = 3).	67
Tablo 5.13. Numunelerde ELISA kiti ile ölçülen grelin ve des-asil grelin miktarları. ...	70
Tablo 5.14. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.	72
Tablo 5.15. Box-Behnken tasarımına göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.	72

Tablo 5.16. Box-Behnken tasarımı için hesaplanan katsayılar.	74
Tablo 5.17. Motilin için hesaplanan sistem uygunluk parametreleri.	77
Tablo 5.18. Motilin için kesinlik ve doğruluk verileri.....	78
Tablo 5.19. Motilin için doğrusallık verileri.....	79
Tablo 5.20. Motilin için stabilite verileri (n = 3).....	80
Tablo 5.21. Motilin'e ait geri kazanım değerleri.....	81
Tablo 5.22. Numunelerde ölçülen motilin miktarları.	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı.	3
Şekil 2.2. Peptitlerin genel yapısı (Sewald ve Jakubke, 2009).	4
Şekil 2.3. Grelin'in amino dizilimi (Kaiya, 2016).	5
Şekil 2.4. Motilin'in amino asit dizilimi (Poitras, 2013).	7
Şekil 2.5. Doğal floresans özellik gösteren fenil alanin, tirozin ve triptofan'ın absorpsiyon ve emisyon spektrumları (A: absorpsiyon, E: emisyon) (Lakowicz, 2006). ..	14
Şekil 2.6. Faktör seviyelerinin kodlu gösterimi.	19
Şekil 2.7. İki seviyeli iki faktörlü tam faktöriyel tasarımın gösterimi.	19
Şekil 2.8. İki seviyeli üç faktörlü tam faktöriyel tasarımın gösterimi.	20
Şekil 2.9. İki seviyeli üç faktörlü parçalı faktöriyel tasarımın gösterimi.	21
Şekil 2.10. Üç seviyeli iki faktörlü parçalı faktöriyel tasarımın gösterimi.	22
Şekil 2.11. Üç faktör için merkezi bileşen tasarımın gösterimi.	22
Şekil 2.12. Üç faktör için Box-Behnken tasarımın gösterimi.	24
Şekil 2.13. Kontur grafiği ve yanıt yüzey grafiği örnekleri.	28
Şekil 5.1. OPA ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltilisinin kromatogramları.	41
Şekil 5.2. FMOC ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltilisinin kromatogramları.	42
Şekil 5.3. Floresein ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltilisinin kromatogramları.	43
Şekil 5.4. NBD-F ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltilisinin kromatogramları.	44
Şekil 5.5. Floreskamin ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltilisinin kromatogramları.	45
Şekil 5.6. Floreskamin ile türevlendirilmiş grelin çözeltilisinin YPSK-FL ile elde edilmiş kromatogramı. Analiz koşulları: C ₁₈ kolon (100 × 4,6 mm, 3,5 µm, 300 Å); gradient program, 25 dakikada % 30-50 B, hareketli faz içeriği A:%0,1 formik asit içeren su, B:%0,1 formik asit içeren asetonitril; 0,3 mL/dk akış hızı, 50°C kolon sıcaklığı, 390 nm eksitasyon dalgaboyu, 480 nm emisyon dalgaboyu.	45

Şekil 5.7. YPSK-KS kromatogramları (a) türevlendirilmemiş grelin çözeltisi, (b) boş türev çözeltisi, (c) floreskamin ile türevlendirilmiş grelin çözeltisi. Analiz koşulları: C ₁₈ kolon (100 × 4,6 mm, 3,5 µm, 300 Å); gradient program, 25 dakikada %30-50 B, hareketli faz içeriği A:%0,1 formik asit içeren su, B:%0,1 formik asit içeren asetonitril; 0,3 mL/dk akış hızı, 50°C kolon sıcaklığı.....	47
Şekil 5.8. YPSK-KS spektrumları (a) 1.pik (11,3. dakika), (b) 2.pik (13,5. dakika), (c) 3.pik (14,5. dakika), (d) 4.pik (19,8. dakika), (e) 5.pik (21,2. dakika), (f) 6.pik (27,5. dakika).....	50
Şekil 5.9. Floreskamin ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) motilin çözeltisinin kromatogramları.....	52
Şekil 5.10. Modele ait terimlerin anlamlılığını gösteren Pareto grafiği.....	58
Şekil 5.11. Genel isteklilik (D) için oluşturulan modele ait kontur ve yanıt yüzey grafikleri.	59
Şekil 5.12. Kolon cinsinin grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	60
Şekil 5.13. Hareketli faza eklenen trifloroasetik asit miktarının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	61
Şekil 5.14. Akış hızının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	61
Şekil 5.15. Kolon sıcaklığının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	62
Şekil 5.16. Belirlenen optimum kromatografik koşullarda yapılmış boş plazma (kırmızı) ve des-asil grelin ve grelin içeren plazma (siyah) analizlerine ait kromatogramlar.....	63
Şekil 5.17. Boş plazma ve artan derişimde des-asil grelin ve grelin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları (aşağıdan yukarıya doğru boş plazma, 40, 125 ve 500 ng/mL des-asil grelin ve grelin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları verilmiştir).	64
Şekil 5.18. Boş plazma numunelerine ait kromatogramlar.	66
Şekil 5.19. Kolon cinsinin motilin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	71
Şekil 5.20. Hareketli faza eklenen trifloroasetik asit miktarının motilin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.	71
Şekil 5.21. Modele ait terimlerin anlamlılığını gösteren Pareto grafiği.....	75

- Şekil 5.22.** Genel isteklilik (D) için oluşturulan modele ait kontur ve yanıt yüzey grafikleri.76
- Şekil 5.23.** Box-Behnken tasarımı sonucu bulunan optimum kromatografik koşullarda yapılmış boş plazma (kırmızı) ve motilin içeren plazma (siyah) analizlerine ait kromatogramlar.77
- Şekil 5.24.** Boş plazma ve artan derişimde motilin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları (aşağıdan yukarıya doğru boş plazma, 7,5; 30 ve 120 ng/mL motilin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları verilmiştir).78
- Şekil 5.25.** Boş plazma numunelerine ait kromatogramlar.79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans Analizi
BSS	: Bağıl Standart Sapma
DAD	: Diyot Dizisi Dedektör
DNS-Cl	: Dansil Klorür
EIA	: Enzim İmmünoanaliz (Enzyme İmmunoassay)
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FMOC-Cl	: Florenilmetiloksikarbonil Klorür
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı (International Conference on Harmonization)
KS	: Kütle Spektrometresi
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
NBD-Cl	: 4-kloro-7-nitrobenzofurazan
NBD-F	: 4-floro-7-nitrobenzofurazan
OPA	: Orto-ftalaldehit
PVDF	: Polivinilidin Florür
RIA	: Radyoimmünoanaliz (Radioimmunoassay)
SK-KS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
UV	: Mor Ötesi (Ultraviyole)

YPSK : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Grelin ve motilin peptit yapılı gastrointestinal sistem hormonlarıdır. Bu iki peptit aynı peptit ailesinde yer alır (grelin/motilin peptit ailesi) ve yapısal olarak benzerdir. İki molekül de memelilerde postprandial periyodu kısaltmaktadır. Grelin ve motilin gastrointestinal hareketliliği uyarmada, gastrik boşalmayı hızlandırmada ve gastrik açlığı indüklemeye rol oynar. Grelin'in büyüme hormonu salgılanmasını ve gut hareketliliğini ayarlamasının dışında mide ve bağırsak korunmasında da önemli rol oynadığı bilinmektedir (Chih-Yen ve Chang-Youh, 2012; Sakata, 2011).

Birçok farklı ve önemli fizyolojik fonksiyonda rol olan grelin ve motilin'in plazma seviyelerinin izlenmesi için uygun yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu peptitlerin miktar tayini genellikle radyoimmünoanaliz (RIA), enzim bağılı immüno-sorbent analizi (ELISA) ve enzim immünoanaliz (EIA) gibi immüno-lojik yöntemler ile yapılmaktadır. Bu yöntemler kolay ve duyarlı yöntemler olmasına rağmen moleküllerdeki benzer bağlanma bölgeleri nedeniyle bazen yeterli özgünlük ve seçiciliği sağlayamamaktadır (Eslami, Ghassempour ve Aboul-Enein, 2017; Mesmin vd., 2011). İmmüno-lojik yöntemler özel ekipman gerektiren pahalı yöntemlerdir. Sayılan bu olumsuzluklar nedeniyle geliştirilecek olan alternatif analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

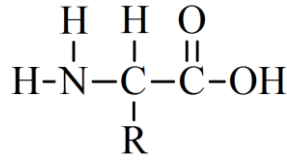
Kromatografik yöntemler yüksek özgünlük ve seçicilik sağlayan yöntemler olmaları, farklı kromatografik modlarda ayırma olanak veren çok sayıda kolon çeşidinin bulunması, yöntem transferinin kolaylığı, kısa analiz süresi gibi avantajları nedeniyle biyoanalizlerde en sık tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemler kütle spektrometrisi (KS) ya da floresans dedektör gibi duyarlılığı yüksek analitik cihazlarla kombine edildiğinde yüksek hassasiyet avantajı ile de immüno-lojik yöntemlere iyi bir alternatif olmaktadır. Literatürde motilin için geliştirilmiş bir, grelin için ise birkaç Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (SK-KS) yöntemi bulunmaktadır (Delinsky vd., 2004; Eslami vd., 2016; Rauh, Gröschl ve Rascher, 2007; Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014). Ancak KS cihazlarının yüksek maliyetleri nedeniyle yaygın olmayışı bu yöntemlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle grelin ve motilin'in analizinde kullanılacak floresans dedektörlü kromatografik yöntemlerin bu peptitlerle yürütülen çalışmalarda büyük yarar sağlayacağı ve literatüre önemli bir katkı olacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında grelin ve motilin'in insan plazmasında miktar tayini için kullanılabilecek seçici ve duyarlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) yöntemleri geliştirilmiştir. Analitlerin insan plazmasındaki düşük derişimlerini tayin edebilmek için analitler floresans boyalarla türevlendirilmiş ve floresans dedektörlü YPSK ile belirlenmiştir. Türev koşullarının optimizasyonu ve kromatografik optimizasyon sürecinin bir kısmı deneysel tasarım yöntemi ile yürütülmüştür. Geliştirilen yöntemler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) biyoanalitik yöntem validasyonu ve Uluslararası Uyumlandırma Konferansı'nın (ICH) analitik yöntem validasyonu kılavuzlarına uygun olarak valide edilmiştir (FDA, 2018; ICH, 2005). Motilin için geliştirilen yöntem beş sağlıklı gönüllüden alınan insan plazmasındaki motilin tayininde kullanılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Aminoasitler

Amino asitler peptitleri ve proteinleri oluşturan yapıtaşlarıdır. Prensipte olarak, "amino asit" terimi, bir amino grubu içeren ve asidik fonksiyonu olan herhangi bir bileşiği belirtmek için kullanılabilir. Uygulamada ise bu terim genellikle doğal kaynaklardan izole edilen α -amino karboksilik asitlere referansla kullanılır. α -amino asitlerin genel yapısı Şekil 2.1'deki gibidir. Genel kural olarak, karboksilik grubun bağlandığı karbon atomuna alfa (α) karbon denir (Powar ve Chatwal, 2007).



Şekil 2.1. Amino asitlerin genel yapısı.

Günümüzde 200'den fazla amino asit izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu amino asitlerin sadece 25 tanesi tipik proteinlerin hidrolizi sonucu elde edilmekte ve 20 tanesi de çoğu proteinin yapısında yer almaktadır (Powar ve Chatwal, 2007). Sık görülen bu 20 amino asidin adları ve kısaltmaları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Yaygın olarak bulunan 20 amino asidin isimleri ve kısaltmaları.

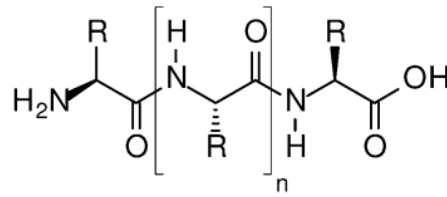
Amino asit	3 harfli kısaltma	Tek harfli kısaltma
Glisin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Lösin	Leu	L
İzolösin	Ile	I
Prolin	Pro	P
Fenilalanin	Phe	F
Triptofan	Trp	W
Metiyonin	Met	M
Tirozin	Tyr	Y
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Sistein	Cys	C
Asparajin	Asn	N

Tablo 2.1. (Devam) Yaygın olarak bulunan 20 amino asidin isimleri ve kısaltmaları.

Glutamin	Gln	Q
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Lizin	Lys	K
Arjinin	Arg	R
Histidin	His	H

2.2. Peptit ve Proteinler

Peptitler amino asitlerin oligomerleri veya polimerleridir ve bir amino asidin karboksi grubu ile onu takip eden amino asidin amino grubu arasında oluşan amid bağları (peptit bağları) ile oluşurlar (Şekil 2.2). Amino asitlerdeki farklı yan zincirler (R), biyokimyasal etkiye katkıda bulunur (Sewald ve Jakubke, 2009).



Şekil 2.2. Peptitlerin genel yapısı (Sewald ve Jakubke, 2009).

Peptitler içerdikleri amino asit sayılarına göre di-, tri-, tetra-, ..., nona-, dekapeptitler gibi Yunan ön-ekleriyle sınıflandırılır. Genellikle 10'dan az amino asit içerenler oligopeptit, 10-100 arası amino asit içerenler polipeptit olarak adlandırılır. 100'den fazla amino asit içeren türevler için ise protein ifadesi kullanılır. Peptit formüllerini basitleştirmek için amino asit dizilimleri üç harfli kodlar kullanılarak ve amino ucu sol tarafta, karboksi ucu sağ tarafta olacak şekilde yazılır (Sewald ve Jakubke, 2009).

Proteinlerin yapısı, dört seviyede düşünülebilir. Birincil yapı, peptit zinciri içindeki peptit bağları ile ardışık olarak bağlanan amino asitlerin sayısını ve dizisini içerir. İkincil yapı, peptit yapısının üç boyutlu düzenlemesini ifade eder. Tersiyer yapı, amino asit yan zincirleri ve ikincil yapı elemanları arasındaki moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanan tek bir peptit zincirinin üç boyutlu yapısını veya genel şeklini tarif eder. Kuaterner yapı terimi, kovalent olmayan etkileşimlerle ilişkili iki veya daha fazla polipeptit zincirinin veya disülfür bağları ile bağlantılı özel durumlarda, belirli oligomer kompleksleri oluşturan konumsal düzenlemesini ifade eder (Sewald ve Jakubke, 2009).

2.3. Grelin/Motilin Peptit Ailesi

Grelin ve motilin peptitleri amino asit dizilişlerindeki ve reseptörlerindeki benzerlik nedeniyle aynı peptit ailesinin üyeleri olarak nitelendirilmektedir. Her iki peptidin de memelilerde postprandial periyodu kısalttığı bilinmektedir. Grelin ve motilin'in gastrointestinal hareketliliği uyarmada, gastrik boşalmayı hızlandırmada ve gastrik açlığı indüklemeye rol oynadığı bilinmektedir (Chih-Yen ve Chang-Youh, 2012; Sakata, 2011).

2.3.1. Grelin

Grelin ilk olarak mideden salgılanan bir büyüme hormonu salgılatıcı olarak 1999 yılında keşfedilmiştir. "Grelin" ismi, "büyüme" anlamına gelen Proto-Hint-Avrupa dillerindeki bir kelime kökü olan "ghre" ye dayanır ve bu peptidin büyüme hormonu salınımını uyarma kabiliyetine işaret eder (Takei, Ando ve Tsutsui, 2015).

2.3.1.1. Yapı

Grelin, diğer adıyla lenomorelin, 28 amino asitten oluşan bir peptittir ve molekül ağırlığı 3371,9 g/mol'dur (Kaiya, 2016). Peptidin amino asit dizilimi Şekil 2.3'te verilmiştir. Bu dizilimde üçüncü sırada yer alan serin amino asidinde bulunan yağ asidi (oktanoil) modifikasyonu peptit aktivitesi için gereklidir. Grelin kan dolaşımında, asil modifikasyonunun çeşidine göre asile olmayan (des-asil), oktanoile, heksanoile, dekanoile grelin gibi farklı şekillerde bulunabilir. Ayrıca C-ucundaki arjinin amino asidini taşımayan 27 amino asitli grelin formlarına da rastlanmıştır. İnsan plazmasında toplam grelin miktarının büyük bir kısmını des-asil grelin oluşturmasına rağmen grelin'in aktivitesinden sorumlu formu oktanoile grelin'dir (Eslami, Ghassempour ve Aboul-Enein, 2017).

H – Gly – Ser – Ser (n-oktanoil) – Phe – Leu – Ser – Pro – Glu – His – Gln – Arg – Val – Gln – Gln – Arg – Lys – Glu – Ser – Lys – Lys – Pro – Pro – Ala – Lys – Leu – Gln – Pro – Arg – OH

Şekil 2.3. Grelin'in amino asit dizilimi (Kaiya, 2016).

2.3.1.2. Kimyasal özellikler

Farklı çalışmalarda grelin'in suda, asetik asit veya formik asit içeren suda çözünür olduğu bildirilmiştir (Eslami vd., 2016; Rauh, Gröschl ve Rascher, 2007; Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014).

İzoelektrik nokta molekülün net yükünün sıfır olduğu pH değeridir (Novák ve Havlíček, 2016). Bu nokta herhangi bir peptid için çözünürlüğünün en düşük olduğu nokta olması açısından önemlidir. Grel'in izoelektrik noktasının 11,5 olduğu bildirilmiştir (Min vd., 2012).

2.3.1.3. Biyolojik fonksiyonlar

Grel'in, büyüme hormonu salgılatıcı reseptörlerin endojen ligantıdır. Üretimi midede yapılan bu peptidin asıl aktif olduğu bölgeler beyin ve hipofizdir. Grel'in hipofizden büyüme hormonu salınımını uyarma ve kilo alımını artırma etkilerinin yanı sıra iştah açıcı ve gıda alımını artırıcı etkileri de bulunmaktadır. Açlık durumunda midede salgılanan bu peptid yapıli hormon, merkezi sinir sistemine açlık sinyalini iletir. Grel'in gastrik asit salınımını etkiler, gastrointestinal motiliteyi artırır ve gastrik boşalmayı hızlandırır. Grel'in ayrıca mide koruyucu ve bağırsaklarda enflamasyon düzenleyici etkileri de bulunmaktadır (De Vriese vd., 2004; Kojima vd., 2013; Peeters, 2013).

Grel'in en çok midede salgılansa da bağırsak, böbrek, hipofiz, pankreas, plasenta, akciğer, testis ve ovaryum gibi başka dokulardan da salgılanmakta, merkezi ve periferel grelin reseptörlerini aktive ederek etki göstermektedir (De Vriese vd., 2004; Peeters, 2013).

Grel'in yapısındaki oktanil grubu biyolojik aktivitesi için gereklidir. Bu oktanil grubunu taşımayan grelin formu des-asil grelin olarak adlandırılmakta ve dolaşımında grelin'e yakın düzeylerde bulunmaktadır. Des-asil grelin'in grelin ile aynı reseptörlerde etki göstermediği ve grelin'den farklı biyolojik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu grelin formunun grelin'in bir ön formu mu yoksa desasilasyon ürünü mü olduğu henüz aydınlatılamamıştır (Kojima ve Kangawa, 2005).

Hipomotilite sendromlarının (postoperative ileus, gastroparesis) tedavisi için bir takım grelin agonistleri geliştirilmiştir (Peeters, 2013). Ayrıca potansiyel grelin reseptör agonistlerinin konstipasyon tedavisinin yanı sıra iştah artırma ve bulantı azaltma amaçlı kullanılabilceği düşünülmekte ve araştırmalar yürütülmektedir (Sanger ve Furness, 2016).

2.3.2. Motilin

22 amino asitli bir peptit olan motilin, açlık sırasında gastrointestinal düz kas kasılmasını uyarmak için duodeno-jejunal mukozanın endokrin hücrelerinden sentezlenen bir hormondur. Bu peptit ismini sindirim organlarının hareketliliğini uyarıcı etkisi nedeniyle almıştır (Poitras ve Peeters, 2008).

2.3.2.1. Yapı

22 amino asitten oluşan ve molekül ağırlığı 2698 g/mol olan motilin'in amino asit dizilimi Şekil 2.4'te verilmiştir (Sakai, 2016).

H – Phe – Val – Pro – Ile – Phe – Thr – Tyr – Gly – Glu – Leu – Gln – Arg – Met – Gln – Glu – Lys – Glu – Arg – Asn – Lys – Gly – Gln – OH

Şekil 2.4. Motilin'in amino asit dizilimi (Poitras, 2013).

2.3.2.2. Kimyasal özellikler

Motilin'in suda çözünür olduğu bildirilmiştir (Sakai, 2016). Motilin analizi için geliştirilen tek YPSK yönteminde Delinsky vd. (2004) motilin'in kaplara adsorpsiyonunu azaltmak amacıyla liyofilize peptidi su yerine boş plazmada çözerek stok çözeltileri hazırlamıştır.

Literatürde motilin'in izoelektrik noktasını bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bir peptidin izoelektrik noktası yapısında bulunan amino asitlerin asitlik sabitleri kullanılarak hesaplanır ve bu amaçla geliştirilmiş birçok yazılım ve program mevcuttur. Motilin'in izoelektrik noktası chemicalize ve protpi isimli iki farklı tahmin aracı kullanılarak sırasıyla pH 8,47 ve 8,14 olarak hesaplanmıştır (http-1; http-2).

2.3.2.3. Biyolojik fonksiyonlar

Motilin, açlık sırasında gastrointestinal düz kas kasılmasını uyarmak için duodeno-jejunal mukozanın endokrin hücrelerinden sentezlenen bir hormondur. Bu peptit ismini sindirim organlarının hareketliliğini uyarıcı etkisi nedeniyle almıştır (Poitras ve Peeters, 2008). Motilin büyüme hormonu salgılanmasını *in vivo* ve *in vitro* olarak uyarma kapasitesine sahiptir (Chen ve Tsai, 2012). Bu peptidin ilerleyici motor kompleksin endokrin düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir. Motilin plazma seviyeleri, interdijestif

açlık periyodu boyunca her 90 ila 120 dakikada bir periyodik olarak artar ve motilin'in bu periyodik salımı, yemek yenmesinden sonra kaybolur. Plazma motilin'inin bu döngüsel zirveleri, güçlü peristaltik kasılmalarla birleşir ve bu göç dalgaları, sindirimsel göçme kasılmalarının faz III kasılmaları olarak bilinir (Poitras ve Peeters, 2008).

Potansiyel motilin reseptör agonistlerinin gastroparezi ve mide boşalmasının gerekli olduğu başka rahatsızlıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Sanger ve Furness, 2016).

2.4. Peptitlerin Analiz Yöntemleri

Biyolojik moleküllerin vücut sıvıları ve dokularındaki ölçümü, klinik araştırmanın kritik bir bileşenidir. Son yıllarda, *in vivo* kaynaklardan biyolojik bileşiklerin tanımlanması ve miktar tayini için önemli teknolojik ilerlemeler kaydedilmiştir (Milne ve Morrow, 2009). Peptitlerin miktar tayinleri için sıklıkla kullanılan yöntemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. İmmünoanaliz ve immünokimya
2. Kromatografik yöntemler
3. Kütle spektrometresi

2.4.1. İmmünolojik yöntemler

İmmünolojik yöntemler, biyolojik bileşikleri ölçmek için en sık kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler hem vücut sıvısı hem de dokularda bulunan peptit ve proteinlerin niceliksel ve niteliksel olarak tayinlerine olanak sağlamaktadır. Birçok immünolojik test son derece hassastır ve çoğu bileşiği vücut sıvılarında 0,1 pg/mL seviyesinde tespit edebilir. En yaygın olarak kullanılan iki immünolojik test yaklaşımı RIA ve EIA yöntemleridir. Ayrıca, floresans ve kemilüminesans immünoanaliz, çökeltme immünoanaliz ve parçacık immünoanaliz gibi başka immünolojik yöntemler de vardır (Milne ve Morrow, 2009).

Kullanılan yönteme bakılmaksızın, tüm immün analizler bir antijenin bir antikor ile etkileşmesine dayanır. Bu etkileşimin ortaya çıkma derecesi (antikora bağlanan antijen miktarına karşılık serbest antijen), bir biyolojik sıvı veya dokuda mevcut olan belirli antijenin miktarını ya nicel olarak ya da nicel olarak ölçmeyi sağlar. Bu yöntemlerle kullanılan tespit yöntemleri, antijen-antikor kompleksini saptamak için kullanılan yaklaşıma göre değişir (Milne ve Morrow, 2009).

2.4.2. Kromatografik yöntemler

Kromatografi terimi, karmaşık karışımların yakından ilişkili bileşenlerinin ayrılmasına izin veren çeşitli yöntemler grubunu kapsamaktadır. Biyolojik analizlerde özellikle gaz kromatografisi ve YPSK sıklıkla kullanılır. Bu teknikler hem moleküllerin miktar tayinleri için hem de proteinler ve peptitler gibi karmaşık biyomolekülleri saflaştırmak için kullanılabilir (Milne ve Morrow, 2009). Peptitlerin miktar tayini amacıyla sıvı kromatografisinin floresans veya UV detektörlerle kombine edildiği yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır.

2.4.3. Kütle spektrometresi

Bir KS, iyonlar üreten ve onları gaz fazında kütle/yük (m/z) oranına göre ayıran bir araçtır. KS hem inorganik hem de organik kompleks karışımlarının bileşenlerini ölçmek, belirli bir moleküler türler hakkında yapısal bilgi sağlamak, bir numunedeki atomların izotop oranını belirlemek veya insan ve hayvan dokuları dahil katı yüzeylerin yapısını ve bileşimini tanımlamak için kullanılabilir (Milne ve Morrow, 2009). Günümüzde KS protein araştırmaları ve genel olarak biyomoleküllerin araştırılması için merkezi bir analitik tekniktir. Yüksek duyarlılığı ve karmaşık numunelerde proteinleri tanımlama, karakterize etme ve nicelleştirme olanağı vermesi sayesinde çok çeşitli KS temelli analitik stratejiler ortaya çıkmıştır (John vd., 2004).

2.5. Grelin ve Motilin Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler

Grelin ve motilin'in miktar tayini genellikle immünojenik yöntemler (RIA, ELISA ve EIA gibi) kullanılarak yapılmaktadır. Grelin'in tayini için geliştirilmiş iki YPSK-UV yöntemi (Aydın, Karatas ve Geckil, 2008; Staes vd., 2010) ve üç SK-KS yöntemi bulunmaktadır (Eslami vd., 2016; Rauh, Gröschl ve Rascher, 2007; Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014). Motilin tayini için ise bir tane SK-KS yöntemi geliştirilmiştir (Delinsky vd., 2004). Bahsi geçen çalışmalar Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Rauh vd. (2007) grelin ve des-asil grelin'in biyolojik matrikslerde (plazma, serum ve hücre süpernatantları) miktar tayini için bir SK-KS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Çöktürme ile deproteinizasyon yaptıktan sonra iki kolonlu online ekstraksiyon tasarımı ile ters faz ayırımı gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için C₁₈ monolitik kolon (100 × 4,6 mm); hareketli faz olarak amonyum asetat tamponu ve metanol karışımı kullanılmıştır. Analizler KS/KS modunda, çoklu reaksiyon izleme için

4-kat yüklü iyonlar kullanılarak yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin tayin sınırı (LOQ) grelin ve des-asil grelin için sırasıyla 0,07 ve 0,35 µg/L'dir. Yöntemin farklı biyolojik matrislerde konsantrasyon-zaman profillerinin izlemine olanak verdiği gösterilmiştir.

Aydın vd. (2008) biyolojik numunelerde grelin ve des-asil grelin'in analizi için bir YPSK yöntemi geliştirmiş ve bu yöntemi RIA testleri ile karşılaştırmışlardır. Ayrım bir C₁₈ kolonda (150 × 4,6 mm, 5 mm partikül ve 120 Å por boyutu) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 50 mM NaClO₄ ve %1'lik H₃PO₄ karışımı kullanılmış, analitler çeşitli vücut sıvılarında (serum, tükürük, idrar ve süt) 215 nm'de tayin edilmiştir. Saptama sınırı (LOD) grelin ve des-asil grelin için sırasıyla 11 ve 14 pg/mL olarak bildirilmiştir.

Staes vd. (2010) insan grelin'i ve des-asil grelin'inin sulu çözeltilerde ayrımı ve miktar tayini için bir YPSK-UV yöntemi geliştirmişler ve bu çözeltilerin stabilitesini incelemişlerdir. Ayrım bir C₁₈ kolonda (150 × 4,6 mm, 5 µm partikül boyutu) gerçekleştirilmiştir. %0,1 trifloroasetik asit içeren su ve %0,1 trifloroasetik asit içeren asetonitrilden oluşan hareketli faz karışımı ile gradient elüsyon uygulanmıştır. Analitler 210 nm'de gözlenmiştir. LOQ değerleri grelin ve des-asil grelin için sırasıyla 1,85 ve 1,93 µM olarak bulunmuştur. Des-asil grelin tüm test koşullarında stabilken, grelin çözeltilerinin desasilasyonunu önlemek için asidik pH'da ve/veya düşük sıcaklıkta hazırlanması ve saklanması gerekmektedir. Valide edilen yöntem, grelin ve des-asil grelin'in lipozomlara bağlanmasını değerlendirmek için uygulanmıştır.

Sidibé vd. (2014) insan plazmasında grelin ve des-asil grelin'in miktar tayini için bir seçilmiş reaksiyon izleme SK-KS yöntemi geliştirmişlerdir. Analitik kolon olarak bir C₁₈ kolon (100 × 2,1 mm, 3,5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,2 formik asit ve %0,01 trifloroasetik asit içeren su ve %0,2 formik asit ve %0,01 trifloroasetik asit içeren asetonitril kullanılmıştır. Seçilmiş reaksiyon izleme analizleri "QTRAP 5500 hybrid triple quadrupole linear ion trap" KS ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem grelin (75 pg/mL) ve des-asil grelin (50 pg/mL) için oldukça düşük LOQ değerlerine sahiptir.

Eslami vd. (2016) insan plazmasından grelin tayini için bir SK-KS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde analitlerin insan plazmasından ekstraksiyonu için karıştırma çubuğu emilim ekstraksiyonu (stir bar sorptive ekstraksiyonu) kullanılmıştır. Ardından diyot dizisi dedektör (DAD) ve KS bağlı bir YPSK ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Analizler bir C₈ kolonda (250 × 4,6 mm, 5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,1 trifloroasetik asit içeren su ve %0,1 trifloroasetik asit içeren

asetonitril kullanılarak gerçekleştirilmiştir. UV absorbands 218 nm'de gözlenmiştir. Yöntemin LOQ değeri 0,02 µg/L olarak bildirilmiştir. Geliştirilen yöntem gastrik ameliyat geçirmiş obez hastaların plazma numunelerinin analizi için kullanılmıştır.

Delinsky vd. (2004) sıçan plazmasında motilin'in miktar tayini için bir SK-KS yöntemi geliştirmişlerdir. Numuneler standart ekleme yöntemiyle hazırlanmış, ardından organik çözücü ile protein çöktürme yapılmıştır. Kromatografik ayırım C₁₈ kolonda (50 × 2,1 mm, 5 µm partikül boyutu), %0,2 asetik asit ve %0,02 trifloroasetik asit içeren hareketli fazla gerçekleştirilmiştir. Analizler Micromass Quattro II KS'de 4+ yüklü iyonlarla yapılmıştır. Yöntemin en düşük tayin limiti 10 ng/mL'dir.

Burada bahsedilen yöntemler dışında grelin ve motilin'in ayrı ayrı analizleri için geliştirilmiş, sıvı kromatografisi ile immünolojik yöntemlerin birlikte kullanıldığı bazı yöntemler de mevcuttur (Eslami, Ghassempour ve Aboul-Enein, 2017).

Tablo 2.2. *Grelin ve motilin analizinde kullanılan sıvı kromatografisi yöntemleri.*

Analit	Matriks	Numune hazırlama	Yöntem	Doğrusallık	LOQ	Kaynak
Motilin	Sıçan plazması	ACN ile protein çöktürme	SK-KS	10-1000 ng/mL	10 ng/mL	(Delinsky vd., 2004)
* Grelin ** des-asil grelin	Plazma, serum ve hücre	Asetonitril ve sülfosalisilik asit ile protein çöktürme (ayrıca YPSK sisteminde analitik kolondan önce ekstraksiyon kolonu kullanılmıştır)	SK-KS/KS	* 0,07-72 ng/mL ** 0,07-72 ng/mL	* 0,07 ng/mL ** 0,35 ng/mL	(Rauh, Gröschl ve Rascher, 2007)
* Grelin ** des-asil grelin	Serum, tükürük, idrar ve süt	Aprotitin ekleme ve santrifüj	SK-UV	* 0,05-0,6 ng/mL ** 0,05-0,6 ng/mL	* 0,011 ng/mL (LOD) ** 0,014 ng/mL (LOD)	(Aydin, Karatas ve Geckil, 2008)
* Grelin ve ** des-asil grelin	Sulu çözeltiler	-	SK-UV	* 3-400 µg/mL (0,93-118,67 µM) ** 3-400 µg/mL (0,96-123,28 µM)	* 6,2 µg/mL (1,85 µM) ** 6,2 µg/mL (1,93 µM)	(Staes vd., 2010)
* Grelin ** des-asil grelin	İnsan plazması	Aprotitin ekleme, sülfosalisilik asit ile kısmi protein çöktürme (ayrıca YPSK sisteminde analitik kolondan önce trap kolon kullanılmıştır)	SK-KS	* 75-2500 pg/mL ** 50-2500 pg/mL	* 75 pg/mL ** 50 pg/mL	(Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014)
Grelin	İnsan plazması	Karıştırma çubuğu emilim ekstraksiyonu	SK/DAD-KS	0,02-80 ng/mL	0,02 ng/mL	(Eslami vd., 2016)

2.6. Floresans Türevlendirme

Bu çalışmada sıvı kromatografisinin yüksek ayırım etkinliği ve kısa analiz süresi avantajını floresans spektrometrinin yüksek tayin hassasiyeti üstünlüğü ile birleştirmek amacıyla floresans dedeksiyonlu YPSK yöntemi tercih edilmiştir.

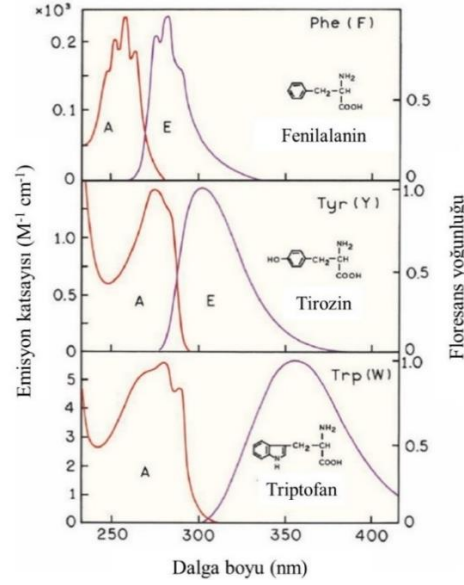
2.6.1. Floresans türevlendirme ile ilgili genel bilgiler

Sıvı kromatografisinde analitlerin florofor boya ile etiketlenerek türevlendirilmesi iki şekilde uygulanabilir; pre-kolon veya post-kolon türevlendirme. Pre-kolon türevlendirme numune YPSK sistemine enjekte edilmeden önce gerçekleştirilir. Bu yöntem manuel olarak enjeksiyon viallerinde yapılabileceği gibi otomatik hale de getirilebilir. Pre-kolon türevlendirmenin en büyük avantajı florofor oluşumu reaksiyonu için reaksiyon süresi, çözücü seçimi gibi ortam koşullarının seçimi konusunda esnek olmasıdır. Böylece daha stabil florofor oluşturmak için uygun koşullar seçilebilir. Ayrıca numune YPSK sistemine enjekte edilmeden önce türev ajanının fazlasının ortamdaki uzaklaştırılmasına da olanak sağlar (Coppex, 2000). Post-kolon türevlendirmede ise türev ajanı kolon ile dedektör arasında yer alan bir reaktör ünitesine ikinci bir pompa yardımı ile eklenir. Bu yöntemde florofor oluşum reaksiyonunun hızlı olması ve hareketli faz çözücüsü ile uyumlu olması gerekmektedir ve türev ajanı sisteme sürekli akış şeklinde verildiği için sarfiyat fazladır. Post-kolon türevlendirmenin avantajı ise kolondan çıkan analitler birbirinden ve diğer matriks bileşenlerinden ayrılmış olduğu için her biri için ayrı reaksiyon gerçekleştirilebilmesi ve ilgili bileşiğin birden fazla türevinin oluşması olasılığının en aza indirilmiş olmasıdır (Cardinael vd., 2015; Coppex, 2000).

2.6.2. Peptitlerin floresans özellikleri ve türevlendirilmesi

Floresans spektroskopisi ve çeşitli uygulamaları son yıllarda peptit ve proteinlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aromatik amino asitler olan fenilalanin, tirozin ve triptofan doğal floresansa sahiptir. Bu amino asitlerin yapıları ile absorpsiyon ve emisyon spektrumları Şekil 2.5'te görülmektedir. Triptofan'ın yapısındaki indol yapısı floresans özelliğinin ana kaynağıdır. Tirozin, triptofan'a benzer bir kuantum verimine sahiptir, ancak proteinlerde peptit zinciri ile etkileşim veya triptofana enerji aktarımı nedeniyle tirozin emisyonu genellikle söndürülür. Proteinlerin denatürasyonu genellikle tirozin

emisyonunun artmasına neden olur. Fenilalanin emisyonu ise nadiren, sadece tirozin ve triptofan içermeyen peptit yapılarında gözlenir (Lakowicz, 2006).



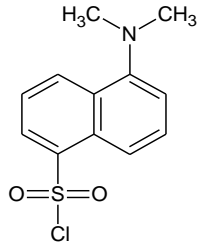
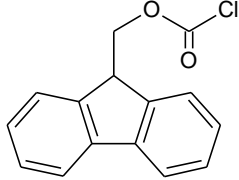
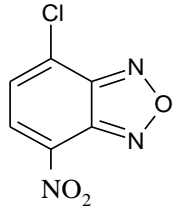
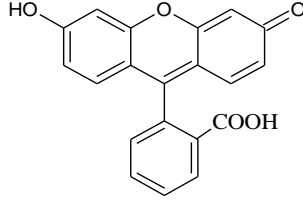
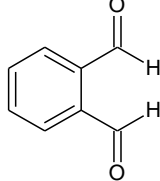
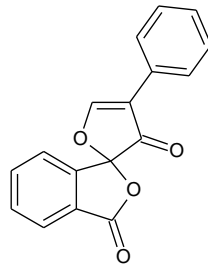
Şekil 2.5. Doğal floresans özellik gösteren fenil alanin, tirozin ve triptofan'ın absorpsiyon ve emisyon spektrumları (A: absorpsiyon, E: emisyon) (Lakowicz, 2006).

Peptit ve proteinler yapılarında aromatik amino asitleri içermelerine karşın, genellikle türev ajanları ile türevlendirilmeleri gerekir. Bunun sebebi türev ajanlarının aromatik amino asitlere göre daha uzun absorpsiyon ve emisyon dalga boylarına sahip olmasıdır. Böylece etiketli protein ile diğer etiketlenmemiş proteinlerin varlığında kolaylıkla çalışılabilir (Lakowicz, 2006).

Peptitlerin N-ucundaki amino grubu ve C-ucundaki karboksil grubu türevlendirme sürecinde yer alabilecek fonksiyonel gruplardır. Ancak karboksilik asidin aminlerle reaksiyona girmeden önce aktive olması gerekliliği nedeniyle amino asitlerin türevlendirilmesinde kullanılan reaktiflerin çoğu amino grubunu hedefler. Bu iki fonksiyonel grup dışında peptitler yapılarındaki amino asitlere göre sülfidril, hidroksil, fenol, c-amino, guanidin ve tiazol grupları gibi türevlendirilebilir başka fonksiyonel gruplar da taşıyabilirler (Koller ve Eckert, 1997).

Ticari olarak üretilen birçok peptit türevleyici florofor ajan bulunmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan türev ajanlarının bazıları dansil klorür (DNS-Cl), florenilmetiloksikarbonil klorür (Fmoc-Cl), 4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), floresein, orto-ftalaldehit (OPA) ve floreskamindir. Bu reaktiflerin özellikleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Peptitlerin floresans türevlendirilmesinde kullanılan bazı türev ajanları ve özellikleri.

Türev ajanı	Kimyasal formül	Hedef yapı	Tipik floresans dalgaboyları (nm)	
			Eksitasyon	Emisyon
DNS-Cl		Primer ve sekonder aminler, fenolik hidroksil	298	545
FMOC-Cl		Primer ve sekonder aminler ve alkoller	265	315
NBD-Cl		Primer ve sekonder aminler, alifatik aminler	480	550
Floresein		Primer ve sekonder aminler	494	521
OPA		Sadece primer aminler	350	470
Floreskamin		Sadece primer aminler	390	450

2.7. Kemometri ve Deneysel Tasarım

Kemometri, kimyasal ölçümlerin ve deney prosedürlerinin optimizasyonunu gerçekleştirmek ve toplanan analitik veriden maksimum bilgiyi elde etmek amacıyla matematiksel ve istatistiksel yöntemleri kullanan kimyasal bir disiplindir. Bu disiplin çok değişkenli istatistik, matematiksel modelleme, bilgisayar bilimi ve analitik kimya bilgisinin birlikte kullanımını içerir. Kemometri modern analitik cihazlar tarafından üretilen yoğun veri akışının işleme gereksinimi sonucu geliştirilmiştir. Kemometrik yöntemler sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, optimizasyon, desen tanıma, sınıflandırma ve görüntü işleme gibi birçok amaçla kullanılmaktadır (Otto, 2016).

Deneysel tasarım, yapılacak deneylerin etkili bir şekilde planlanması, yürütülmesi ve bu deneylerden elde edilen verilerin yorumlanması için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu tekniklerin benimsediği yaklaşım, çok değişkenli verilerin, sistem hakkında bilgi sağlamak için kullanılacak doğrusal veya ikinci dereceden etkileşimli ampirik bir fonksiyona uydurulmasıdır (Hibbert, 2012).

Sıklıkla kullanılan geleneksel optimizasyon yaklaşımı her seferde tek değişken yöntemi olarak adlandırılabilir. Bu yöntemde diğer değişkenler sabit tutulurken, her seferde tek bir değişkenin etkisi incelenir. Deneysel tasarım yaklaşımında kullanılan çok değişkenli yöntemlerde ise sürece dahil olan çok sayıda değişkenin etkisi aynı anda incelenir. Çok değişkenli yöntemlerle, değişkenlerin yanıtı doğrusal etkilerinin yanı sıra, doğrusal olmayan etkileri de belirlenebilir. Ayrıca faktörlerin etkisinin birlikte araştırılmasının bir sonucu olarak, faktör etkileşimlerinin yanıt üzerine etkisini belirlemek de mümkündür. Bütün bu çıktılar düşünüldüğünde, çalışılan deneysel alan hakkında detaylı bir bilgi sahibi olunabilir ve bu alan içerisindeki mutlak optimum noktayı bulmak mümkün olur. Son olarak bu yöntemleri uygulamak için gerekli olan deney sayısının tek değişkenli yöntemlere göre daha az olması sayesinde, çok daha fazla bilgi daha az maliyet, zaman ve emek ile elde edilmektedir (Vera Candiotti vd., 2014).

2.7.1. Deneysel tasarımın basamakları

Deneysel tasarım yaklaşımı sırasında uygulanması gereken işlemler aşağıdaki başlıklarda özetlenmiştir (Montgomery, 2012; Vera Candiotti vd., 2014).

2.7.1.1. Sorunun tanımlanması

Deneysel tasarımı planlamaya başlarken ilk yapılması gereken sorunun tanınması ve net bir şekilde ifade edilmesidir. Bu basamak deneyin genel hedeflerini göz önünde tutmak için önemlidir. Deneyin hedefi, sonuca etki eden değişkenlerin tespit edilmesi, etkilerinin incelenmesi, optimizasyon, doğrulama ya da sistemin sağlamlığının tespitinden biri ya da birkaçı olabilir. Hedeflerin iyi bir şekilde belirlenmesi araştırılan sorunun daha iyi anlaşılmasına ve sorunun çözümüne katkı sağlayacaktır (Montgomery, 2012).

2.7.1.2. Yanıt değişkeninin seçilmesi

Yöntemin performansını gösteren bağımlı değişken yanıt değişkeni olarak adlandırılır. Analitik çalışmalarda geri kazanım, pik alanı, alıkonma ya da göç zamanı, pik kuyruklanması gibi değişkenler yanıt değişkeni olarak seçilebilir. Çalışmanın ihtiyacı doğrultusunda birden çok yanıt değişkeni seçmek de mümkündür (Vera Candiotti vd., 2014).

2.7.1.3. Faktörlerin ve faktör seviyelerinin seçilmesi

Yöntemin performansını etkileyen bağımsız değişkenler faktör olarak adlandırılır. Analitik kimyadaki tipik faktörler pH değeri, reaktif konsantrasyonu, sıcaklık, akış hızı, çözücü vb. değişkenlerdir (Otto, 2016). Faktör seviyeleri ise bir faktörün hangi değerlerde araştırılacağını ifade eder. Örneğin pH faktörünün etkisi pH 3-7 aralığında 3 seviyede araştırılacaksa, pH 3, 5 ve 7 seviyelerinde deneyler yürütülür.

2.7.1.4. Deneysel tasarımın seçilmesi

Deneysel tasarım yöntemleri tarama tasarımları ve yanıt yüzey tasarımları olarak ikiye bölünebilir. Tarama tasarımları ile sürece etkili faktörlerin belirlenmesi amaçlanır. Bu nedenle daha çok sayıda faktör geniş aralıkta ve genellikle iki seviyede araştırılır (Montgomery, 2012). Tarama amacıyla en sık kullanılan tasarımlar tam faktöriyel (iki seviyeli), parçalı faktöriyel ve Plackett–Burman tasarımlardır. Yanıt yüzey tasarımları ise ikinci dereceden bir yanıt yüzeyinin modellenmesine olanak verir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan tasarımlar merkezi bileşen tasarımı ve Box-Behnken tasarımlarıdır (Vera Candiotti vd., 2014).

2.7.1.5. Deneylerin yapılması

Deneysel tasarım seçildikten sonra deneyler plana uygun olarak yürütülmelidir. Deneylerin yürütülmesi sırasında deneysel tasarımın üç prensibi olan rastgeleleştirme (randomizasyon), tekrarlama (replikasyon) ve bloklama (blocking) ilkelerine dikkat edilmelidir (Montgomery, 2012). Rastgeleleştirme, deney planındaki deneylerin rastgele bir sıra ile yürütülmesini ifade eder. Bu sayede kontrol edilemeyen değişkenlerin sonuçları sistematik bir şekilde etkilemesinin önüne geçilir (Hibbert, 2012). Tekrarlama (replikasyon) deneysel hatanın hesaplanması için gereklidir. Bloklama ise deneyin hassasiyetini arttırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bloklama ile aralarında sistematik farklar bulunan deney birimleri, kendi içinde homojen olacak şekilde gruplara yani bloklara ayrılır (Montgomery, 2012).

2.7.1.6. Verinin istatistiksel analizi

Deneylerin yapılmasının ardından elde edilen verilerin analizi için istatistiksel yöntemler kullanılır. Deneysel tasarımda deney sonuçları yanıt ile faktörler arası ilişkiyi ifade eden bir denklem yani ampirik bir model kurmak için kullanılır. Hipotez testi, güven aralıklarının belirlenmesi, atık analizi ve modelin uygunluğunun kontrolü de bu aşamada yapılır (Montgomery, 2012). Veri analizi için geliştirilmiş istatistiksel yazılım programlarını (Minitab, JMP, Design Expert vb.) kullanarak bu hesaplamaları yapmak ve modele ait grafikleri oluşturmak mümkündür.

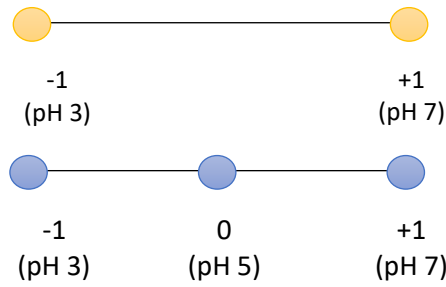
2.7.1.7. Sonuçların değerlendirilmesi ve öneriler

Veri analizi tamamlandıktan sonra deneyler hakkında sonuçlar çıkarmak mümkündür. Bu aşamada elde edilen model denklemi ve grafikler yardımıyla çalışmanın hedeflerine uygun olarak, faktörlerin yanıt üzerinde etkisi, faktör etkileşimleri değerlendirilebilir ya da çalışma alanındaki optimum nokta belirlenebilir. Son olarak deneyden elde edilen sonuçları doğrulamak için takip çalışmaları ve doğrulama testleri de yapılmalıdır (Montgomery, 2012).

2.7.2. Deneysel tasarımlar

Deneysel tasarımda bağımsız değişken olan faktörler x , bağımlı değişken olan yanıt ise y sembolü ile gösterilir ve faktör seviyeleri kodlar ile ifade edilir. Tasarım için bir

faktörün iki değeri gerekiyorsa bu tasarım iki seviyeli olarak ifade edilir ve faktörün aldığı düşük değer -1, yüksek değer ise +1 ile ifade edilir. Üç seviyeli bir tasarımda ise faktörün aldığı değerler düşük olandan yüksek olana doğru sırayla -1, 0 ve +1 kodları ile ifade edilir. pH faktörünün pH 3-7 aralığında 2 ve 3 seviyeli tasarımlarda kodlanması Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Bu kodlama yöntemi sonraki aşamalarda yürütülecek olan matematiksel işlemlerin uygulanabilirliği ve tasarımların genel gösterimlerinin yapılabilmesi için önemlidir (Hibbert, 2012).

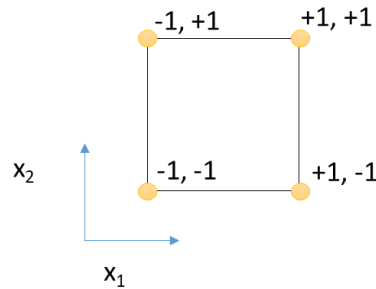


Şekil 2.6. Faktör seviyelerinin kodlu gösterimi.

2.7.2.1. Tarama tasarımları

2.7.2.1.1. Tam faktöriyel tasarımlar

İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlar tarama amacıyla sıklıkla kullanılan deneysel tasarımlardır. Faktöriyel tasarımlar faktörlerin seviyelerinin kombinasyonları şeklinde ifade edilir. Faktöriyel tasarımlarda k sayıda faktörün L sayıda seviyesi varsa L^k sayıda kombinasyon mevcuttur (Hibbert, 2012). İki seviyeli iki faktörlü bir tasarımda yer alan 2^2 yani 4 kombinasyon Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Aynı tasarım Şekil 2.7'deki gibi görselleştirilebilir. Tam faktöriyel tasarımlarda bu kombinasyonların hepsinde deneyler yürütülür (Otto, 2016).



Şekil 2.7. İki seviyeli iki faktörlü tam faktöriyel tasarımın gösterimi.

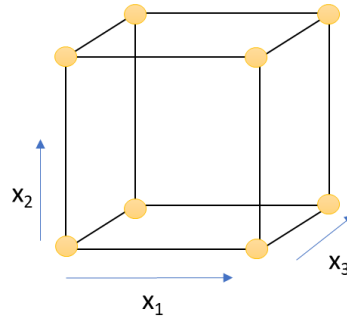
Tablo 2.4. İki seviyeli iki faktörlü tam faktöriyel tasarımda deney planı.

Deney	Faktörler	
	x ₁	x ₂
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

İki seviyeli üç faktörlü bir tasarım ise 2^3 yani 8 kombinasyon içerir. Bu kombinasyonlar Tablo 2.5'te verilmiştir. Üç faktörlü tasarımlar Şekil 2.8'deki gibi üç boyutlu şekilde görselleştirilir (Otto, 2016).

Tablo 2.5. İki seviyeli üç faktörlü tam faktöriyel tasarımda deney planı.

Deney	Faktörler		
	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

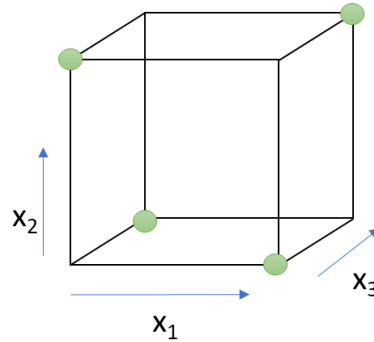


Şekil 2.8. İki seviyeli üç faktörlü tam faktöriyel tasarımın gösterimi.

2.7.2.1.2. Parçalı faktöriyel tasarımlar

Tam faktöriyel tasarımlarda L^k sayıdaki kombinasyonların hepsi yürütülür. Az sayıda faktörün olduğu durumlarda L^k sayıdaki deney kolayca yürütülse de faktör sayısının artmasıyla tasarımdaki kombinasyon sayısının katlanarak artması tam faktöriyel tasarımların uygulanabilirliğini düşürür. Örneğin 2 seviyeli 7 faktörlü bir tasarımda 2^7 yani 128 deney yapılması gerekmektedir.

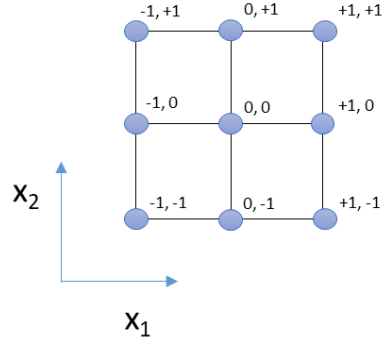
Faktör sayısının arttığı durumlarda tam faktöriyel tasarımlar yerine kombinasyonların belirli bir miktarının seçildiği parçalı faktöriyel tasarımlar tercih edilir. Parçalı faktöriyel tasarımlarda deney sayısı L^{k-p} kadardır. $p=1$ olan bir parçalı faktöriyel tasarımda deney sayısı yarıya düşer. 3 faktör 2 seviyeli yarım faktöriyel tasarımda $2^{3-1} = 4$ deney gerekmektedir (aynı örnek tam faktöriyel tasarımda $2^3 = 8$ deney gerektirmekteydi). Bu şekilde tasarlanmış bir deney alanı Şekil 2.9'daki gibi gösterilebilir. Parçalı faktöriyel bir tasarımda şekildeki renkli nokta ile gösterilen 4 noktada deneyler yürütülebilir, ya da her noktanın tam zıttındaki renklendirilmemiş noktalar seçilebilir (Otto, 2016).



Şekil 2.9. İki seviyeli üç faktörlü parçalı faktöriyel tasarımın gösterimi.

2.7.2.2. Yanıt yüzey tasarımları

Yanıt ve faktörler arasındaki ilişkiyi gösteren matematiksel modellerin doğrusal ilişkinin yanı sıra eğri yanıt yüzeylerini de gösterebilmesi için faktörler en az 3 seviyede araştırılmalıdır. Bu ilişkiyi göstermesinden dolayı üç seviyeli faktöriyel tasarımlar, yanıt yüzey tasarımları olarak bilinir. Tam faktöriyel üç seviyeli tasarımlar, yine L^k sayıda deney içerdiğinden 3^k sayıda deney gerektirir. Şekil 2.10'da üç seviyeli iki faktörlü bir tam faktöriyel tasarım görülmektedir.

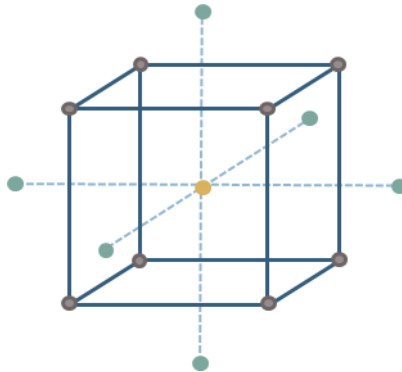


Şekil 2.10. Üç seviyeli iki faktörlü parçalı faktöriyel tasarımın gösterimi.

Az sayıda faktör için 3 seviyeli tam faktöriyel tasarımlar kullanılabilir olsa da faktör sayısının artmasıyla yine deney sayısının çok artması nedeniyle başka yüzey yanıt tasarımları geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanları Box-Behnken ve merkezi bileşen tasarımlarıdır (Otto, 2016).

2.7.2.2.1. Merkezi bileşen tasarımı

Merkezi bileşen tasarımı tam veya parçalı faktöriyel bir tasarımın aynı merkezi taşıyan bir yıldız tasarımı ile birleşimi ile oluşturulur (yıldız tasarımı merkezden α uzaklıktaki noktalardan oluşan bir tasarımdır) (Otto, 2016). Şekil 2.11’de 2 seviyeli bir tam faktöriyel tasarım ile bir yıldız tasarımdan oluşan ve merkez noktada yapılan üç tekrarı içeren 17 deneylik bir merkezi bileşen tasarımı gösterilmiştir. Bu tasarımında uygulanacak deneylerin kodlu gösterimi Tablo 2.6’da görülmektedir.



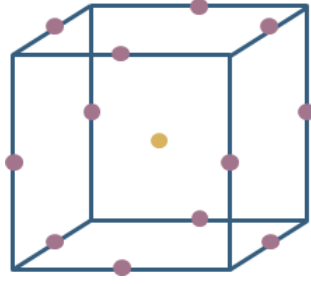
Şekil 2.11. Üç faktör için merkezi bileşen tasarımın gösterimi.

Tablo 2.6. Üç faktörlü merkezi bileşen tasarımında deney planı.

Deney	Faktörler		
	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	- α	0	0
10	α	0	0
11	0	- α	0
12	0	α	0
13	0	0	- α
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

2.7.2.2.2. Box-Behnken tasarımı

Şekil 2.12’de görülen bu tasarımda noktaların hepsi merkezden eşit uzaklıkta yer alarak bir küre oluşturur. Bu tasarımda merkezi bileşen tasarımından farklı olarak $+\alpha$ ve $-\alpha$ seviyelerine gerek kalmadan sadece üç seviyede ayarlama yeterlidir (Otto, 2016). Üç faktörün etkisinin araştırıldığı ve merkez noktada yapılan üç tekrarı içeren 15 deneylik bir Box-Behnken tasarımının deney planı Tablo 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Üç faktör için Box-Behnken tasarımın gösterimi.

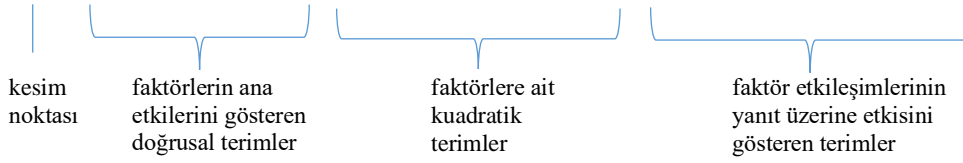
Tablo 2.7. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımında deney planı.

Deney	Faktörler		
	x ₁	x ₂	x ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

2.7.3. Matematiksel modelleme

Deneyssel tasarımda oluşturulan ampirik modeller faktör-yanıt arasındaki matematiksel ilişkiyi gösteren eşitliklerdir. Üç faktörlü bir tasarım için oluşturulan tipik bir eşitlik aşağıdaki Eşitlik 2.1'deki gibidir.

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (2.1)$$



\hat{y} model yardımıyla hesaplanan yanıt değeridir ve hatalar nedeniyle deneyde gözlenen yanıt ile aynı olmayabilir. b ile ifade edilen terimler modeldeki katsayılardır. b_0 modelin kesim noktasıdır. b_1 , b_2 ve b_3 katsayılarının her biri ilgili faktörün yanıt üzerindeki ana etkisini gösteren doğrusal terimlerdir. b_{11} , b_{22} ve b_{33} katsayıları kuadratik terimlerdir ve ilgili faktörün yanıt üzerindeki doğrusal olmayan (eğimli) etkisini gösterir. b_{12} , b_{13} ve b_{23} ise faktör arası etkileşimleri gösteren katsayılardır (Brereton, 2003).

Bir tasarımdaki deneyler yürütüldükten sonra Eşitlik 2.1'deki ampirik parametreleri tahmin etmek için bir çoklu regresyon yöntemi olan en küçük kareler yöntemi kullanılır. Bu yöntem deneysel bir veri setinin olası en düşük atık değeri oluşturacak şekilde matematiksel bir modele uydurulması için kullanılır. İlgili hesaplamaları yapmak için modelin Eşitlik 2.2 ve 2.3'teki gibi matris şeklinde gösterilmesi gerekmektedir.

$$y_{mX_i} = X_{mX_n} b_{nX_1} + e_{mX_1} \quad (2.2)$$

$$y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{21} & \dots & x_{k1} \\ 1 & x_{12} & x_{22} & \dots & x_{k2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{1n} & x_{2n} & \dots & x_{kn} \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ \vdots \\ b_n \end{bmatrix} \quad e = \begin{bmatrix} e_0 \\ e_1 \\ \vdots \\ e_n \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

Eşitlikteki y cevap vektörü, X seçilen deneysel tasarımın matrisidir. b modelin katsayıları tarafından oluşturulan vektör, e atık değeri, m ve n sırasıyla matrislerden gelen satır ve sütun sayısını temsil eder. Matematiksel dönüşümlerden sonra parametreleri içeren bir b vektörü Eşitlik 2.4 ile hesaplanır. Bu eşitlik, deney alanındaki yanıtın davranışını tanımlayan yanıt yüzeyinin yapımında kullanılır.

$$b_{n.1} = (X_{m.n}^T X_{m.n})^{-1} (X_{n.m}^T y_{m.i}) \quad (2.4)$$

Oluşturulan bir ampirik modelde hesaplanan katsayıların hepsi önemli ya da anlamlı olmayabilir. Model katsayıları hesaplandıktan sonra, bu durum anlamlılık testleri ile kontrol edilir.

Oluşturulan modelin çalışılan deneysel alanı tahmin edici bir şekilde tanımlayıp tanımlamadığı modelin kalitesini gösterir. Bu durum varyans analizi (ANOVA) ile kontrol edilir. ANOVA ile deneyler yürütülürken faktör seviyelerindeki değişiklik nedeniyle ortaya çıkan varyasyon ile ölçümler sırasında meydana gelen rastgele hatalardan kaynaklı varyasyon karşılaştırılır. Bu analiz ile deneysel hata kaynakları varlığında da modelin yanıtları anlamlı olarak tahmin edip edemediği değerlendirilir.

ANOVA'da, veri kümesi varyasyonunun değerlendirilmesi dağılımının incelenmesi ile yapılır. Her gözleme ait tekrarların (y_{ij}) medyan değerinden (\bar{y}) sapmasının karesi Eşitlik 2.5 ile hesaplanır.

$$d_i^2 = (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (2.5)$$

Medyana ilişkin tüm gözlem sapmaları için karelerin toplamı (SS_{tot}), regresyon kaynaklı karelerin toplamı (SS_{reg}) ve model tarafından üretilen atık kaynaklı olan karelerin toplamı (SS_{res}) olarak parçalanabilir (Eşitlik 2.6).

$$SS_{tot} = SS_{reg} + SS_{res} \quad (2.6)$$

Merkezi noktada tekrarlar yapıldıkça, tekrarlarla ilişkili saf hatayı tahmin etmek mümkündür. Böylece, atıklar için karelerin toplamı (SS_{res}), saf hata kaynaklı karelerin toplamı (SS_{pe}) uygunluk eksikliği kaynaklı karelerin toplamı (SS_{lof}) olarak iki parçaya ayrılabilir (Eşitlik 2.7).

$$SS_{res} = SS_{pe} + SS_{lof} \quad (2.7)$$

Her bir varyasyon kaynağı için kareler toplamının (toplam, regresyon, atık, uyum eksikliği ve saf hata), ilgili serbestlik sayılarına bölünmesi ile karelerin medyanı (MS) elde edilir (Tablo 2.8).

Tablo 2.8. Çoklu regresyon kullanılarak deneysel veri için oluşturulmuş matematiksel model için varyans analizi.

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin medyanı
Regresyon	$SS_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p-1$	$MS_{reg} = \frac{SS_{reg}}{p-1}$
Atıklar	$SS_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n-p$	$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{n-p}$
Uyum eksikliği	$SS_{lof} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m-p$	$MS_{lof} = \frac{SS_{lof}}{m-p}$
Saf hata	$SS_{pe} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n-m$	$MS_{pe} = \frac{SS_{pe}}{n-m}$
Toplam	$SS_{tot} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n-1$	

n_i gözlem sayısı; m tasarımdaki seviye sayısı, p modeldeki parametre sayısı, \hat{y}_i i seviyesinde model tarafından tahmin edilmiş değeri, \bar{y} genel medyan, y_{ij} her bir seviyede yapılmış tekrarlar, \bar{y}_i aynı deneysel koşul setinde yapılmış tekrarların medyanı.

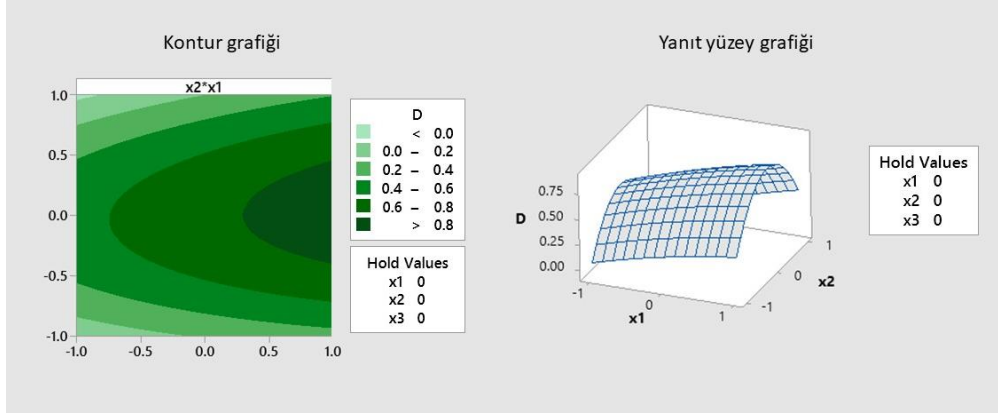
Regresyonun anlamlılığı, regresyon karesinin medyanı (MS_{reg}) ile atık karesinin medyanının (MS_{res}) arasındaki oran ve bu varyasyon kaynaklarının F testi ile karşılaştırılması ile değerlendirilir.

Modeli değerlendirmenin diğer bir yolu da uyum eksikliği değerini kullanmaktır. İyi oluşturulmuş bir modelde MS_{lof} sadece sitemdeki rastgele hataları yansıtır. MS_{pe} de bu rastgele hataların bir göstergesidir ve bu iki değer istatistiksel olarak farklı olmadığı varsayılır. Bu iki medyan değeri arasında fark F testi ile değerlendirilir.

Kısaca deneysel veri ile uyumlu bir model anlamlı bir regresyon ve anlamsız bir uyumluluk eksikliği göstermelidir. Yani varyasyonun önemli bir kısmı regresyon denklemi ile tanımlanmış olmalıdır (Bezerra vd., 2008).

Ancak anlamlı bir model elde etmek, mutlaka verilerdeki varyasyonu doğru bir şekilde açıkladığı anlamına gelmez. Sonuç olarak, model tarafından açıklanan varyans yüzdesini temsil eden artık grafikleri, tayin katsayısını (R^2) ve ayarlanmış tayin katsayısını (R^2_{adj}) değerlendirmek gerekir (Vera Candiotti vd., 2014).

Oluşturulan modeli kullanarak optimum noktayı bulmak için modelin görselleştirildiği grafikler kullanılabilir. Kontur grafikleri (contour plot) iki faktörün yanıt üzerine etkisinin iki boyutlu olarak görselleştirildiği grafiklerdir. Grafikteki her bir kontur çizgisi yanıtın aldığı sabit bir değeri ifade eder. Diğer bir grafik türü olan yanıt yüzey grafikleri (surface plot) ise üç boyutlu grafiklerdir. Her iki grafik türüne ait örnekler Şekil 2.13'te gösterilmiştir. Bu grafikleri inceleyerek, optimizasyon kriterlerine göre yanıtın en yüksek, en düşük ya da belirli bir aralıktaki değeri aldığı koşullar belirlenebilir.



Şekil 2.13. Kontur grafiği ve yanıt yüzey grafiği örnekleri.

Ancak ikiden fazla faktör olması durumunda grafiklerle optimum noktayı belirlemek güçleşir. Bu durumlarda matematiksel fonksiyonun türevini almak ve sıfıra eşitlemek mümkündür. Böylece kuadratik modelin kritik noktasının (minimum, maksimum ya da eyer noktası) koordinatları hesaplanabilir. Eğer istenilen nokta modelin kritik noktası değilse kısıtlı optimizasyon algoritmasını içeren bir yöntem kullanılabilir (Bezerra vd., 2008; Vera Candiotti vd., 2014).

2.7.4. İsteklilik fonksiyonları

Bir deneysel süreçte optimize edilmek istenilen birden fazla yanıtın olduğu durumlarda, her yanıt için en iyi sonucu veren bir koşul bulmak mümkün olmayabilir. Bu durumlarda genel yaklaşım, uzlaşmacı bir çözüm üretmek her bir yanıtın istenilen değere belirli bir derecede yakın olduğu koşulu belirlemektir. Bu uzlaşmacı optimum noktayı belirlemek az sayıda faktör ve yanıtın olduğu durumlarda kontur grafiklerinin görsel incelenmesi ile mümkün olabilir. Ancak faktör sayısının ve yanıtların arttığı durumlarda optimizasyon işlemi daha karmaşık bir hal alır. Bu gibi durumlar için birden çok yanıtın tek bir yanıtla çevrildiği isteklilik fonksiyonları geliştirilmiştir.

Derringer isteklilik fonksiyonu (Derringer's desirability function) birden çok yanıtın optimize edilmesi gerektiği durumlarda sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde analizler sonucu toplanmış olan her bir yanıt değeri, bireysel isteklilik fonksiyonlarına ($d_i \hat{y}_i$) dönüştürülür. İsteklilik değerleri 0 ve 1 arasında bir değer alır, 0 istenmeyen değeri, 1 ideal değeri ifade eder. Bu dönüşüm aşağıdaki eşitlikler yardımıyla yapılır. Eğer bir yanıtın mümkün olan en yüksek değeri alması isteniyorsa Eşitlik 2.8, en

düşük değeri alması isteniyorsa Eşitlik 2.9, bir aralıkta olması isteniyorsa Eşitlik 2.10 kullanılır.

$$di(\hat{y}_i(x)) = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left[\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right]^s & L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{array} \right\} \quad (2.8)$$

$$di(\hat{y}_i(x)) = \left\{ \begin{array}{ll} 1 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left[\frac{U_i - \hat{y}_i(x)}{U_i - L_i} \right]^t & L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{array} \right\} \quad (2.9)$$

$$di(\hat{y}_i(x)) = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left[\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & L_i < \hat{y}_i(x) < T_i \\ 1 & \hat{y}_i(x) = T_i \\ \left[\frac{\hat{y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right]^t & T_i < \hat{y}_i(x) < U_i \\ 0 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{array} \right\} \quad (2.10)$$

Eşitlikteki L_i ve U_i sırasıyla kabul edilebilir en düşük ve en yüksek değerler, T_i ise hedef değerdir. s ve t değerleri ağırlık olarak adlandırılır ve yanıtın istenilen değere yakınlığının önemine göre belirlenir.

Her bir yanıtın $d_i \hat{y}_i$ değerine çevrilmesinin ardından, tasarımdaki her bir koşula ait $d_i \hat{y}_i$ ile genel isteklilik (D) değeri Eşitlik 2.11 ile hesaplanır. Bu basamakta analiz açısından daha önemli yanıtlar varsa onlara ait isteklilik fonksiyonlarının ağırlığı (r) daha yüksek tutulabilir.

$$D = (d_1^{r_1} x d_2^{r_2} x \dots x d_n^{r_n})^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (2.11)$$

Tasarımdaki her koşul için D değerleri hesaplandıktan sonra, bu değer tek yanıt gibi kullanılarak modelleme işlemi ve optimizasyon işlemleri kolaylıkla yürütülebilir (Vera Candioti vd., 2014).

3. GEREÇLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Asetik asit	: Merck, Almanya.
Asetonitril, YPSK gradient saflıkta	: Carlo Erba, Fransa.
Borik asit	: Merck, Almanya.
Des-asil grelin	: Tocris, İngiltere.
Floreskamin	: TCI Chemicals, Japonya.
Formik asit, %99-100	: VWR Chemicals, Fransa.
Fosforik asit, %85	: VWR Chemicals, Fransa.
Grelin	: Tocris, İngiltere.
Metanol, YPSK gradient saflıkta	: Sigma Aldrich, Almanya.
Motilin	: Tocris, İngiltere.
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck, Almanya.
Sodyum asetat trihidrat	: Merck, Almanya.
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya.
Su, YPSK saflığında	: Isolab, Almanya.
Trifloroasetik asit >%99	: Sigma Aldrich, Almanya.

3.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye.
Derin dondurucu	: Panasonic, MDF-U500VX-PE, Japonya.
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre.
İnsan des-asil grelin ELISA kiti	: Bioassay technology Laboratory, E4218Hu, Çin.
İnsan grelin ELISA kiti	: Bioassay technology Laboratory, E3091Hu, Çin.
İnsan motilin ELISA kiti	: Bioassay technology Laboratory, E1354Hu, Çin.
Karıştırıcı	: Eppendorf, Thermomixer Comfort, Almanya. Millex, Durapore, PVDF (4 mm çap, 0,2 µm por çapı), Japonya.
pH metre	: Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion meter S220, İsviçre.
Santrifüj cihazı	: Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Almanya.
Şırınga filtreler	: GVS, rejenere selüloz (13 mm çap, 0,22 µm por çapı), Amerika Birleşik Devletleri.

Ultra saf su cihazı	: Millipore, Ultrapure Water System, Fransa.
Ultrafiltrasyon tüpleri	: Sartorius Vivaspin 2 (2000 dalton molekül ağırlığı, Hydrosart membran), İngiltere.
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510H, Almanya.
Vorteks karıştırıcı	: Velp Scientifica, ZX3, İtalya.
YPSK dedektörü	: Agilent, 1260 Infinity Floresans dedektör, Almanya.
YPSK kolonları	: Agilent Zorbax C ₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), Amerika Birleşik Devletleri.
YPSK	: Agilent, 1290 Infinity Binary (ikili pompa, degazör, otosampler ve termostatlı kolon bölümlerinden oluşan) Sıvı Kromatografisi Sistemi, Almanya.

3.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

Agilent Chem Station	: Kromatogramların incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.
GraphPad Prism 9	: Validasyon çalışmalarında verilerin istatistiksel analizi amacıyla kullanılmıştır.
Microsoft Excel 2021	: Veri yönetimi amacıyla kullanılmıştır.
Minitab 10	: Deneysel tasarım çalışmalarında veri analizi amacıyla kullanılmıştır.

4. YÖNTEM

4.1. Grelin Tayini

4.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Grelin stok çözeltisi grelin standardının %0,1 formik asit içeren suda çözünmesi ile 1 mg/mL derişimde hazırlanmıştır. Des-asil grelin stok çözeltisi, des-asil grelin standardının suda çözünmesi ile 1 mg/mL derişimde hazırlanmıştır. Çözeltiler viallere paylaştırılarak -80°C'de saklanmıştır. Farklı derişimdeki standart çözeltiler, stok çözeltiler su ile seyreltilerek hazırlanmış ve çalışılmadığı zamanlarda -20°C'de saklanmıştır. Bütün çözeltilerin hazırlanışında düşük peptit adsorbsiyonlu vialler kullanılmıştır.

Türevlendirme işlemlerinde kullanılmak üzere borat tamponu (pH 9, 100 mM) ve floreskamin çözeltileri (1 mg/mL) hazırlanmıştır. pH 9; 0,5 M stok tampon çözeltisini hazırlamak için 0,31 g borik asit tartılmış ve 9 mL suda çözülmüştür. Başka bir vialde 0,2 g NaOH tartılmış ve 1 mL suda çözülmüştür. Borik asit çözeltisinin pH'sı hazırlanan NaOH çözeltisi ile pH 9'a ayarlandıktan sonra, çözelti hacmi su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 100 mM tampon çözeltisi bu stok çözeltinin su ile seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Floreskamin stok çözeltisi ise 1 mg floreskamin'in tartılıp, 1 mL asetonitrilde çözümlenmesi ile hazırlanmış ve karanlıkta saklanmıştır.

Türev koşullarının optimizasyonu sırasında kullanılan floresan reaktiflerin çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. Bütün floresan reaktif çözeltileri -20°C'de ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. OPA reaktifi hariç tüm çözeltilerin seyreltmeleri, ilgili stok çözeltisinin hazırlandığı çözücü ile yapılmıştır. OPA reaktifi borat tamponu (pH 9, 100 mM) kullanılarak seyreltilmiştir.

- OPA çözeltisini hazırlamak için 27 mg OPA tartılmış ve 1 mL metanolde çözülmüştür. Bu çözelti borat tamponu (pH 9, 100 mM) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltiye 5 µL saf 2-merkaptotanol eklenmiş ve 2 dakika vorteksenmiştir. Bu çözelti kullanılmadan önce 1/4 oranında borat tamponu (pH 9, 100 mM) ile seyreltilmiştir (5 mM).
- FMOC-Cl çözeltisi, 1 mg FMOC-Cl 500 µL asetonitrilde çözümlenerek hazırlanmıştır (7,7 mM).

- Floresein çözeltisini hazırlamak için 0,32 mg floresein tartılmış, üzerine 320 µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş ve floresein'in çözünmesi sağlanmıştır (3 mM).
- 4-floro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) çözeltisi 0,170 mg NBD-F tartılıp, 1000 µL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır (0,93 mM).
- Floreskamin çözeltisi 2 mg floreskamin tartılıp, 1 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır (7,2 mM).

4.1.2. Çalışma çözeltilerinin hazırlanması

Çalışma çözeltileri proteinleri çöktürülmüş plazmaya standart analit çözeltilerinin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Plazma numuneleri 1:3 oranında asetonitril ilavesinin ardından 30 saniye boyunca vorteksle karıştırılmış ve 15 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı 0,2 µm por çaplı polivinilidin florür (PVDF) filtre ile süzülerek başka bir vialde ayrılmıştır. Elde edilen bu süpernatantın 90 µL'si 10 µL standart analit çözeltileri ile karıştırılarak farklı derişimlerde çalışma çözeltileri taze olarak hazırlanmıştır.

4.1.3. Türev koşulları

100 µL analit içeren plazmaya 50 µL tampon çözeltisi (pH 9, 100 mM borat tamponu) eklenmiş ve vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Ardından vialde 50 µL floreskamin çözeltisi (1 mg/mL derişimde, asetonitrilde hazırlanmış) eklenmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir. 50°C'ye ayarlanmış karıştırıcıda 4 dakika karıştırılarak bekletilen türev çözeltileri analiz için viallere alınmıştır.

4.1.4. Kromatografik koşullar

Analizler Zorbax C₈ kolonda (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,2 trifloroasetik asit içeren su ve %0,2 trifloroasetik asit içeren asetonitril ile gerçekleştirilmiştir. Analizler için gradient program kullanılmıştır. Organik faz yüzdesi (%B) 15 dakikada %40'dan %70'e artırılmıştır. Ardından kolonu yıkamak amacıyla organik faz yüzdesi 1 dakika içerisinde %90'a kadar çıkarılmış ve 4 dakika bu çözelti ile yıkanmıştır. Organik faz yüzdesi 30 saniyede tekrar %40'a düşürülerek bir sonraki analizden önce 2,5 dakika boyunca kolon şartlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve kolon

sıcaklığı 30°C'dir. Eksitasyon dalgaboyu 390 nm, emisyon dalgaboyu 495 nm olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Toplam analiz süresi, yıkamalar dahil 23 dakikadır.

4.1.5. Analitik yöntem validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları kapsamında özgünlük, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik, LOD ve LOQ tespiti ve stabilite parametreleri araştırılmıştır. Bu parametreler araştırılırken ICH (2005) ve FDA'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu (FDA, 2018) kaynak olarak alınmıştır.

4.1.5.1. Kesinlik ve doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, bulunması gereken değer (ya geleneksel bir gerçek değer ya da kabul edilen bir referans değer) ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik ise aynı numunenin çoklu örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlığını ifade eder (ICH, 2005). Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini göstermek amacıyla 40, 125 ve 500 ng/mL derişimlerinde grelin ve des-asil grelin eklenmiş plazma çözeltileri hazırlanmış ve türevlendildikten sonra analiz edilmiştir. Analizler aynı gün içerisinde 6'şar tekrarlar (gün içi) ve üç set halinde (günler arası) yapılmıştır.

Hesaplamalar için analizlerden elde edilen pik alanları kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği $[(\text{standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100]$ denklemi ile hesaplanan % bağıl standart sapma (BSS) ile, doğruluğu ise % geri kazanım $[\text{ölçülen derişim} / \text{teorik derişim} \times 100]$ değerleri ile değerlendirilmiştir.

4.1.5.2. Doğrusallık

Analitik prosedürün doğrusallığı, belirli bir derişim aralığında numunedeki analitin derişimi ile doğru orantılı olan sonuçlar elde edilmesi ile gösterilir (ICH, 2005). Yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla grelin ve des-asil grelin'in 20-800 ng/mL derişim aralığında 6 nokta içeren 3 kalibrasyon seti hazırlanmış ve farklı günlerde tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Eklenen derişimler ile elde edilen sonuçlar (pik alanları) kullanılarak lineer regresyon analizi yapılmış, eğim, kesim ve tayin katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin doğrusallığı tayin katsayısı (R^2) değeri ile değerlendirilmiştir.

4.1.5.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı

Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ tespiti için farklı seviyelerdeki kalite kontrol numunelerinin analizlerine ait kromatogramlardaki sinyal/gürültü değerleri kullanılmıştır. Her bir analit için sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim LOD ve 10 olduğu derişim LOQ olarak belirlenmiştir.

4.1.5.4. Özgünlük

Bir analitik yöntemin özgünlüğü, numunedeki olası girişim yapan bileşenlerin varlığında analiti ayırt etme ve tayin etme yeteneğidir (ICH, 2005). Geliştirilen yöntemin özgünlüğünü değerlendirmek amacıyla 6 farklı gönüllüden toplanan plazma numuneleri analiz edilerek, analitlerin alıkonma zamanında bozucu piklerin varlığı incelenmiştir.

Ayrıca 125 ng/mL derişimde grelin ve des-asil grelin içeren plazma numunesinin analizinde pik saflığı değerleri de yöntemin özgünlüğünü destekler bir bilgi olarak değerlendirilmiştir.

4.1.5.5. Stabilité

Analit çözeltilerinin çalışma koşullarındaki dayanıklılığı stabilite çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu amaçla üç farklı derişimde (400, 1250 ve 5000 ng/mL) grelin ve des-asil grelin içeren standart çözeltiler kısa dönem bekletme (24 saat, oda sıcaklığında), uzun dönem bekletme (1 hafta, -20°C'de) ve dondurma-eritme döngüsüne (3 döngü) maruz bırakılmıştır. Ardından çözeltiler boş plazmaya ilave edilerek 40, 125 ve 500 ng/mL derişimlerinde analit içeren plazma çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltiler türevlendirildikten sonra 3 tekrarlı analiz edilerek çözeltilerin stabiliteleri incelenmiştir.

Analizlerden elde edilen pik alanları kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmış ve standart analit çözeltilerinin stabilitesi değerlendirilmiştir.

4.1.5.6. Geri kazanım

Numune hazırlama yöntemi olarak asetonitil ile protein çöktürme ve katı faz ekstraksiyonu yöntemleri kullanılarak denemeler yapılmıştır. Numune hazırlama yönteminin uygulanmasından önce düşük, orta ve yüksek derişimde grelin ve des-asil grelin eklenmiş plazma numuneleri hazırlanmış ve ilgili işlemlerin ardından elde edilen çözelti türevlendirilerek analiz edilmiştir. Bu yöntemlerin verimleri kalibrasyon eğrisi

yardımı ile hesaplanan geri kazanım değerleri ile karşılaştırılmıştır. Geri kazanım (%) değeri, $[(\text{hesaplanan derişim} / \text{eklenen derişim}) \times 100]$ formülü ile hesaplanmıştır.

4.1.6. Analitlerin insan plazmasında tayini

Geri kazanım çalışmaları sırasında hem grelin hem de des-asil grelin'in geri kazanım değerlerinin çok düşük olması ve yapılan bütün denemelere rağmen iyileştirilememesi nedeniyle geliştirilen yöntem numunelerde uygulanamamıştır.

4.2. Motilin Tayini

4.2.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Motilin stok çözeltisi motilin standardının suda çözünmesi ile 1 mg/mL derişimde hazırlanmıştır. Çözelti viallere paylaştırılarak -80°C'de saklanmıştır. Farklı derişimlerde motilin içeren standart çözeltiler, stok çözeltiler su ile seyreltilerek hazırlanmış ve çalışılmadığı zamanlarda -20°C'de saklanmıştır. Motilin içeren bütün çözeltilerin hazırlanışında düşük peptid adsorbsiyonlu vialler kullanılmıştır.

Türevlendirme işlemlerinde kullanılmak üzere borat tamponu (pH 9, 100 mM) ve floreskamin çözeltileri (1 mg/mL) hazırlanmıştır. pH 9, 500 mM stok tampon çözeltisini hazırlamak için 0,31 g borik asit tartılmış ve 9 mL suda çözülmüştür. Başka bir vialde 0,2 g NaOH tartılmış ve 1 mL suda çözülmüştür. Borik asit çözeltisinin pH'sı hazırlanan NaOH çözeltisi ile pH 9'a ayarlandıktan sonra, çözelti hacmi su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 100 mM tampon çözeltisi, bu stok çözelti su ile seyreltilerek elde edilmiştir. Floreskamin stok çözeltisi ise 1 mg floreskamin'in tartılıp, 1 mL asetonitrilde çözülmesi ile hazırlanmış ve karanlıkta saklanmıştır.

4.2.2. Çalışma çözeltilerinin hazırlanması

Çalışma çözeltileri proteinleri çöktürülmüş plazmaya standart motilin çözeltilerinin eklenmesi ile analiz öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Plazma numuneleri 1:3 oranında asetonitril ilavesinin ardından vorteksle karıştırılmış ve 15 dakika, 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı 0,2 µm por çaplı PVDF filtre ile süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen bu süpernatantın 90 µL'sine 10 µL standart motilin çözeltisi ilave edilerek, farklı derişimlerde çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

4.2.3. Numunelerin hazırlanması

300 µL insan plazması üzerine 900 µL asetonitril eklenerek karıştırılmış ve proteinleri çöktürülmüştür. Karışım 15 dakika, 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1000 µL'si ultrafiltrasyon tüpüne alınarak 4000 rpm'de 40 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Tüpteki membran üstünde kalan konsantre çözelti alınarak, türevlendirilmiş ve 0,2 µm por çaplı PVDF filtre ile süzöldükten sonra analiz edilmiştir.

4.2.4. Türev koşulları

100 µL motilin içeren plazmaya 50 µL tampon çözeltisi (pH 9, 100 mM borat tamponu) eklenmiş ve vorteks yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Ardından vial 50 µL floreskamin çözeltisi (1 mg/mL derişimde, asetonitrilde hazırlanmış) eklenmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir. Türev çözeltileri 50°C'ye ayarlanmış karıştırıcıda 4 dakika karıştırılarak bekletildikten sonra, analiz için viallere alınmıştır.

4.2.5. Kromatografik koşullar

Analizler Zorbax C₈ kolonda (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,1 trifloroasetik asit içeren su ve %0,1 trifloroasetik asit içeren asetonitril ile gerçekleştirilmiştir. Analizler için gradient program kullanılmıştır. Organik faz yüzdesi (%B) 13 dakikada %30'dan %65'e artırılmıştır. Ardından kolonu yıkamak amacıyla organik faz yüzdesi 1 dakika içerisinde %90'a kadar çıkarılmış ve 4 dakika bu çözelti ile yıkanmıştır. Organik faz yüzdesi 30 saniyede tekrar %30'a düşürölerek bir sonraki analizden önce 2,5 dakika boyunca kolon şartlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 20°C'dir. Eksitasyon dalgaboyu 390 nm, emisyon dalgaboyu 495 nm olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Toplam analiz süresi, yıkamalar dahil 21 dakikadır.

4.2.6. Analitik yöntem validasyonu

Validasyon çalışmaları kapsamında ICH (2005) ve FDA'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu (FDA, 2018) kaynak olarak alınarak özgünlük, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik, LOD ve LOQ ve stabilite parametreleri araştırılmıştır.

4.2.6.1. Kesinlik ve doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini göstermek amacıyla 7,5; 30 ve 120 ng/mL derişimlerinde motilin eklenmiş plazma çözeltileri hazırlanmış ve türevlendirildikten sonra analiz edilmiştir. Analizler aynı gün içerisinde 6'şar tekrarlar (gün içi) ve üç set halinde (günler arası) yapılmıştır.

Hesaplamalar için analizlerden elde edilen pik alanları kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği % BSS [(standart sapma / ortalama) × 100], doğruluğu ise % geri kazanım [ölçülen derişim / teorik derişim × 100] ile değerlendirilmiştir.

4.2.6.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla 2-200 ng/mL derişim aralığında 7 nokta içeren 3 kalibrasyon seti hazırlanmış ve farklı günlerde tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Eklenen derişimler ile elde edilen sonuçlar (pik alanları) kullanılarak lineer regresyon analizi yapılmış, eğim, kesim ve tayin katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin doğrusallığı tayin katsayısı (R^2) değeri ile değerlendirilmiştir.

4.2.6.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı

LOD ve LOQ tespiti için farklı seviyelerdeki kalite kontrol numunelerinin analizlerine ait kromatogramlardaki sinyal/gürültü değerleri kullanılmıştır. Her bir analit için sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim LOD ve 10 olduğu derişim LOQ olarak belirlenmiştir.

4.2.6.4. Özgünlük

Geliştirilen yöntemin özgünlüğünü 6 farklı gönüllüden toplanan plazma numunelerinin analizi ile araştırılmıştır. Bu analizlere ait kromatogramlarda motilin'in alıkonma zamanında bozucu piklerin varlığı incelenmiştir.

Ayrıca 100 ng/mL derişimde motilin içeren plazma numunesinin analizinde motilin'e ait pikin saflık değeri de hesaplanmış ve yöntemin özgünlüğünü destekler bir bilgi olarak değerlendirilmiştir.

4.2.6.5. *Stabilite*

Analit çözeltilerinin çalışma koşullarındaki dayanıklılığı stabilite çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu amaçla 75, 300 ve 1200 ng/mL derişimlerinde motilin çözeltileri kullanılmıştır. Çözeltiler kısa dönem bekletme (24 saat, oda sıcaklığında), uzun dönem bekletme (1 hafta, -20°C'de) ve dondurma-eritme döngüsü (3 döngü) sonrası boş plazmaya ilave edilerek 7,5; 30 ve 120 ng/mL derişimlerinde motilin eklenmiş plazma çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltiler türevlendirildikten sonra 3 tekrarlı analiz edilerek çözeltilerin stabilitesi incelenmiştir.

Analizlerden elde edilen pik alanları kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmış ve standart çözeltilerin stabilitesi değerlendirilmiştir.

4.2.6.6. *Geri kazanım*

Numune hazırlama yöntemi olarak protein çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile denemeler yapılmıştır. Plazmaya düşük, orta ve yüksek derişimde motilin çözeltileri eklenmesinin ardından ilgili yöntemler uygulanmış ve elde edilen çözelti türevlendirilerek analiz edilmiştir. Bu yöntemlerin verimleri geri kazanım değerleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Geri kazanım (%) değeri, [(önceden analit eklenmiş plazmadaki pik alanı) / (sonradan analit eklenmiş plazmadaki pik alanı)] × 100 formülü ile hesaplanmıştır.

4.2.7. *Analitlerin insan plazmasında tayini*

Yöntemin uygulanabilirliği beş farklı gönüllüden alınan plazma numunelerindeki motilin miktarlarının tayini ile gösterilmiştir. Numunelerdeki motilin miktarları hem geliştirilen yöntemle hem de immünolojik bir yöntem olan bir ELISA kiti ile tayin edilmiş ve bulunan sonuçlar karşılaştırılmıştır.

5. BULGULAR ve YORUM

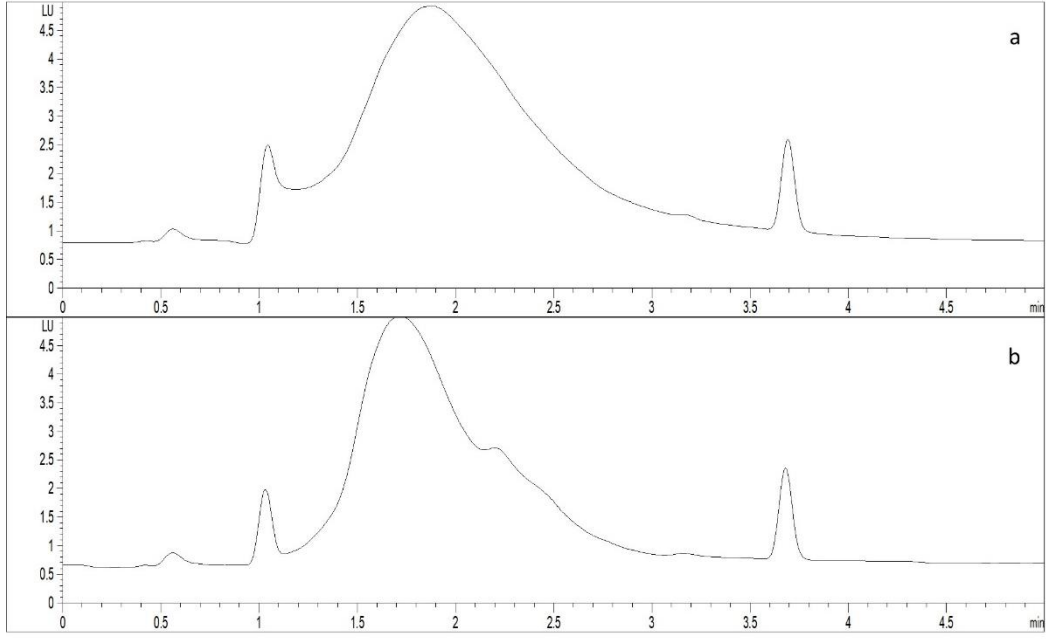
5.1. Türev Koşullarının Optimizasyonu

5.1.1. Türev ajanının seçilmesi ve ön denemeler

Optimizasyon çalışmalarına grelin için uygun türev ajanı araştırılarak başlanmıştır. Türev ajanı olarak peptit türevlendirmede kullanılmakta olan OPA, FMOC-Cl, floreskamin, floresein ve NBD-F maddeleri denenmiştir. Her türev ajanı için ilk önce literatür yardımıyla belirlenen protokoller denenmiş, ardından iyileştirmeler yapılmıştır. Farklı türev ajanları ile oluşan floresans türevlerin farklı kimyasal yapıda olmaları nedeniyle hızlı bir kromatografik optimizasyonun ardından yapılan analizlerin kromatogramları incelenmiştir.

OPA reaktifinin hazırlanışı ve türevlendirme protokolü Donzanti ve Yamamoto'nun (1988) çalışmasından uyarlanmıştır. 5 mM OPA reaktifi ve çalışma çözeltisinden eşit hacimde alınarak oluşturulan çözelti karıştırılmış ve 1 dakika beklemenin ardından enjeksiyon yapılmıştır. Eksitasyon dalga boyu 280 nm, emisyon dalga boyu 450 nm'ye ayarlanmıştır.

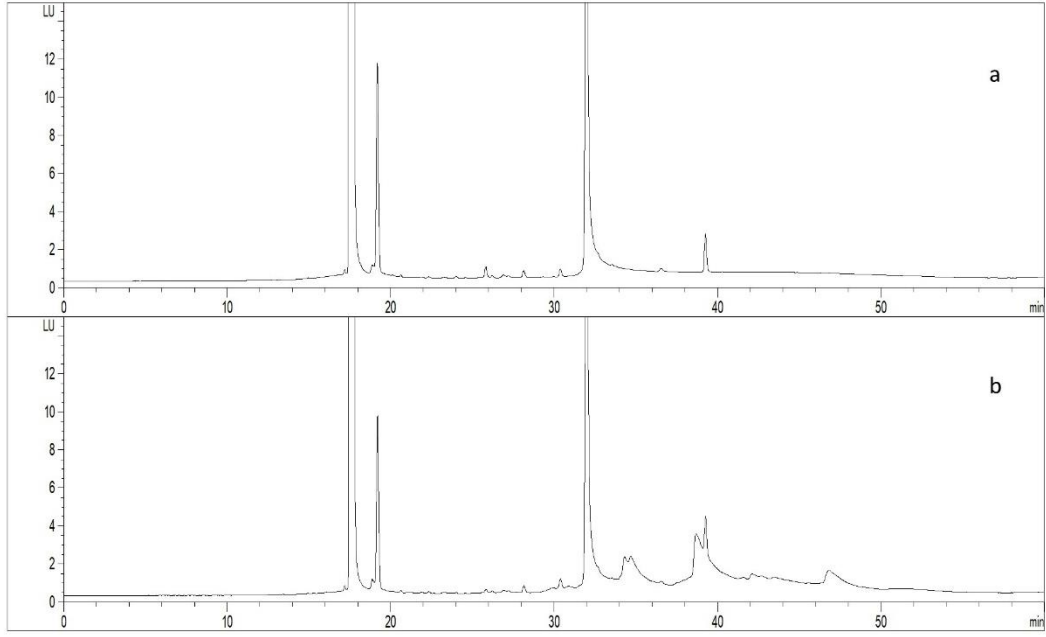
Şekil 5.1'de boş çözelti ve grelin çözeltisinin belirtilen protokolle türevlendirilmesi sonucu yapılan analizlerin kromatogramları görülmektedir. OPA'nın kendisinden kaynaklanan pikler dışında grelin'e ait olabilecek anlamlı bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 5.1. OPA ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltisinin kromatogramları.

FMOC-Cl ile türevlendirme protokolü Lozanov, Petrov ve Mitev'in (2004) çalışmasından uyarlanmıştır. 50 µL çalışma çözeltisi üzerine 100 µL borat tamponu (pH 9, 100 mM) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Ardından çözeltiliye 150 µL FMOC-Cl çözeltisi (0,78 mM) eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Çözelti 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra 30 µL derişik hidroklorik asit eklenmiştir. Çözelti vortekslenildikten sonra analiz edilmiştir. Eksitasyon dalgaboyu 265 nm, emisyon dalgaboyu 315 nm'ye ayarlanmıştır.

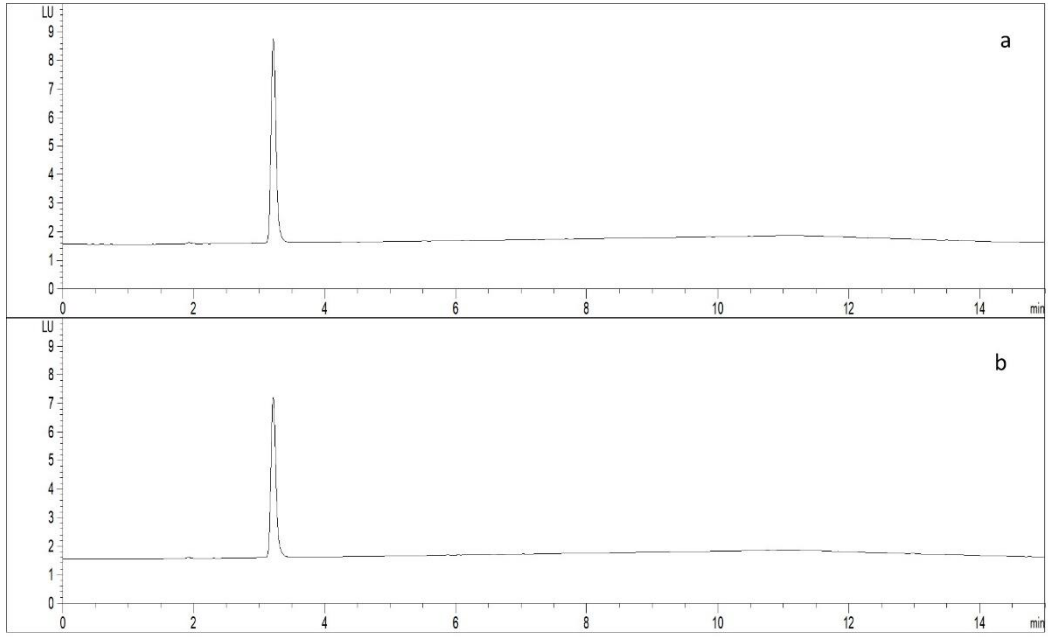
FMOC-Cl ile yapılan türevlendirme çözeltilerinin analizlerinde zemin oldukça gürültülüdür. Şekil 5.2'de görüldüğü gibi yaklaşık 18. dakikada gelen ve FMOC-Cl ile ilişkili olduğu düşünülen pik oldukça büyüktür. Bu piki küçültmek için FMOC-Cl derişimi azaltılmıştır ancak türev reaksiyonunun gerçekleşmesi için yüksek derişimde FMOC-Cl gerekmesi nedeniyle pik daha fazla küçültülememiştir. Türevlendirme sırasında reaksiyon ortamına hidroklorik asit eklenmesi, piki Şekil 5.2'deki boyutlara ulaştırmış ancak daha fazla etki göstermemiştir. Bu büyük pik dışında da FMOC-Cl ile ilişkili birçok pik gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 35 ile 40. dakika arasında grelin ile ilişkili olabilecek en az 4 pik gözlenmiştir. Zemin gürültüsü ve olası stabilite problemi nedeniyle FMOC-Cl ile çalışmalara son verilmiştir.



Şekil 5.2. FMOC ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltisinin kromatogramları.

Floresin ile türev protokolü Cheng vd.'nin (2017) çalışmasından yola çıkarak geliştirilmiştir. 100 µL çalışma çözeltisi üzerine 200 µL borat tamponu (pH 9, 100 mM) eklenmiştir. Çözelti vorteksledikten sonra 2 µL 3 mM floresin çözeltisi eklenmiş ve çözelti tekrar vortekslenmiştir. Hazırlanan çözelti 40°C'de ve karanlıkta 17 saat boyunca bekletilmiş ve süre sonunda analiz edilmiştir. Eksitasyon dalgaboyu 494 nm, emisyon dalgaboyu 512 nm'ye ayarlanmıştır.

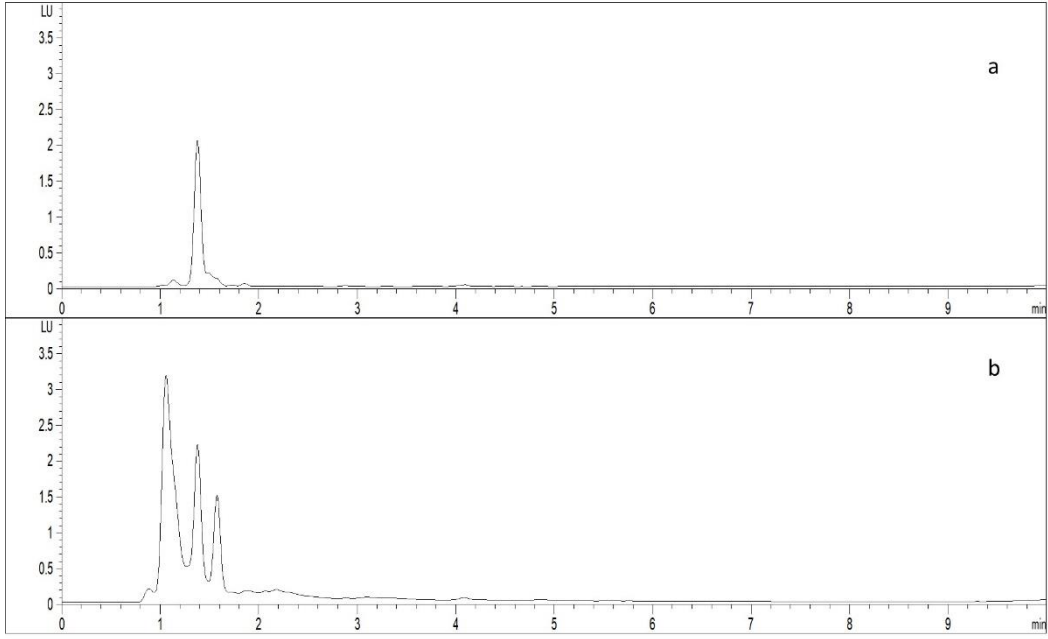
İlgili analizlerin kromatogramları Şekil 5.3'te verilmiştir. Kromatogramlarda grelin ile ilişkili olabilecek bir pik gözlenememesi nedeniyle floresin ile çalışmalara son verilmiştir.



Şekil 5.3. Floresein ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltisinin kromatogramları.

NBD-F ile yapılan çalışmalardaki protokol Yang vd.'nin (2006) çalışmasından uyarlanmıştır. 50 μ L çalışma çözeltisi üzerine 100 μ L borat tamponu (pH 9, 100 mM) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Çözeltiye 50 μ L NBD-F (0,93 mM) çözeltisi eklenmiş, vortekslenmiş ve 25°C'de ve karanlıkta 40 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltiye 50 μ L derişik hidroklorik asit eklenmiş ve analiz edilmiştir. Eksitasyon dalgaboyu 470 nm, emisyon dalgaboyu 540 nm'ye ayarlanmıştır.

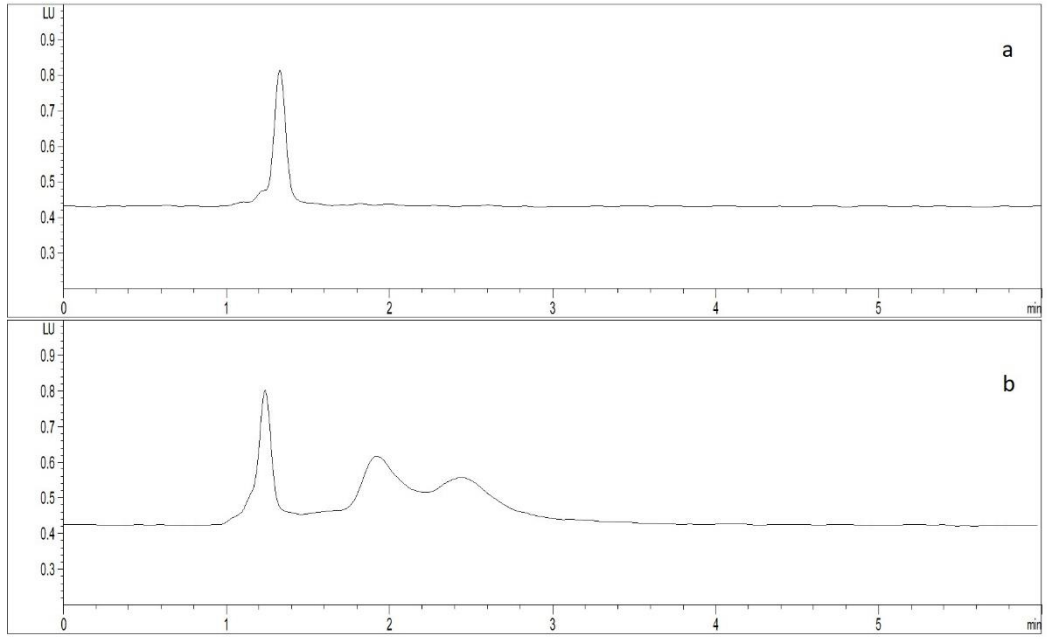
Şekil 5.4'te de görüldüğü gibi NBD-F ile hazırlanan çözeltilerin analizinde grelin'e ait olabilecek ve analitik kolonda tutunma süreleri çok kısa olan üç büyük pike rastlanmıştır. Olası grelin türev piklerine ait düşük tutunma sürelerinin, plazmadaki kirlilikler varlığında ayrımı zorlaştıracığı düşünülerek NBD-F ile çalışmalara devam edilmemiştir.



Şekil 5.4. NBD-F ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltisinin kromatogramları.

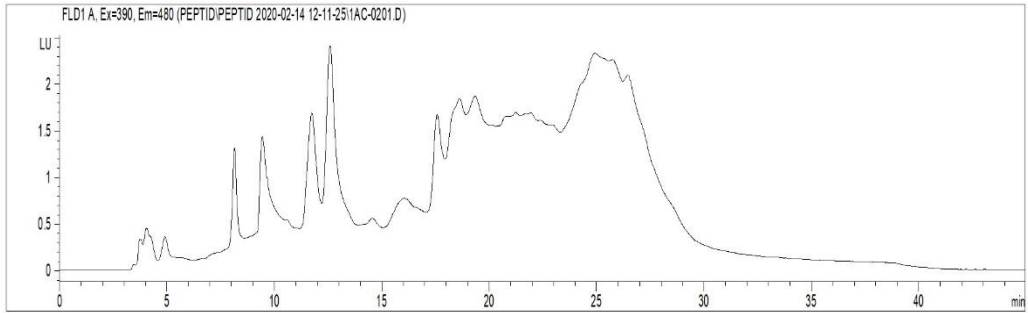
Floreskamin ile yürütülen çalışmalar Eggenreich vd.'nin (2004) yönteminden uyarlanmıştır. 10 μ L çalışma çözeltisi, 40 μ L borat tamponu (pH 8, 50 mM) ile karıştırılmış, ardından 50 μ L floreskamin çözeltisi (7,2 mM) eklenmiş ve karıştırılmıştır. 4 dakikanın ardından çözelti sisteme enjekte edilmiştir. Eksitasyon dalgaboyu 390 nm, emisyon dalgaboyu ilk çalışmalarda 450 nm'ye, ilerleyen analizlerde daha az gürültü görüldüğü için 480 nm'ye ayarlanmıştır.

Floreskamin ile hazırlanan çözeltilerin analizinde grelin'e ait olabilecek 2 büyük pike rastlanmıştır. İlgili kromatogramlar Şekil 5.5'te verilmiştir. Grel'in oktanoil modifikasyonunun stabilitesinin bazik ortamda azalması (Hosoda vd., 2004) ve türevlendirme protokolünün pH 9 borat tamponu kullanılarak yapılmış olması nedeniyle başlangıçta bu piklerin grelin ve des-asil grelin'in floreskamin türevlerine ait olabilecekleri düşünülmüştür. Tüm analizler değerlendirildiğinde daha az zemin gürültüsü gözlenmesi ve grelin ile des-asil grelin'e ait olabilecek iki pik gözlenmesi nedeniyle çalışmalara floreskamin ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 5.5. Floreskamin ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) grelin çözeltisinin kromatogramları.

Türev ajanı olarak floreskamin'in seçilmesinin ardından ilk iş olarak kromatogramlarda görülen iki piki ayırmak hedeflenmiş ve bu amaçla hareketli faz içeriği değiştirilip, daha düşük organik çözücü içeren bir hareketli faz kullanılmıştır. Bu yeni koşullarda piklerin ayrımı artmış, ancak ikiden fazla pik olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.6).

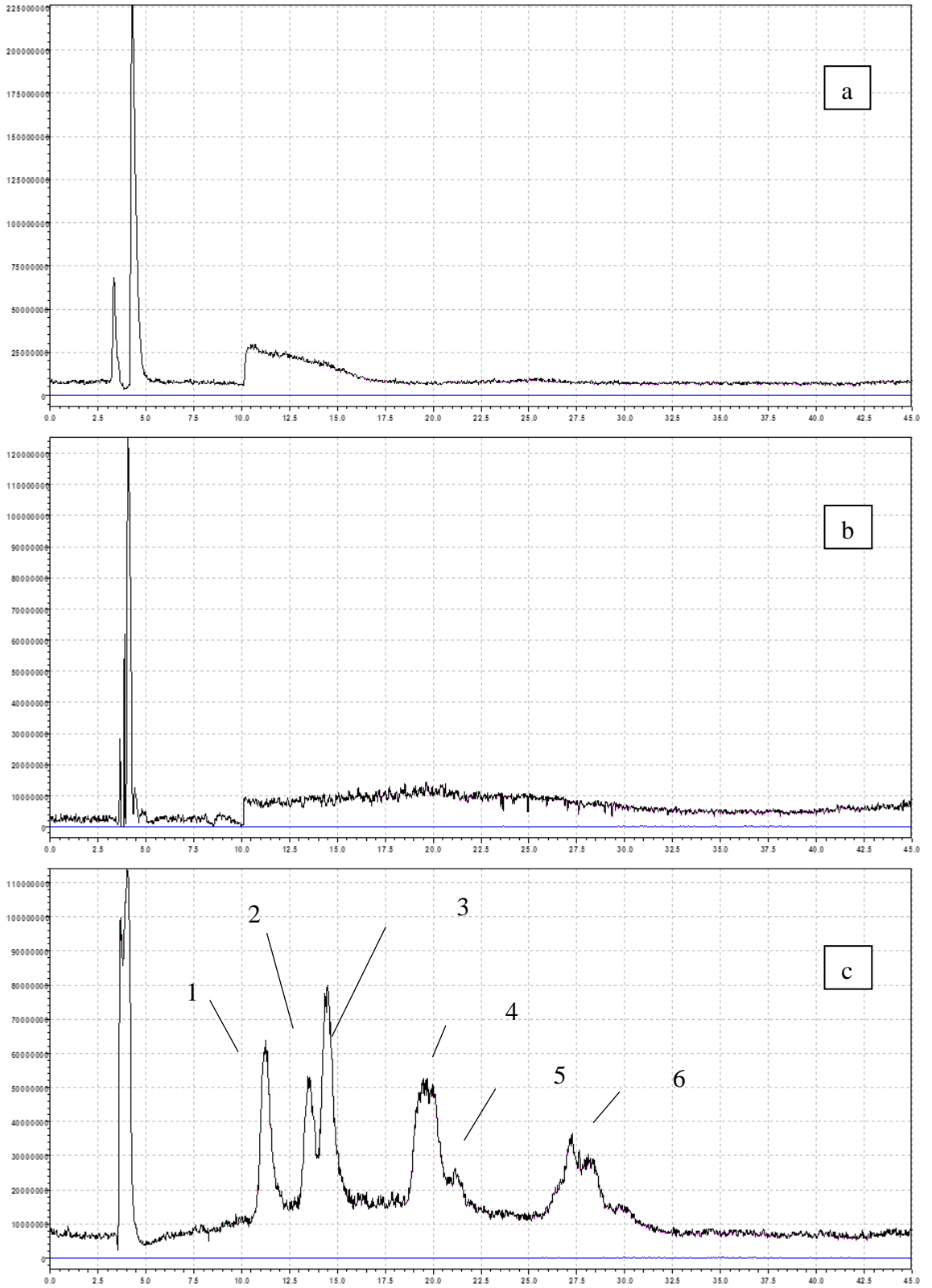


Şekil 5.6. Floreskamin ile türevlendirilmiş grelin çözeltisinin YPSK-FL ile elde edilmiş kromatogramı. Analiz koşulları: C_{18} kolon ($100 \times 4,6$ mm, $3,5 \mu\text{m}$, 300 \AA); gradient program, 25 dakikada %30-50 B, hareketli faz içeriği A:%0,1 formik asit içeren su, B:%0,1 formik asit içeren asetonitril; 0,3 mL/dk akış hızı, 50°C kolon sıcaklığı, 390 nm eksitasyon dalgaboyu, 480 nm emisyon dalgaboyu.

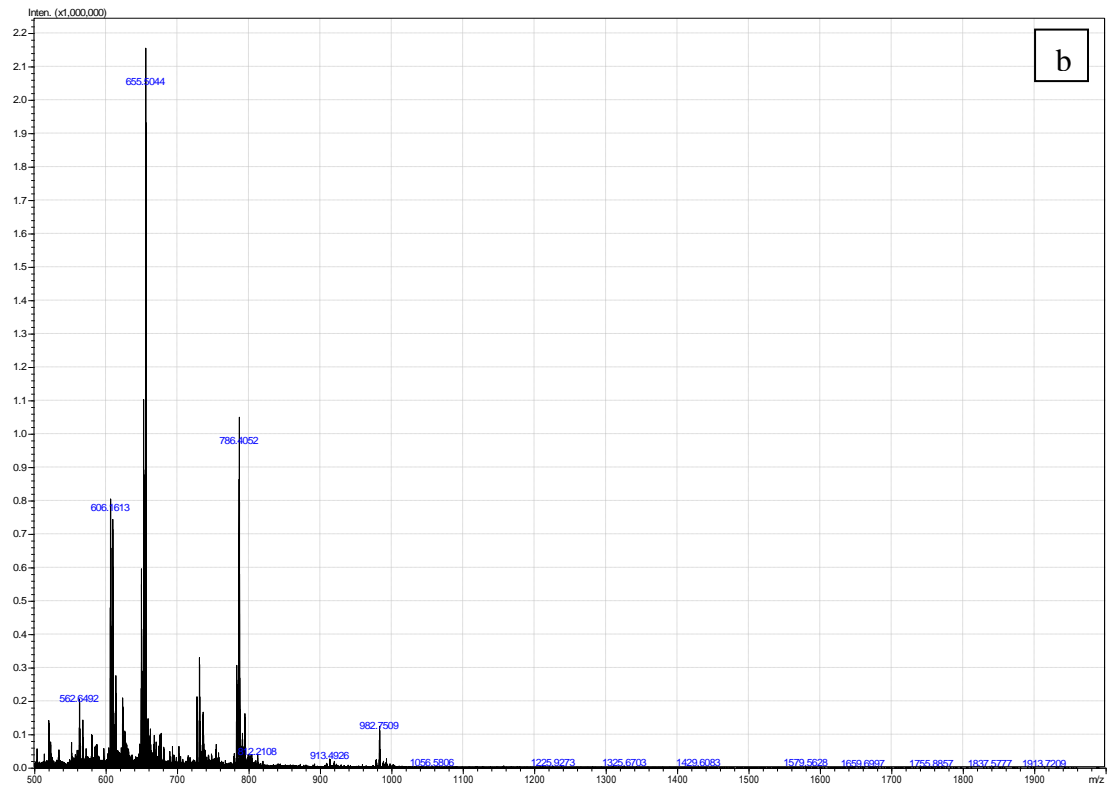
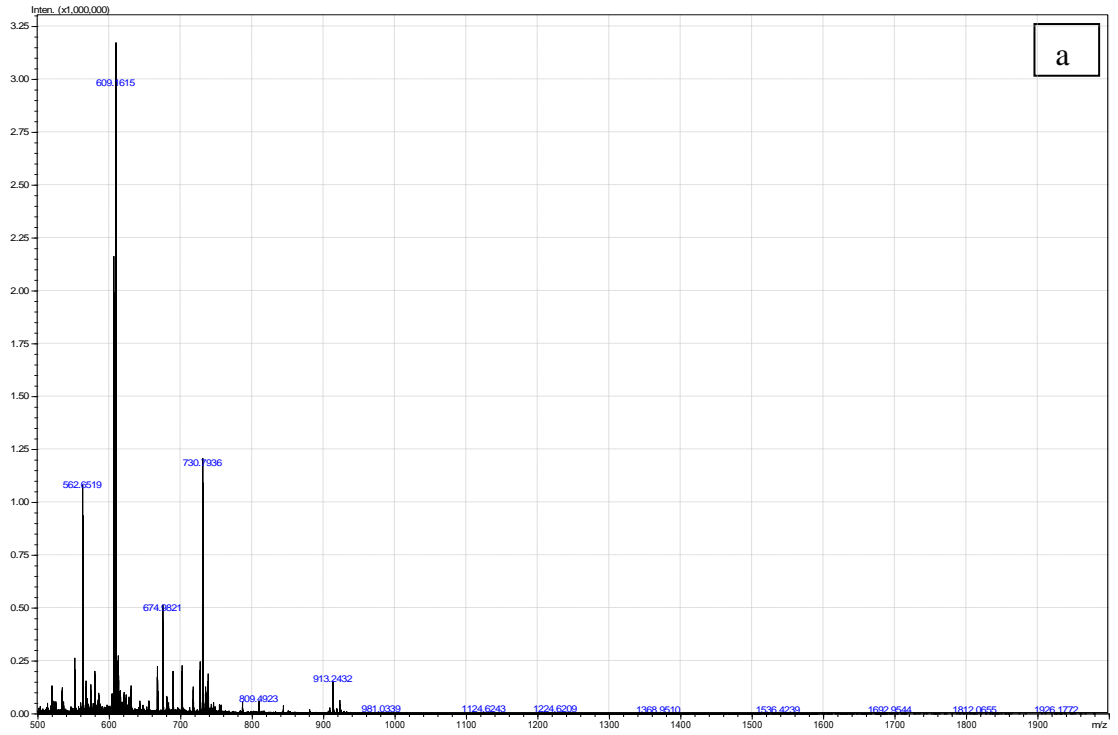
İlk olarak türev reaksiyonu sırasında grelin'in ortam koşullarından etkileniyor olabileceği ve parçalandığı düşünülmüştür. Yüksek pH'larda grelin'in oktanoil modifikasyonunun bozulduğu ve des-asil grelin oluştuğu bilinmektedir. Floreskamin ile türev reaksiyonunun pH 8-10 gibi yüksek pH'larda gerçekleşmesi nedeniyle bozunma

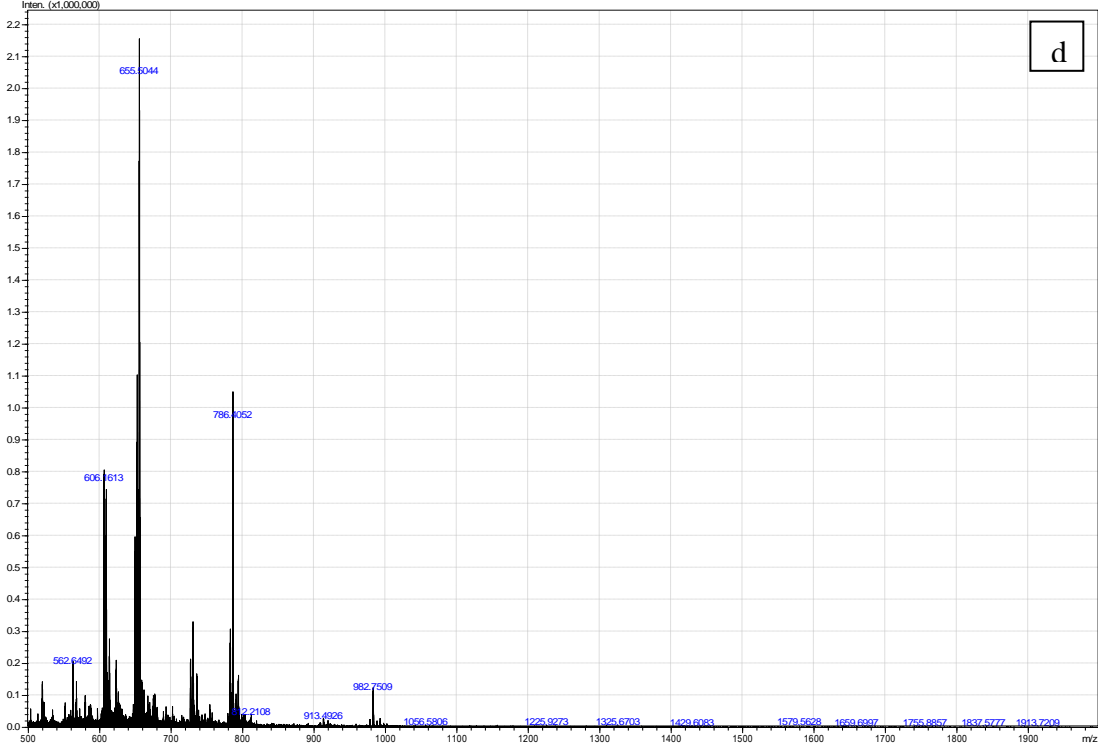
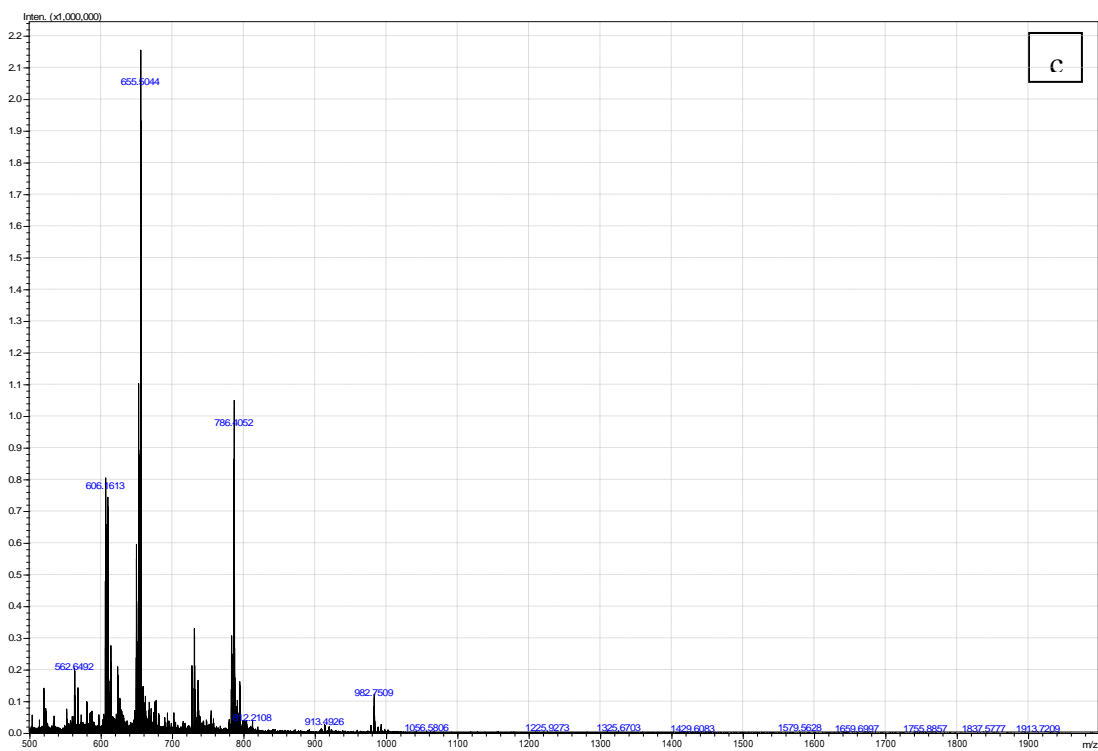
gerçekleşmiş olabilir. Ancak Hosoda vd. (2004) farklı pH'larda (pH 3-7,5), oda sıcaklığında ve 1 saat bekleyen plazma numunelerinde en fazla %20 bozunma olduğunu belirtmişlerdir. Optimizasyon çalışmaları sırasında reaksiyon süresinin 5 dakika olduğu göz önünde bulundurularak, bu kadar kısa sürede, fazla sayıda ve yüksek sinyale sahip bozunma ürünlerinin oluşması düşük ihtimaldir. Diğer bir olasılık ise grelin'in farklı yerlerinden floreskamin ile reaksiyon vererek, birden çok türev ürünü oluşturmasıdır. Aminlerle reaksiyona giren türev ajanlarının protein ve peptitlerin N-ucunun yanı sıra, lizin gibi primer amin içeren amino asitlerle de reaksiyon verdiği bilinmektedir. Proteinlerde çokça bulunan lizin kalıntısı nedeniyle tek protein molekülüne birçok florofor bağlanabilmektedir (Toseland, 2013). Duan vd. (2017) proteinlerin floreskamin ile etiketlenmesinin proteindeki lizin varlığı ve reaktivitesinden önemli ölçüde etkilendiğinden bahsetmişlerdir.

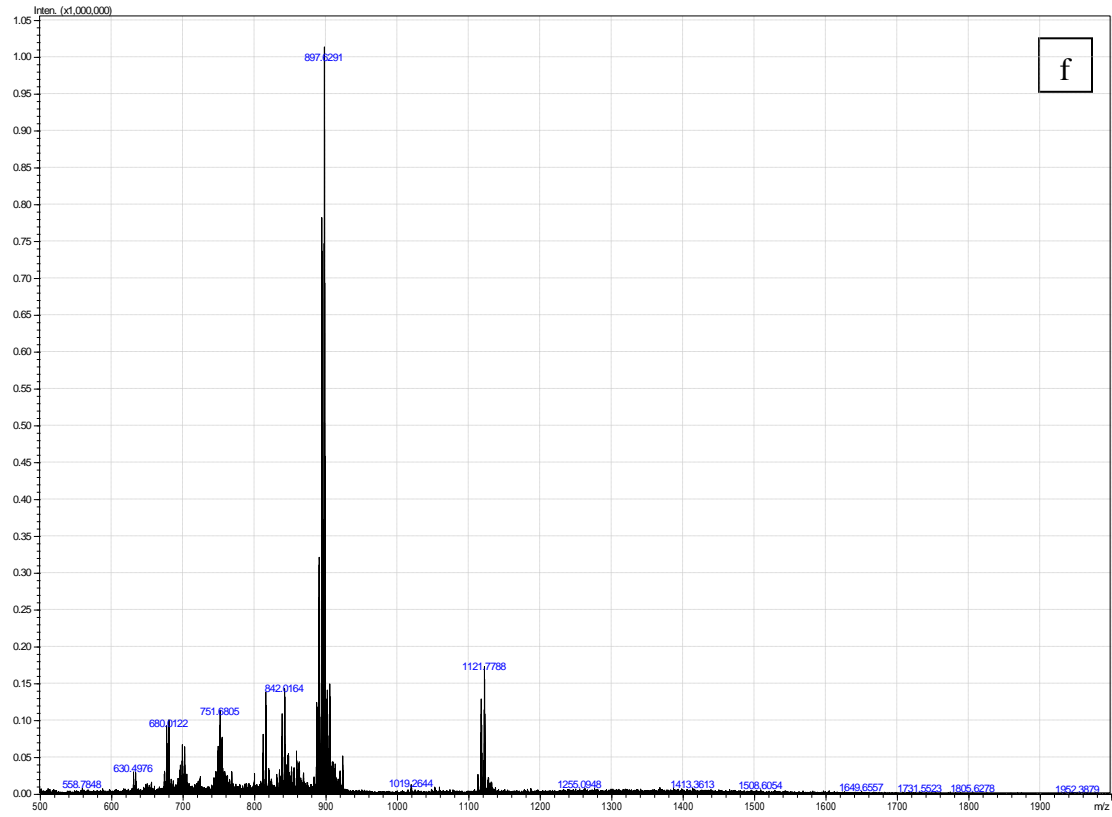
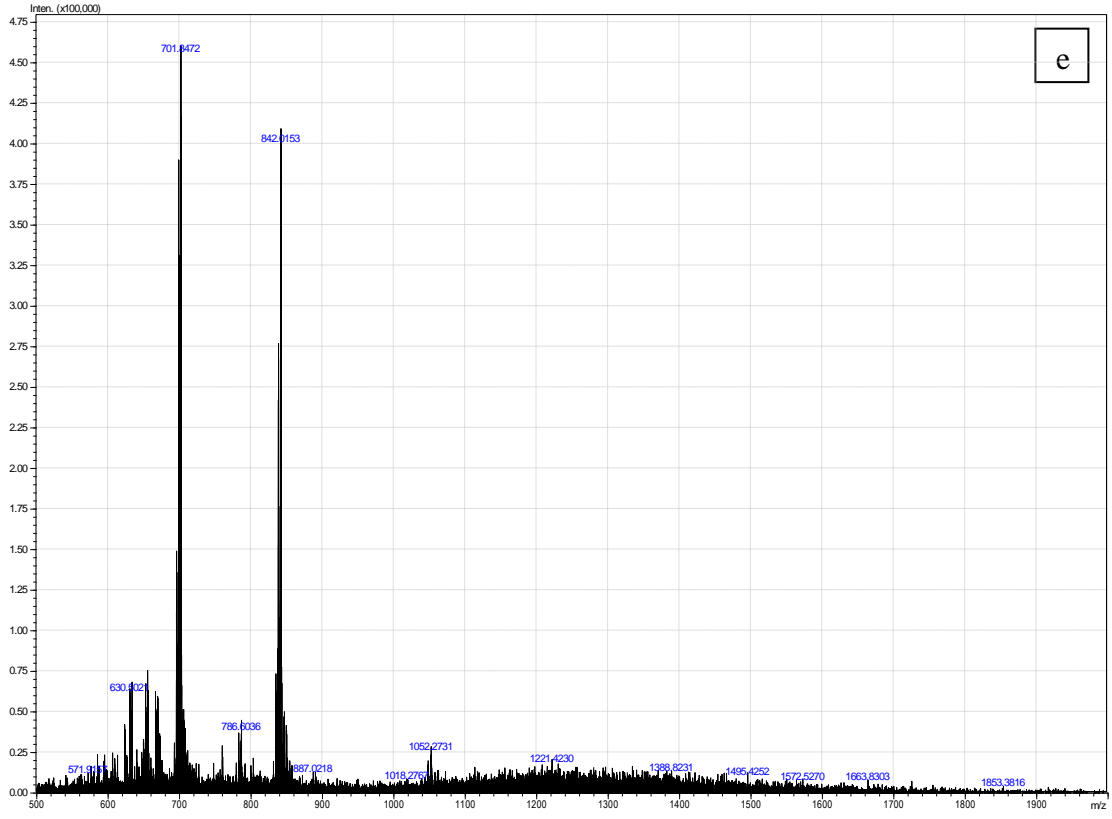
İlgili piklerin parçalanma ürünü mü yoksa grelin'e birden çok floreskamin bağlanması sonucu oluşan türevler mi olduğunu aydınlatmak amacıyla türev çözeltilerinin Anadolu Üniversitesi Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarında (DOPNA-LAB) YPSK-KS analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.7'de türevlendirilmemiş grelin çözeltisi, boş çözelti (grel in içermeyen çözücü, tampon ve türev çözeltisinden oluşan) ve floreskamin ile türevlendirilmiş grelin çözeltisinin YPKS-KS kromatogramları görülmektedir. KS spektrumları Şekil 5.8'de verilmiştir.



Şekil 5.7. YPSK-KS kromatogramları (a) türevlendirilmemiş grelin çözeltisi, (b) boş türev çözeltisi, (c) floreskamin ile türevlendirilmiş grelin çözeltisi. Analiz koşulları: C_{18} kolon ($100 \times 4,6$ mm, $3,5 \mu\text{m}$, 300 \AA); gradient program, 25 dakikada %30-50 B, hareketli faz içeriği A:%0,1 formik asit içeren su, B:%0,1 formik asit içeren asetonitril; 0,3 mL/dk akış hızı, 50°C kolon sıcaklığı.







Şekil 5.8. YPSK-KS spektrumları (a) 1.pik (11,3. dakika), (b) 2.pik (13,5. dakika), (c) 3.pik (14,5. dakika), (d) 4.pik (19,8. dakika), (e) 5.pik (21,2. dakika), (f) 6.pik (27,5. dakika).

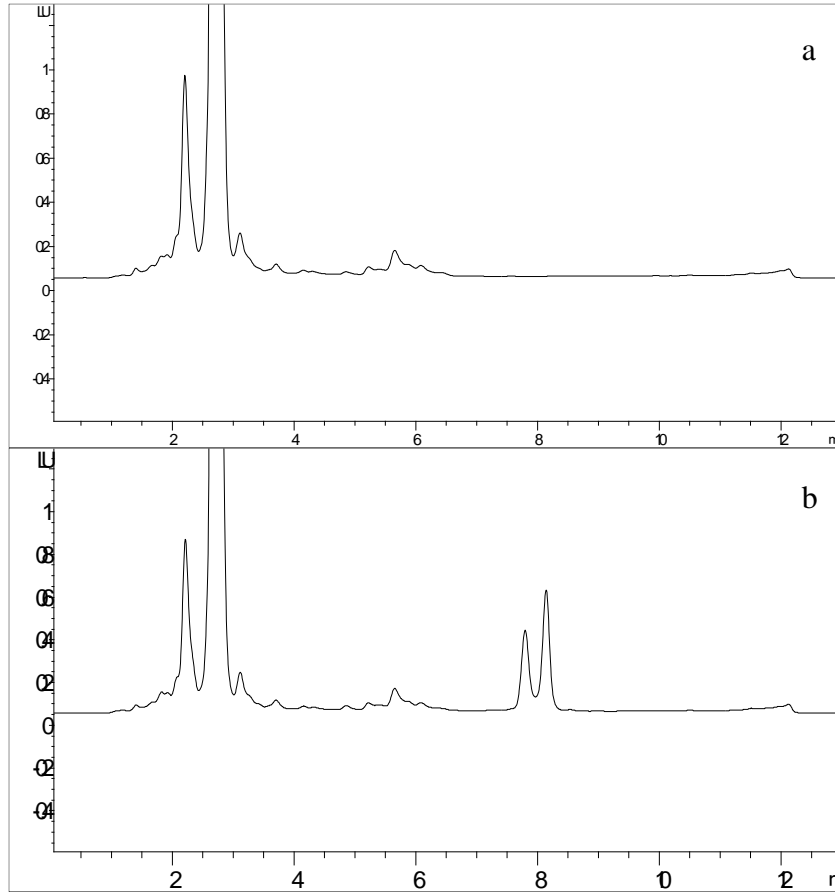
Tablo 5.1’de gözlenen kütle/yük oranları ve önerilen moleküllerin moleküler ağırlıkları verilmiştir. Gözlenen kütle/yük değerleri grelin’in farklı yerlerinden türevleniyor olduğunu kanıtlamıştır. Kromatogramlarda grelin’in 1, 2, 3 ve 4 floreskamin molekülü ile reaksiyona girerek oluşan türevleri görülmektedir. Bu türevler floreskamin’in grelin yapısında yer alan 4 adet lizin amino asiti ile reaksiyonu sonucunda oluşmuştur (Şekil 2.3).

Tablo 5.1. *Grel’in türev bileşenlerine ait kütle/yük değerleri.*

Molekül	Molekül ağırlığı (Da)	Alıkonma zamanı (dakika)	<i>m/z</i>
Grel’in	3371,90	3,3	843,7252 675,1822 562,6512
		4,3	843,7264 675,1842 562,6528
Grel’in + 1 floreskamin	3650,16	11,3	913,2432 730, 7936 609,1615
Grel’in + 2 floreskamin	3928,43	13,5	982,7509 786,4052 655,5044
		14,5	982,7509 786,4052 655,5044
		19,8	982,7509 786,4052 655,5044
Grel’in + 3 floreskamin	4206,69	21,2	1052,2731 842,0153 701,8472
Grel’in + 4 floreskamin	4484,95	27,5	1121,7788 897,6291 751,6805

Bu bulgular eşliğinde türev koşullarının optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. İlk olarak ortam pH'sı değiştirilerek lizin reaktivitesi azaltılıp, pik sayısının azaltılması ya da reaksiyon süresi artırılarak, tüm lizin gruplarının türevlendirilmesi denenmiştir. Bu işlemlerin başarılı olmaması nedeniyle, en yüksek sinyale ve en iyi pik şekline sahip olan ilk grelin piki (bir floreskamin bağlı olan grelin molekülüne ait pik) ile çalışmalara devam edilmiştir.

Grelin ile yapılan çalışmalarda türev ajanı olarak floreskamin'in seçilmesinin ardından motilin de aynı protokolle türevlendirilerek analiz edilmiştir. Yapılan ilk denemelerde motilin'e ait iki pike rastlanmıştır (Şekil 5.9). Bu iki pikin, motilin'in yapısında iki adet lizin amino asidi bulunması nedeniyle (Şekil 2.4), bir ve iki adet floreskamin molekülü bağlı motilin türevleri olduğu varsayılmıştır. Şekil 5.9'daki kromatogramda ayrımı tam olarak sağlanamamış olsa da sonraki çalışmalarda ayrımı iyileştirilen ikinci pik ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 5.9. Floreskamin ile türevlendirilmiş (a) boş çözelti ve (b) motilin çözeltisinin kromatogramları.

5.1.2. Parçalı faktöriyel tasarım

Türev reaksiyonuna etki eden faktörleri belirlemek amacıyla bir tarama tasarımı olan parçalı faktöriyel tasarım uygulanmıştır. Faktörler tampon pH'sı, tampon derişimi, floreskamin çözeltisinin derişimi ve sıcaklığı olarak belirlenmiş ve faktör seviyeleri ön denemelere göre Tablo 5.2'deki gibi seçilmiştir. Bu faktörlerden hangilerinin yanıt üzerine anlamlı derecede etkili olduğunu incelemek için 4 faktörün 2 seviyede araştırılması için gerekli olan 8 (2^{4-1}) deneye 3 tane orta nokta eklenmiş ve 11 analizden oluşan bir deney planlanmıştır (Tablo 5.3).

Tablo 5.2. Parçalı faktöriyel tasarımda kullanılan faktörler ve seviyeleri.

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	+1
x ₁ (pH)	7	8,5	10
x ₂ (Tampon derişimi (mM))	100	350	500
x ₃ (Floreskamin derişimi (mg/mL))	0,2	0,6	1,0
x ₄ (Sıcaklık (°C))	20	35	50

Tablo 5.3. Parçalı faktöriyel tasarıma göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.

Sıra	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	y ₁ (Motilin Pikinin Alanı)	y ₂ (Grelın Pikinin Alanı)
1	-1	-1	-1	-1	0,572	0,243
2	1	-1	-1	1	1,355	0,687
3	-1	1	-1	1	0,222	0,348
4	1	1	-1	-1	0,742	0,262
5	-1	-1	1	1	1,029	0,696
6	1	-1	1	-1	1,585	0,274
7	-1	1	1	-1	1,242	0,290
8	1	1	1	1	1,156	0,660
9	0	0	0	0	1,539	0,543
10	0	0	0	0	1,530	0,542
11	0	0	0	0	1,458	0,543

Türev çözeltileri Tablo 5.3'te verilen plana uygun olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler YPSK ile rastgele sırayla analiz edilmiştir. Amacın reaksiyon verimini artırmak olması nedeniyle yanıt olarak kromatogramlardaki pik alanları kullanılmış ve Eşitlik 5.1'de verilen matematiksel modeli oluşturmak için gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 \quad (5.1)$$

Eşitlikteki x değerleri faktörleri, y değerleri yanıtı, b değerleri ise katsayıları ifade etmektedir. p-değeri 0,05'ten büyük olan katsayılar %95 güven seviyesinde anlamlıdır ve yanıt üzerine anlamlı olarak etkisi vardır. Hesaplanan modeldeki katsayılar Tablo 5.4'te verilmiştir. Motilin'in pik alanı üzerine sıcaklık hariç üç faktörün, grelin'in pik alanı üzerine ise tüm faktörlerin etkili olduğu görülmektedir. Sıcaklık motilin pikinin alanı üzerinde etkili bulunmazken, grelin pikinin alanı üzerine en etkili olan faktördür. Motilin pikinin alanı üzerine ise en çok floreskamin derişimi etki etmiştir.

Tablo 5.4. Parçalı faktöriyel tasarım için hesaplanan katsayılar.

Katsayı	Motilin Pikinin Alanı	Grelın Pikinin Alanı
b ₀	0,9879*	0,4325*
b ₁	0,2216*	0,0383*
b ₂	-0,1474*	-0,0425*
b ₃	0,2651*	0,0475*
b ₄	-0,0474	0,1653*
b ₁₂	-0,1131*	0,0328*
b ₁₃	-0,1041*	-0,0512*
b ₁₄	0,0934*	0,0375*
R ²	0,9972	0,9999
Düzeltilmiş R ²	0,9874	0,9999
Model p-değeri	0,0098	<0,0001
Eğrilik p-değeri	0,0033	<0,0001

* p-değeri 0.05'ten düşük olan katsayılar.

Modellerin p-değerinin 0,05'ten küçük bulunması ve yüksek R^2 değerleri (Tablo 5.4) modelin uygunluğunu gösterir. Ayrıca modelin eğriliği de 0,05'ten küçük p-değeri ile anlamlı bulunmuştur. Bu durum faktörlerin yanıt üzerine kuadratik etkilerinin var olabileceğini gösterir. Parçalı faktöriyel tasarım ile kurulan bu matematiksel model, faktörlerin bireysel etkilerinin ve faktör etkileşimlerinin lineer etkisinin gösterimi için uygundur ancak kuadratik etkileri gösteremez. Bu nedenle uygun bir yanıt yüzey metodu kullanılarak faktör etkilerinin daha detaylı araştırılması gerekmiştir.

5.1.3. Box-Behnken tasarımı

Parçalı faktöriyel tasarım kullanılarak türev reaksiyonuna en çok etki eden faktörler pH, floreskamin derişimi ve sıcaklık olarak belirlendikten sonra bir yanıt yüzey yöntemi yöntemi olan Box-Behnken yöntemi planlanmıştır. Faktör seviyeleri parçalı faktöriyel tasarım ile aynı bırakılmıştır (Tablo 5.5). Üç faktör için 15 analizden oluşan Box-Behnken tasarımı Tablo 5.6'da verilmiştir.

Tablo 5.5. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	+1
x_1 (pH)	7	8,5	10
x_2 (floreskamin derişimi (mg/mL))	0,2	0,6	1,0
x_3 (Sıcaklık (°C))	20	35	50

Tablo 5.6. Box-Behnken tasarımına göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.

Sıra	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁ (Motilin Pikinin Alanı)	y ₂ (Grelin Pikinin Alanı)	dy ₁	dy ₂	D
1	-1	-1	0	0,749	0,911	0,011	0,002	0,005
2	1	-1	0	1,252	1,138	0,674	0,387	0,511
3	-1	1	0	0,768	0,935	0,037	0,041	0,039
4	1	1	0	1,370	1,175	0,829	0,449	0,610
5	-1	0	-1	0,837	0,965	0,128	0,093	0,109
6	1	0	-1	1,331	1,141	0,778	0,391	0,551
7	-1	0	1	0,886	1,129	0,192	0,370	0,267
8	1	0	1	1,304	1,201	0,743	0,494	0,606
9	0	-1	-1	1,231	1,279	0,646	0,626	0,636
10	0	1	-1	1,381	1,302	0,843	0,664	0,748
11	0	-1	1	1,274	1,375	0,703	0,787	0,744
12	0	1	1	1,488	1,459	0,985	0,931	0,957
13	0	0	0	1,377	1,201	0,839	0,493	0,643
14	0	0	0	1,371	1,195	0,830	0,482	0,633
15	0	0	0	1,379	1,196	0,841	0,484	0,638

Tablo 5.6’da verilen plana uygun olarak hazırlanan türev çözümleri YPSK ile rastgele sırayla analiz edilmiştir. Yanıt olarak kromatogramlardaki grelin ve motilin pik alanları kullanılmış ve Eşitlik 5.2’de verilen matematiksel modeli oluşturmak için gerekli hesaplamalar Minitab programı ile yapılmıştır.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (5.2)$$

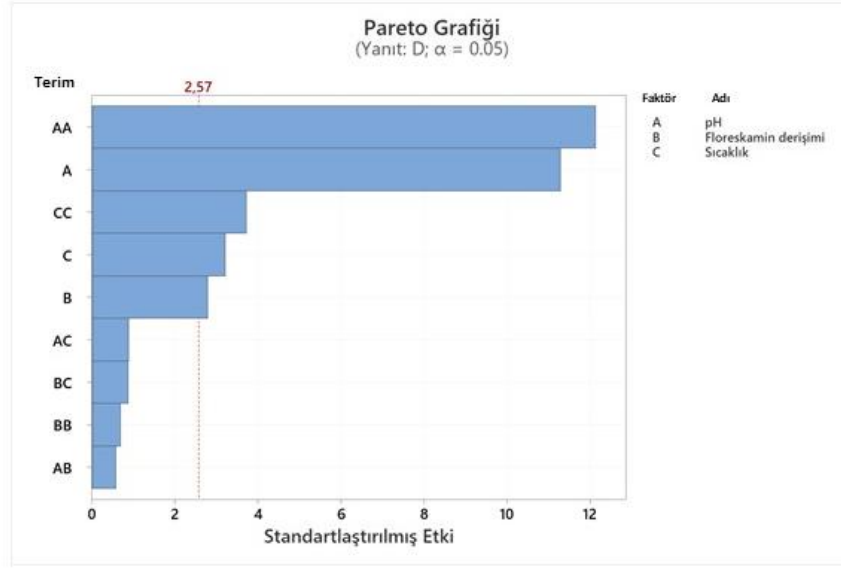
Hesaplanan modeldeki katsayılar Tablo 5.7’de verilmiştir. Modelin p-değerinin 0,05’ten küçük ve R² değerlerinin yüksek bulunması (Tablo 5.7) modelin uygunluğunu göstermektedir. Tabloda da görüldüğü gibi pH her iki yanıt üzerine de anlamlı etki göstermektedir. Floreskamin derişimi motilin’in, sıcaklık ise grelin’in alanı üzerinde etkili bulunmuştur. İki yanıtın eş zamanlı optimizasyonunu yapabilmek için Derringer isteklilik fonksiyonu kullanılmıştır. Pik alanlarının en yüksek değeri olması istendiğinden, Eşitlik 2.8 kullanılarak yanıtlar $d_i\hat{y}_i$ değerlerine çevrilmiş ve bireysel

isteklilik fonksiyonlarının geometrik ortalaması ile her bir koşul için D değeri hesaplanmıştır. Son olarak bu D değeri, tek yanıt olarak kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. D için kurulan modele ait katsayılar da Tablo 5.7’de görülmektedir. Modele ait ana, kuadratik ve etkileşim etkilerinin göreceli büyüklüğünü ve istatistiksel önemini karşılaştırmak için oluşturulmuş Pareto grafiği Şekil 5.10’da verilmiştir. Şekildeki kesikli çizgi 0,05 seviyesinde anlamlılığı ifade etmektedir ve çizginin sağına geçen terimler bu seviyede anlamlı bulunmuş olanlardır. Oluşturulan modelde her üç faktör de anlamlı bulunmuştur. pH ve sıcaklığın doğrusal etkilerinin yanı sıra kuadratik etkilerinin de olduğu ve faktörler arasında en çok pH’nın yanıt üzerine etkisi olduğu görülmektedir.

Tablo 5.7. Box-Behnken tasarımı için hesaplanan katsayılar.

Katsayı	Motilin Pikinin Alanı	Grelin Pikinin Alanı	D
b ₀	1,3760*	1,1970*	0,6380*
b ₁	0,2521*	0,0894*	0,2322*
b ₂	0,0626*	0,0210	0,0572*
b ₃	0,0215	0,0596*	0,0662*
b ₁₁	-0,2975*	-0,2012*	-0,3674*
b ₂₂	-0,0435	0,0436	0,0206
b ₃₃	0,0113	0,1128*	0,1126*
b ₁₂	0,0248	0,0033	0,0163
b ₁₃	-0,0190	-0,0260	-0,0258
b ₂₃	0,0160	0,0152	0,0252
R ²	0,9853	0,9804	0,9845
Düzeltilmiş R ²	0,9588	0,9451	0,9566
Model p-değeri	0,0005	0,0010	0,0005

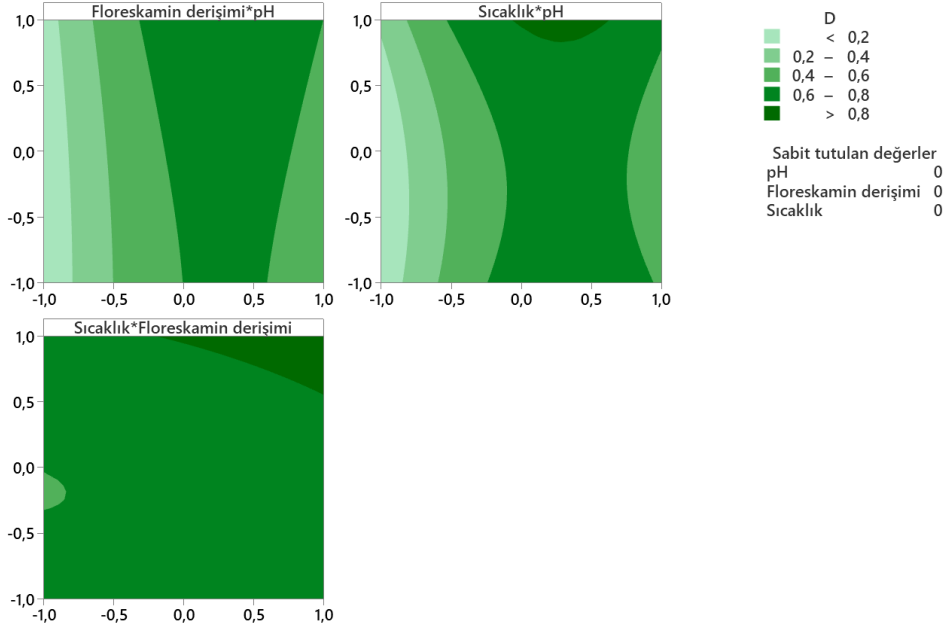
* p-değeri 0.05’ten düşük olan katsayılar.



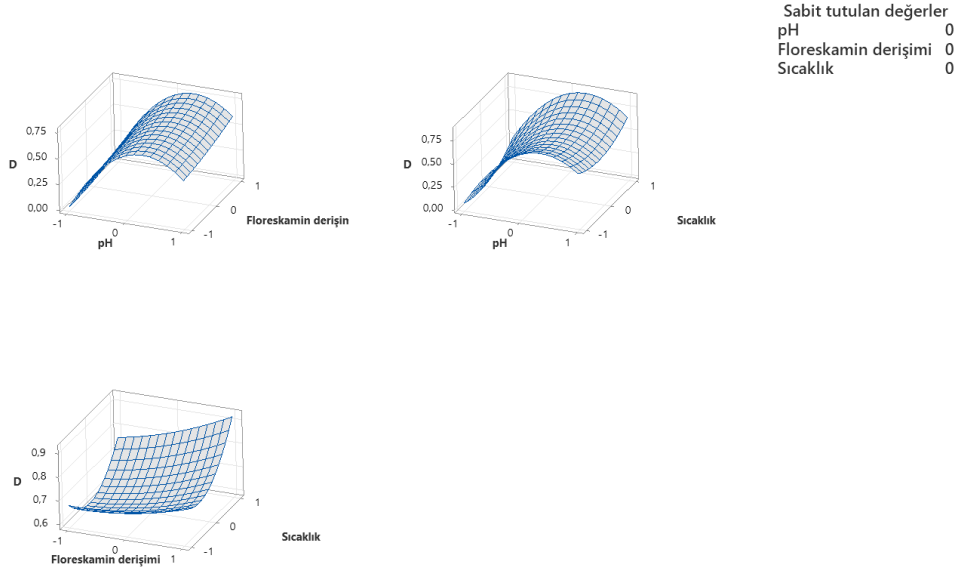
Şekil 5.10. Modele ait terimlerin anlamlılığını gösteren Pareto grafiği.

D değeri için hesaplanan modele ait kontur ve yanıt yüzey grafikleri Şekil 5.11’da verilmiştir. Bu grafikler ve Minitab programı yardımıyla hesaplanan optimum koşullar pH 9, 1 mg/mL floreskamin derişimi ve 50°C olarak belirlenmiştir. Son olarak belirlenen optimum koşulda analiz gerçekleştirilmiş ve her iki yanıt için de (grelin ve motilin’e ait piklerin alanları) beklenene yakın değerler gözlenmiştir (Tablo 5.8).

D için kontur grafikleri



D için yanıt yüzey grafikleri



Şekil 5.11. Genel isteklilik (D) için oluşturulan modele ait kontur ve yanıt yüzey grafikleri.

Tablo 5.8. Optimizasyon sonucu beklenen ve gözlenen yanıt değerleri.

Yanıt	Beklenen değer	Gözlenen değer
Motilin Pikinin Alanı	1,49	1,44
Grelin Pikinin Alanı	1,45	1,34

5.2. Grelin Tayini

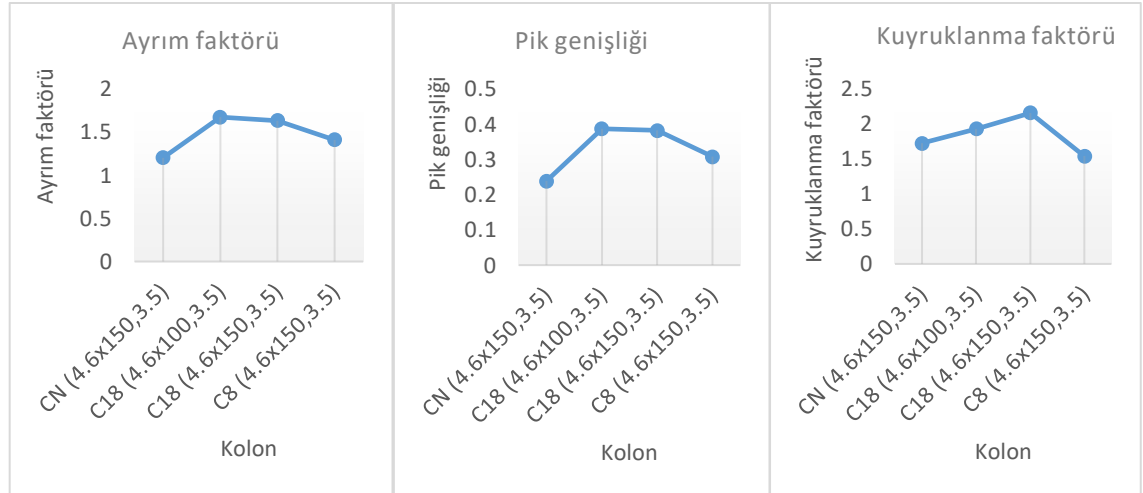
5.2.1. Kromatografik yöntemin optimizasyonu

Kromatografik yöntemin optimizasyonu için kolon çeşitleri ve uzunluğu, hareketli fazın organik çözücü ve asit içeriği, akış hızı, kolon sıcaklığı, eksitasyon ve emisyon dalga boyu parametreleri taranmış ve çeşitli analizlerdeki ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü değerleri belirlenmiştir. Kromatogramlarda plazma ve türev ajanı kaynaklı çok sayıda pik gözlenmesi bu sürecin tamamının deneysel tasarım yöntemleri ile yürütülmesini güçleştirmiştir. Bu nedenle kromatografik parametreler geleneksel tek değişkenli yöntemle optimize edilmiştir.

Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 390 ve 495 nm olarak belirlenmiştir.

Kolon seçimi için aşağıda özellikleri verilen kolonlar ile yapılan analizler sonucu elde edilen ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 5.12).

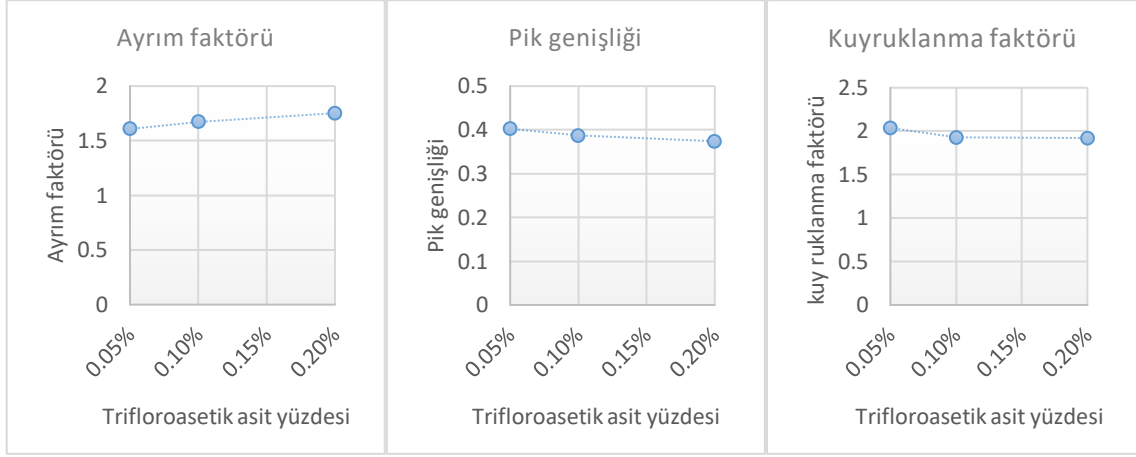
- C₁₈ kolon (4,6 × 100 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- C₁₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- C₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- CN kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)



Şekil 5.12. Kolon cinsinin grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

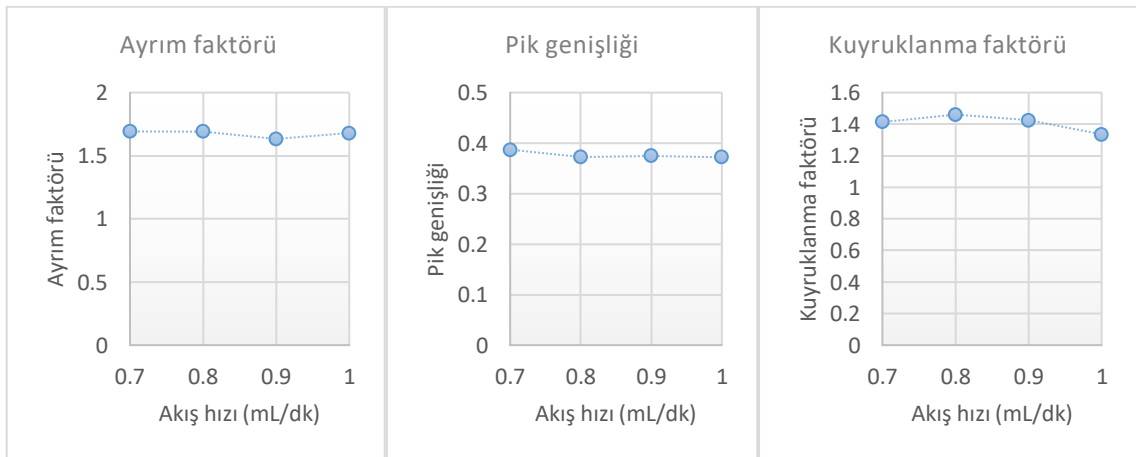
Pik genişliği ve kuyruklanma faktörünün düşük olması ve ayırımın da iyi olması nedeniyle C₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu) seçilmiştir. Su, asetonitril ve metanolün farklı oranlardaki karışımları denenmiş ve su ile asetonitril içeren hareketli faz daha kısa elüsyon zamanları ve daha iyi pik simetrisi nedeniyle tercih edilmiştir.

Hareketli fazın pH'sını ayarlamak için peptitlerle çalışılırken, pik şekillerini düzeltmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilen, trifloroasetik asit kullanılmıştır. %0,05; 0,1 ve 0,2 oranlarında trifloroasetik asit içeren hareketli fazlar karşılaştırılmış ve %0,2 trifloroasetik asit içeren hareketli fazla ayırım artarken, pik morfolojisi düzelmiştir (Şekil 5.13).



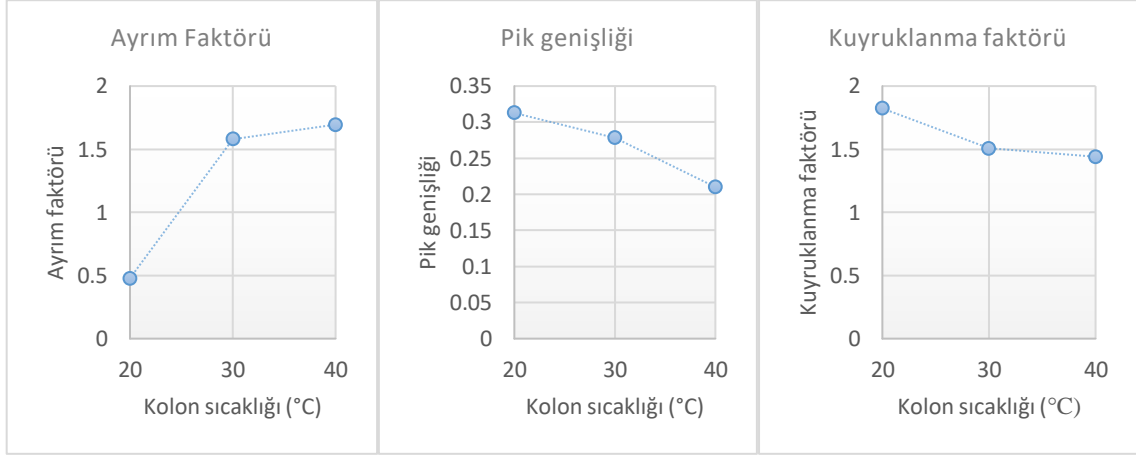
Şekil 5.13. Hareketli faza eklenen trifloroasetik asit miktarının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

Akış hızı, 0,7-1,0 mL/dk aralığında taranmıştır. Şekil 5.14'te de görüldüğü gibi düşük pik genişliği ve kuyruklanma faktörü gözlenmesi nedeniyle, akış hızı 1,0 mL/dk olarak belirlenmiştir.



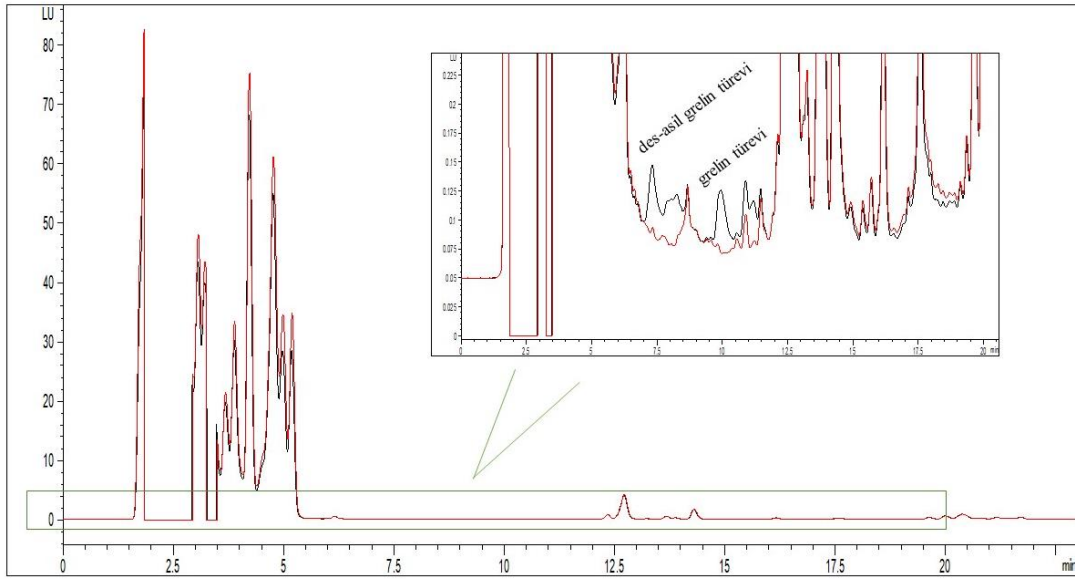
Şekil 5.14. Akış hızının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

Kolon sıcaklığı 20 ile 50°C aralığında taranmıştır (Şekil 5.15). Sıcaklığın artması ayırım faktörünü artırıp, pik genişliği ve kuyruklanma faktörünü azaltsa da grelin pikinin şeklinde bozulmalara sebep olmuştur. 50°C’de düzgün bir pik gözlenememiş, 40°C’de ise morfolojisi düzgün olmayan bir grelin piki gözlenmiştir. Bu nedenle kabul edilebilir en yüksek sıcaklık olan 30°C, kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.15. Kolon sıcaklığının grelin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

En iyi ayrımı sağlamak ve plazmadaki kirliliklerden kurtulmak için gradient program uygulanmış, hareketli fazın organik çözelti yüzdesi 15 dakikada %40'tan %70'e çıkarılmıştır. Organik çözelti içeriği 1 dakika içerisinde %90'a çıkarılarak ve bu faz yüzdesinde 4 dakika kalınarak kolonun kirliliklerden arınması sağlanmış, ardından 30 saniyede tekrar %40'a düşürülerek bir sonraki analizden önce 2,5 dakika boyunca kolon şartlanmıştır. Optimum koşullardaki analize ait kromatogram Şekil 5.16'da ve sistem uygunluk parametreleri Tablo 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.16. Belirlenen optimum kromatografik koşullarda yapılmış boş plazma (kırmızı) ve des-asil grelin ve grelin içeren plazma (siyah) analizlerine ait kromatogramlar.

Tablo 5.9. Grelin ve des-asil grelin için hesaplanan sistem uygunluk parametreleri.

Parametre (n = 6)	Gözlenen değer		Önerilen değer (Shabir, 2003)
	Grelin	Des-asil grelin	
Alıkonma zamanı (dakika)	9,82	7,27	-
Kapasite faktörü (k')	5,60	3,86	2-10
Kuyruklanma faktörü (T)	1,186	1,169	≤2
Rezölüsyon (Rs)	2,214	1,714	>1,5
Teorik tabaka sayısı (N)	4851	3742	>2000
Alıkonma zamanının %BSS'si	0,09	0,07	<1

5.2.2. Yöntem validasyonu

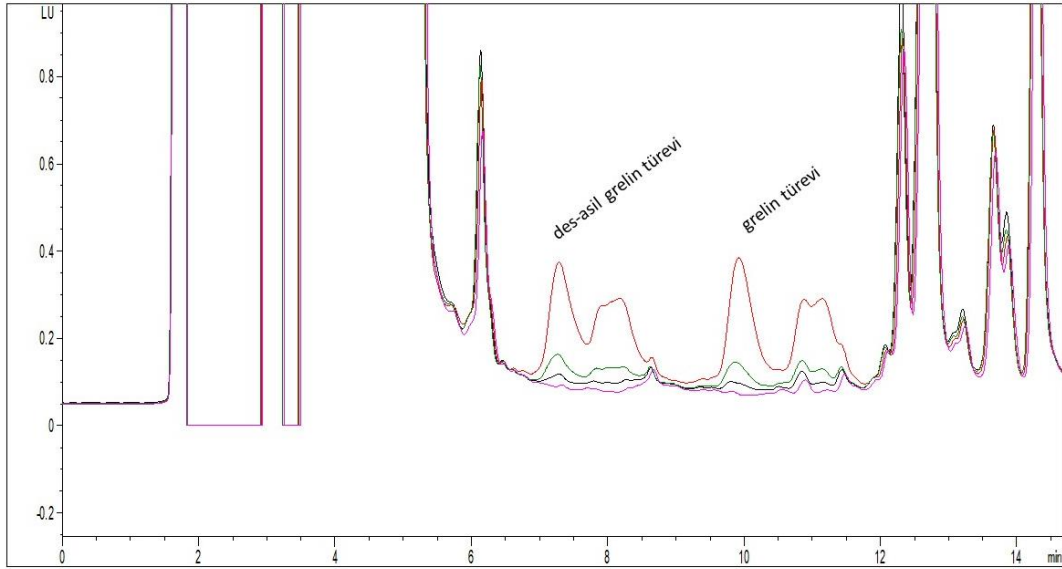
5.2.2.1. Kesinlik ve doğruluk

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinliğini göstermek amacıyla 40, 125 ve 500 ng/mL derişimlerinde grelin ve des-asil grelin eklenmiş plazma çözeltilerini türevlendirerek hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözeltiler aynı gün içerisinde 6'şar tekrarlar (gün içi) ve üç set halinde (günler arası) analiz edilmiştir. Hesaplanan veriler Tablo 5.10'da verilmiştir. %95-102 arasındaki geri kazanım değerleri yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğunu, %4'ten küçük BSS değerleri ise yöntemin kesinliğini

göstermektedir. Şekil 5.17’de boş plazma, artan derişimde grelin ve des-asil grelin içeren plazma numunelerinin analizine ait kromatogramlar verilmiştir.

Tablo 5.10. Grelin ve des-asil grelin için kesinlik ve doğruluk verileri.

	Eklenen derişim (ng/mL)	Gün içi (n = 6)			Günler arası (n = 18)		
		Hesaplanan derişim (ng/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)	Hesaplanan derişim (ng/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
Grelin	40	40,44	101,11	0,93	40,57	101,43	1,24
	125	122,06	97,65	1,31	118,85	95,081	3,06
	500	492,31	98,46	0,89	501,93	100,39	2,91
Des-asil Grelin	40	40,69	101,72	1,44	39,49	98,71	2,96
	125	124,91	99,92	0,72	122,83	98,27	1,77
	500	494,43	98,69	0,75	505,20	101,04	2,45



Şekil 5.17. Boş plazma ve artan derişimde des-asil grelin ve grelin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları (aşağıdan yukarıya doğru boş plazma, 40, 125 ve 500 ng/mL des-asil grelin ve grelin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları verilmiştir).

5.2.2.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla 20-800 ng/mL derişim aralığında 6 nokta içeren 3 kalibrasyon seti hazırlanmış ve farklı günlerde analizleri

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ile yapılan regresyon analizi sonucu hesaplanan değerler Tablo 5.11’de gösterilmiştir.

Tablo 5.11. *Grelin ve des-asil grelin için doğrusallık verileri.*

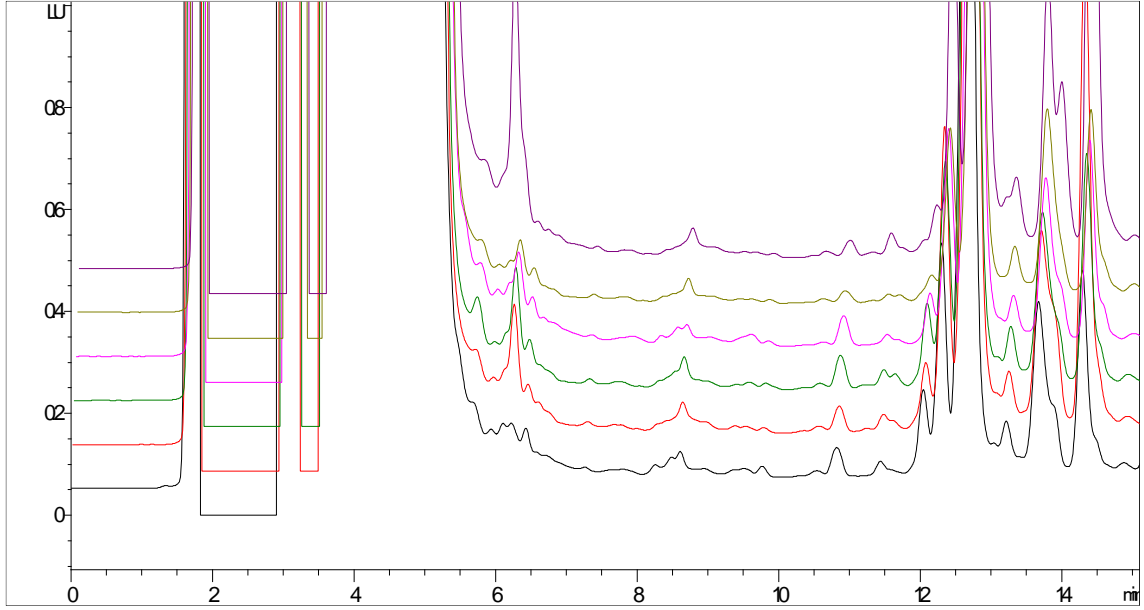
	Grelin		Des-asil grelin	
	Gün içi (n = 6)	Günler arası (n = 18)	Gün içi (n = 6)	Günler arası (n = 18)
Eğim, ortalama ± standart sapma	0,0100 ± 0,0001	0,0109 ± 0,0002	0,0088 ± 0,0001	0,0085±0,0001
Kesim, ortalama ± standart sapma	-0,1409 ± 0,0331	-0,2549 ± 0,0566	-0,0693 ± 0,0388	-0,0673 ± 0,0266
Tayin katsayısı (R²)	0,9992	0,9936	0,9986	0,9977
Eğimin %95 güven aralığı	0,0098 - 0,0102	0,0106 -0,0112	0,0086-0,0091	0,0084-0,0087

5.2.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı

LOD ve LOQ değerleri grelin için sırasıyla 3,40 ve 11,32 ng/mL ve des-asil grelin için sırasıyla 2,94 ve 9,81 ng/mL olarak belirlenmiştir.

5.2.2.4. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü, 6 farklı gönüllüden toplanan plazma numunelerinin analizi ile değerlendirilmiştir. Analitlerin alıkonma zamanlarında (7,3 ve 9,8. dakika) bozucu piklerin görülmemesi yöntemin seçiciliğini göstermektedir. Boş plazma numunelerine ait kromatogramlar Şekil 5.18’de verilmiştir. Ayrıca 125 ng/mL analit içeren plazma çözeltilerinin kromatogramlarından alınan pik saflığı değerleri (grelin için 999,664, des-asil grelin için 999,806) ile yöntemin özgünlüğü desteklenmiştir.



Şekil 5.18. Boş plazma numunelerine ait kromatogramlar.

5.2.2.5. *Stabilite*

Stabilite çalışmaları amacıyla kısa dönem bekletme, uzun dönem bekletme ve dondurma-eritme döngüsüne maruz bırakılan üç farklı derişimdeki çözeltinin stabiliteleri incelenmiştir. Bu çözeltiler boş plazmaya ilave edilip türevlendirildikten sonra yapılan analizler sonucu hesaplanan veriler Tablo 5.12’de görölmektedir. Geri kazanım değerlerine bakıldığında, çözeltilerin 1 hafta boyunca -20°C ’de stabil oldukları görölmüştür. Dondurma eritme döngüsü sonrası orta ve yüksek derişimde çözeltiler stabil bulunmuştur, ancak düşük derişimli çözeltilerde analit miktarlarının azaldığı gözlenmiştir. Oda sıcaklığında ise çözeltilerin hepsinde analit miktarları azalmıştır. Stabilite çalışmasının sonuçları göz önünde bulundurularak, bütün çalışmalar viallere ayrılmış stok çözeltilerinden taze seyreltmeler ile yürütölmüştür.

Tablo 5.12. *Grelin ve des-asil grelin için stabilite verileri (n = 3).*

Analit	Koşul	Eklenen derişim (ng/mL)	Hesaplanan derişim (ng/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
Grelin	Kısa dönem (24 saat, oda sıcaklığı)	40	34,70	86,75	0,19
		125	89,83	71,86	1,42
		500	382,07	76,41	0,79
	Uzun dönem (1 hafta, -20 °C)	40	42,37	105,93	3,07
		125	129,98	103,98	0,36
		500	526,50	105,30	0,12
	Dondurma-eritme döngüsü (3 döngü)	40	35,18	87,96	1,10
		125	119,33	95,46	0,79
		500	489,00	97,80	0,33
Des-asil grelin	Kısa dönem (24 saat, oda sıcaklığı)	40	29,83	74,57	2,03
		125	92,42	73,93	1,13
		500	430,98	86,20	0,63
	Uzun dönem (1 hafta, -20 °C)	40	36,40	91,01	1,27
		125	120,14	96,11	0,04
		500	513,93	102,79	0,29
	Dondurma-eritme döngüsü (3 döngü)	40	29,80	74,50	2,21
		125	121,63	97,30	0,62
		500	503,60	100,72	0,97

5.2.2.6. Geri kazanım

Geliştirilen yöntem ile tayin edilecek numunelerin hazırlanması için ilk olarak asetonitril ile protein çöktürme yöntemi uygulanmıştır. 90 µL insan plazmasına 10 µL grelin ve des-asil içeren standart çözelti eklenip karıştırıldıktan sonra, 300 µL asetonitril eklenmiştir (1:3 oranında asetonitril). Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiş, süpernatantı ayrılmıştır. Ayrılan süpernatant çözeltisinin 100 µL’si türevlendirildikten sonra vialerle aktarılıp, analiz edilmiştir. Bu yöntemle hazırlanan düşük ve orta derişimde analit içeren numunelerde analitlere ait piklere rastlanmamış,

yüksek derişimli numunelerde ise çok küçük pikler görülmüştür. Bu durumun ardından yüksek derişimli çözeltinin 2 katı derişimde analit eklenmiş numune ile denemeler yapılmış, %5'i geçmeyen geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Sadece 500 ng/mL ve 1000 ng/mL analit içeren çözeltelerde pik görüldüğü için çalışmalara bu ikisi ile devam edilmiştir.

Analitlerin fazla asetonitril ile çökmüş olma ihtimaline karşı 1:2 oranda asetonitril eklenerek protein çöktürme yapılmıştır. Geri kazanım değerlerinin %8 civarında bulunması, bu uygulamanın da bir fark yaratmadığını göstermiştir.

Peptitlere ait piklerin gözlenememesinin olası bir nedeni yüzey adsorpsiyonudur. Çalışmalar sırasında bu olumsuzluktan kurtulmak adına düşük peptit adsorpsiyonu gösteren vial ve pipet uçları kullanılmıştır. İlk analizlerde grelin'in membran filtrelelere tutunduğu gözlemlendiği için numunelere süzme işlemi uygulanmamıştır. Ayrıca kullanılan sarf malzemesinin sonradan analit eklenen çözelti ile aynı olması nedeniyle sarf malzemelerinin yüzeyine tutunma olasılığı düşüktür. Yine de bu olasılığı tamamen elemek adına numunelere bovin serum albümin eklenerek denemeler yapılmıştır. Peptit çözeltilerine bovin serum albümin eklenmesi, peptitlerin yüzey adsorpsiyonunu azaltmak amacıyla kullanılan yöntemlerden birisidir (Goebel-Stengel vd., 2011). Plazma numunelerine bovin serum albümin eklenip iyice karıştırılmış ardından standart analit çözeltileri eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan numunelere yine asetonitril ile protein çöktürme işlemi uygulanmış ve süpernatantlar türevlendirilerek analiz edilmiştir. 500 ng/mL ve 1000 ng/mL analit içeren çözeltelerde %2-6 geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Grel'in yapısındaki oktanil grubunu serin grubuna bağlayan ester bağının kimyasal ve enzimatik olarak stabil olmadığı, saklama ve numune hazırlama yöntemleri sırasında grelin'in bozunarak des-asil grelin'e dönüştüğü bilinmektedir (Hosoda vd., 2004). Ancak çalışmamız sırasında her iki analite ait pikin de görülmemesi grelin'in des-asil grelin'e bozunmasından ziyade peptidin iki formunun da benzer bir şekilde bozunduğu ve/veya plazmadaki makromoleküller tarafından tutunduğu ihtimalini düşündürmüştür.

Aprotinin plazma stabilizasyonu için kullanılan bir proteaz inhibitörüdür ve çeşitli grelin tayini yöntemlerinde numunelerin stabilizasyonu amacıyla tercih edilmiştir (Aydın, Karatas ve Geckil, 2008; Hosoda vd., 2004; Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014). Bu çalışmalardan yola çıkarak 80 µL insan plazmasına, 10 µL aprotinin çözeltisi

eklenip karıştırılmış, ardından 10 µL analit çözeltisi eklenmiştir. İyice karıştırılan çözeltiye 300 µL asetonitil eklenerek proteinleri çöktürülmüş ve analiz edilmiştir. Hesaplanan geri kazanım değerlerinde bir artış olmamıştır.

Olası bir protein-peptit bağı kırılmak için numunelere amonyum hidroksit çözeltisi eklenmesi denenmiştir. Analit içeren plazma numunelerine amonyum hidroksit çözeltisi eklenip iyice karıştırıldıktan sonra, proteinler asetonitril ile çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatantlar türevlendirilmiş ve analizler yapılmıştır. Bu analizlerde grelin'e ait pikler hiç gözlenmezken, des-asil grelin'in geri kazanımı %3 civarında kalmıştır.

Diğer bir numune hazırlama yöntemi olarak katı faz ekstraksiyonu ile denemeler yapılmıştır. Katı faz ekstraksiyon kartuşu olarak anyon değişimi, katyon değişimi ve ters faz özellikli üç farklı kartuş denenmiştir. Her bir kartuş ile denemelere üreticinin önerdiği koşullarla başlanmış, ardından farklı koşullar denenmiştir. Ters faz özellikli kartuşla hazırlanan numunelerin analizinde grelin ile aynı zamanda gelen büyük bir pik grelin pikinin gözlenmesini engellemiştir. Katyon değişimi özellikli kartuş ile hazırlanan numunelerin analizinde analitlere ait piklere rastlanamamıştır. En iyi sonuçlar anyon değiştirici özellikli kartuş ile elde edilmiş, standart çözeltilerle yapılan denemelerde %35 civarında verim elde edilmiştir. Ancak bu yöntemle hazırlanan plazmalar ile yapılan analizlerde analitlerin tutunma zamanlarını da kapsayan geniş bir alanda gelen büyük pikler arasından analit pikleri gözlenememiştir. Analitlere ait piklerin gözlenememesi durumunun girişim yapan başka moleküllerden kanaklanıyor olabileceği gibi, protein çöktürme sırasında karşılaşılan grelin ve des-asil grelin'in plazmadaki stabilite sorunuyla alakalı da olabileceği düşünülmektedir.

5.2.3. Yöntemin uygulanması

Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla sağlıklı gönüllülerden toplanan plazma numunelerinde grelin ve des-asil grelin miktarlarının tayin edilmesi ve aynı numunelerin ELISA kiti ile yapılan analiz sonuçları ile karşılaştırılması planlanmıştır.

Toplanan numunelerin ELISA kiti ile analizi sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 5.13'te verilmiştir. Grelın ve des-asil grelin geri kazanımının çok düşük olması nedeniyle plazmada çok düşük derişimlerde bulunan analitlerin geliştirilen yöntemle tayini mümkün olmamış, bu nedenle numuneler analiz edilememiştir.

Tablo 5.13. Numunelerde ELISA kiti ile ölçülen grelin ve des-asil grelin miktarları.

Numune no	Grelın miktarı (ng/mL)	Des-asil grelin miktarı (ng/mL)
1	4,46	0,10
2	1,62	0,03
3	3,08	0,07
4	4,76	0,08
5	4,05	0,08

5.3. Motilin Tayini

5.3.1. Kromatografik yöntemin optimizasyonu

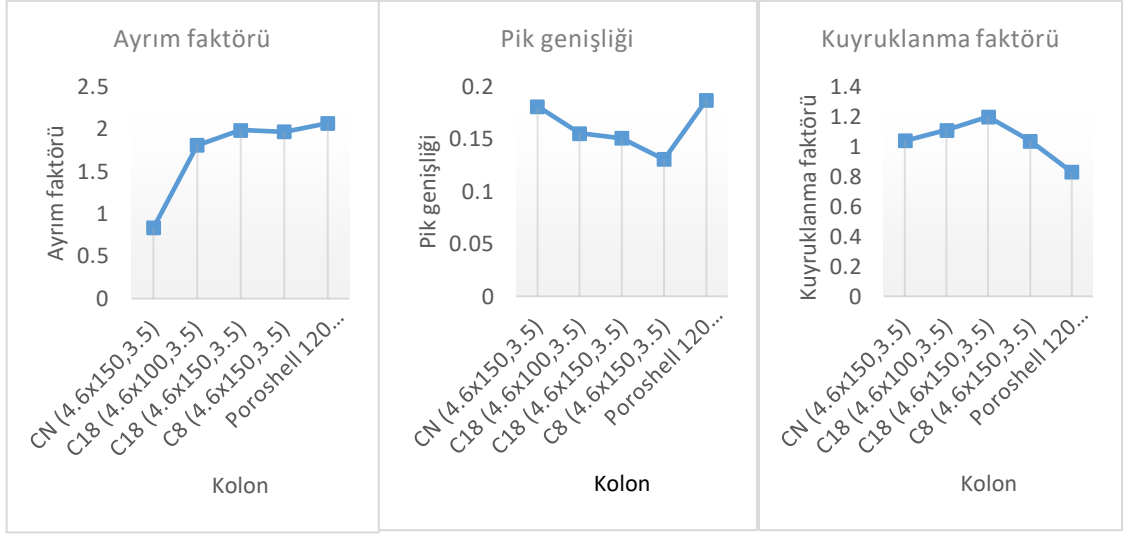
Kromatografik yöntemin optimizasyonu için kolon çeşitleri ve uzunluğu, hareketli fazın organik çözücü ve asit içeriği, akış hızı, kolon sıcaklığı, eksitasyon ve emisyon dalga boyu parametreleri taranmıştır. Grelın için geliştirilen yöntemde olduğu gibi kromatogramlardaki girişimler nedeniyle parametrelerin bir kısmı ön denemelerde geleneksel tek değişkenli yöntemle optimize edilmiş, ardından bir yanıt yüzey yöntemi uygulanmıştır.

Eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 390 ve 495 nm olarak belirlenmiştir.

Analizlerin yapılacağı kolonu belirlemek için aşağıda özellikleri verilen beş kolon ile denemeler yapılmış pik genişliği, teorik tabaka sayısı ve ayırım faktörü değerlendirilmiştir.

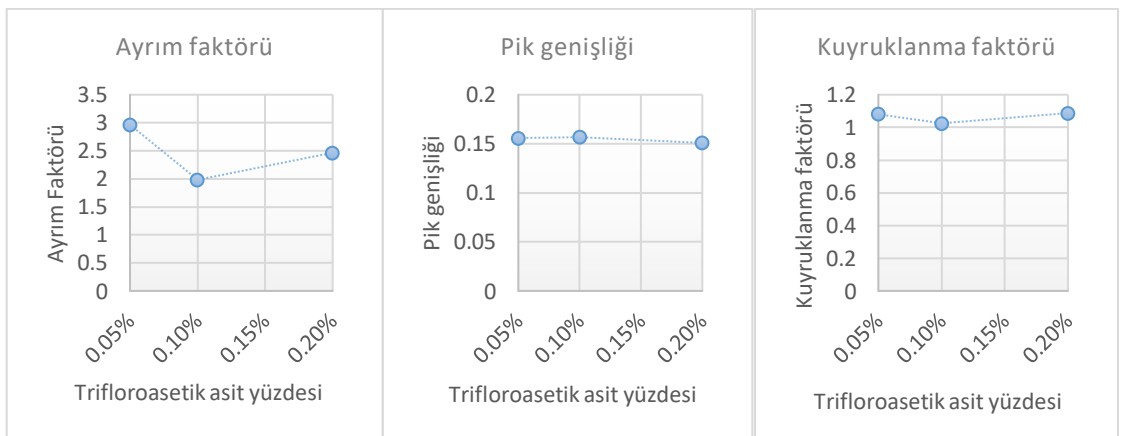
- Poroshell 120 kolon (4,6 × 100 mm, 2,7 µm partikül boyutu)
- C₁₈ kolon (4,6 × 100 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- C₁₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- C₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)
- CN kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu)

Motilin'e ait pikin simetrisinin en iyi olduğu, pik genişliğinin en düşük, teorik tabaka sayısının ise en yüksek olduğu C₈ kolonda (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu) ayırım faktörünün de iyi olması nedeniyle, bu kolon ile çalışılmaya devam edilmiştir. Şekil 5.19'da farklı kolonlarda gözlenen ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörünü karşılaştıran grafikler görülmektedir.



Şekil 5.19. Kolon cinsinin motilin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

Hareketli faz olarak, peptitlerle çalışılırken sıklıkla tercih edilen trifloroasetik asit içeren su ve asetonitril çözeltileri kullanılmıştır. Hareketli fazın asit içeriği %0,05; 0,1 ve 0,2 değerlerinde taranmıştır. Kuyruklanma faktörünün en düşük ve pik şeklinin en düzgün olduğu %0,1 trifloroasetik asit değeri optimum değer olarak seçilmiştir (Şekil 5.20). Yeterli ayırımı sağlayabilmek için %0,1 trifloroasetik asit içeren su ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile asetonitril yüzdesinin %30'da %65'e doğrusal olarak arttığı gradient bir program kullanılmıştır. Her analizden ardından organik çözelti içeriği 1 dakika içerisinde %90'a çıkarılarak bu oranda 4 dakika kolonun kirliliklerden arınması sağlanmış, ardından 30 saniyede tekrar %30'a düşürülerek bir sonraki analizden önce 2,5 dakika boyunca kolon şartlanmıştır.



Şekil 5.20. Hareketli faza eklenen trifloroasetik asit miktarının motilin'in ayırım faktörü, pik genişliği ve kuyruklanma faktörü üzerine etkisi.

Gradient süresi, akış hızı ve kolon sıcaklığı parametrelerini optimize etmek için bir yanıt yüzey yöntemi olan Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Faktörler ve seviyeleri Tablo 5.14’te verilmiştir. Üç faktör için 15 analizden oluşan Box-Behnken tasarımı Tablo 5.15’te verilmiştir.

Tablo 5.14. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	+1
x ₁ (Gradient süresi)	5	15	25
x ₃ (Akış hızı (mL/dk))	0,8	0,9	1,0
x ₃ (Sıcaklık (°C))	20	30	40

Tablo 5.15. Box-Behnken tasarımına göre deney planı ve gözlenen yanıt değerleri.

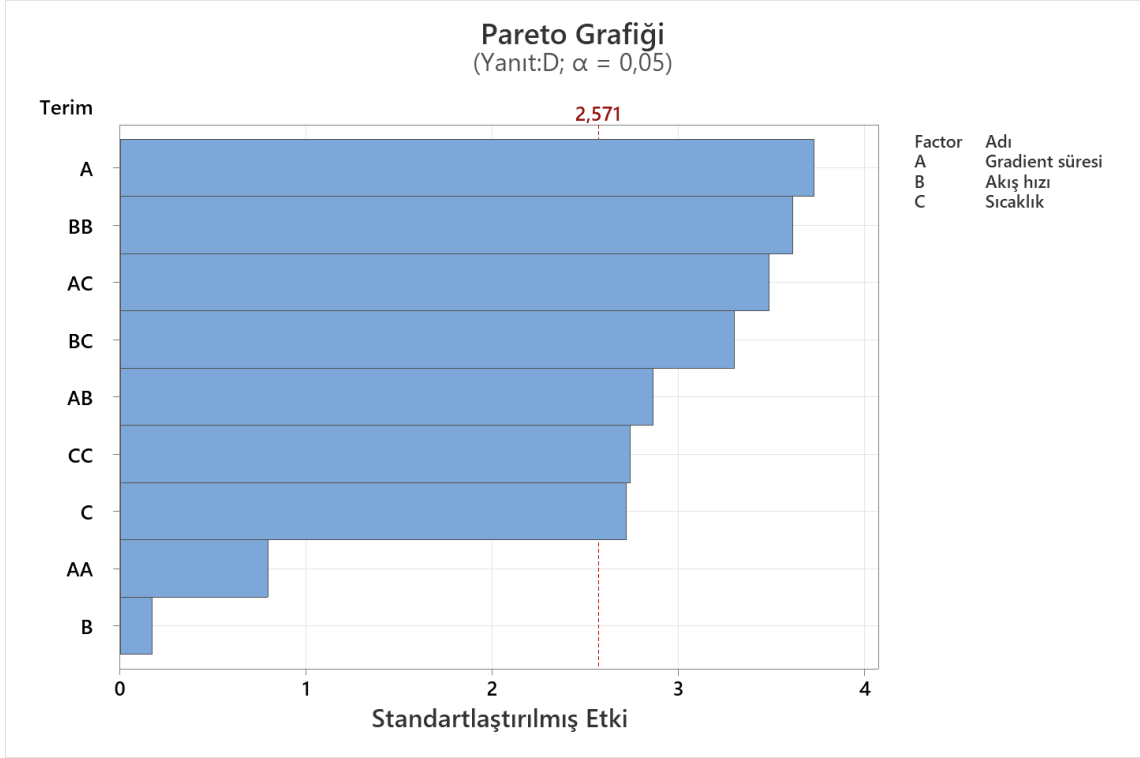
Sıra	x ₁	x ₂	x ₃	Alıkonma zamanı	Pik genişliği	Pik simetrisi	D
1	-1	-1	0	6,464	0,08	0,79	0,304
2	1	-1	0	18,494	0,21	0,92	0,260
3	-1	1	0	5,900	0,08	0,97	0,159
4	1	1	0	17,540	0,20	1,00	0,443
5	-1	0	-1	6,167	0,09	0,70	0,097
6	1	0	-1	18,180	0,16	0,98	0,478
7	-1	0	1	6,048	0,08	0,88	0,252
8	1	0	1	17,615	0,22	1,17	0,234
9	0	-1	-1	12,978	0,14	0,73	0,407
10	0	1	-1	12,205	0,16	0,83	0,563
11	0	-1	1	12,627	0,20	1,06	0,420
12	0	1	1	11,801	0,23	0,91	0,198
13	0	0	0	12,481	0,21	1,21	0,155
14	0	0	0	12,472	0,21	1,18	0,219
15	0	0	0	12,471	0,22	1,16	0,248

Deneyle Tablo 5.15'te verilen plana uygun olarak, rastgele sıra ile ve 2 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kromatogramlardan alınan alıkonma zamanı, pik genişliği ve pik simetrisi değerleri yanıt olarak kullanılmıştır (Tablo 5.15). Eşitlik 5.2'deki matematiksel modeli oluşturmak için yapılan hesaplamalar sonucu bulunan katsayılar Tablo 5.16'da verilmiştir. Tabloda verilen modelin 0,05'ten küçük p-değeri ve yüksek R^2 değerleri modelin uygunluğunu göstermektedir. Kurulan bu modellerden gradient süresi ve sıcaklığın her üç faktör üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğu görülmektedir. Akış hızı ise sadece alıkonma süresi üzerinde etkili bulunmuştur. Her üç yanıtın da istenilen aralıkta olması için Derringer isteklilik fonksiyonu kullanılmıştır. Alıkonma zamanı ve simetri için Eşitlik 2.10, genişlik için Eşitlik 2.9 kullanılarak tüm yanıtlar $d_i\hat{y}_i$ değerlerine çevrilmiştir. Ardından her deney için D değerleri hesaplanmıştır (Tablo 5.15). D değerleri yanıt olarak kullanılarak hesaplanmış olan modele ait katsayılar da Tablo 5.16'da verilmiştir. Oluşturulan modeldeki terimlerin görece büyüklüğünü ve etkilerinin anlamlılığını karşılaştırmak amacıyla oluşturulan Pareto grafiği de Şekil 5.21'de görülmektedir. Oluşturulan modele göre gradient süresinin ve sıcaklığın yanıt üzerine hem doğrusal hem kuadratik etkilerinin olduğu görülmüştür. Ayrıca her üç faktörün de yanıt üzerinde etkileşimli etkileri olduğu bulunmuştur.

Tablo 5.16. Box-Behnken tasarımı için hesaplanan katsayılar.

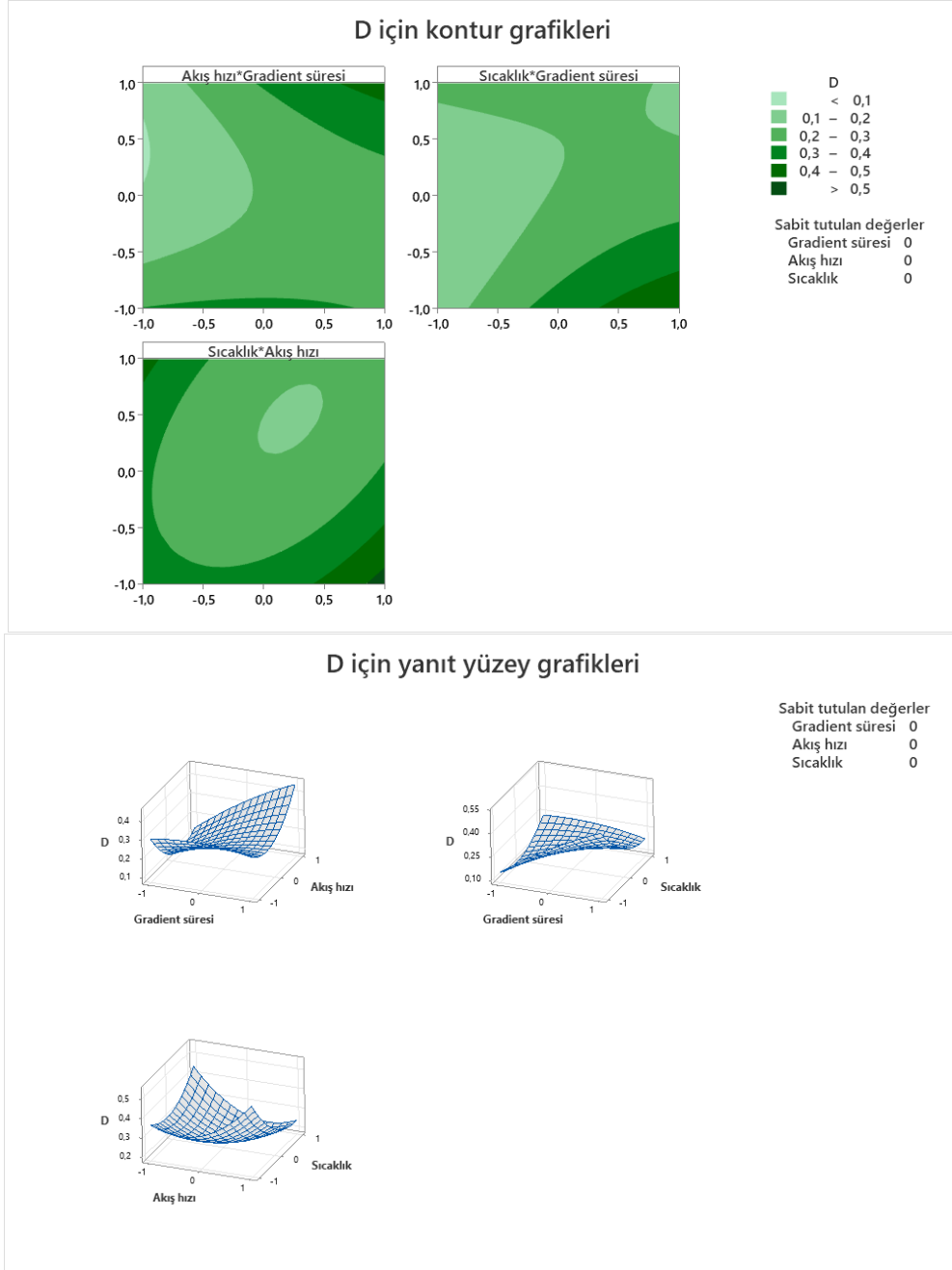
Katsayı	Alıkonma zamanı	Pik genişliği	Pik simetrisi	D
b ₀	12,475	0,212	1,185	0,2072
b ₁	5,906*	0,057*	0,092*	0,0755*
b ₂	-0,390*	0,007	0,026	-0,0034
b ₃	-0,180*	0,022*	0,098*	-0,0551*
b ₁₁	-0,388*	-0,057*	-0,108	-0,0237
b ₂₂	0,012	-0,011	-0,153*	0,1077*
b ₃₃	-0,084*	-0,017	-0,148*	0,0817*
b ₁₂	-0,098*	-0,002	-0,024	0,0820*
b ₁₃	-0,112*	0,015	0,002	-0,0998*
b ₂₃	-0,013	0,004	-0,064	-0,0945*
R ²	1,0000	0,9743	0,9114	0,9362
Düzeltilmiş R ²	1,0000	0,9281	0,7518	0,8212
Model p-değeri	< 0,0001	0,0018	0,0347	0,2193

* p-değeri 0.05'ten düşük olan katsayılar.

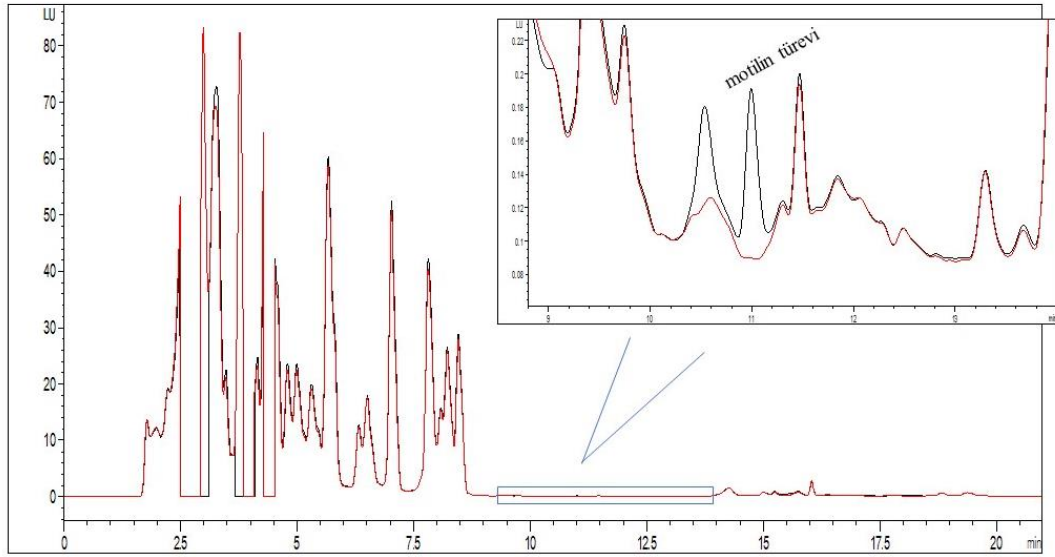


Şekil 5.21. Modele ait terimlerin anlamlılığını gösteren Pareto grafiği.

Modelin oluşturulmasının ardından optimum noktanın belirlenmesi amacıyla kontur ve yanıt yüzey grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 5.22). Bu grafikler ve Minitab programı yardımıyla olası optimum birkaç nokta belirlenmiş ve analizlerle denemeler yapılmıştır. Hem yanıtların istenilen değerlerde olması hem de girişimin en az olması nedeniyle optimum koşullar 13 dakika gradient süresi, 1 mL/dk akış hızı ve 20°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda deneme amacıyla yapılan boş plazma ve motilin içeren plazmaya ait kromatogramlar Şekil 5.23'te verilmiştir. Tablo 5.17'de belirlenen optimum koşullar için hesaplanan sistem uygun parametreleri görülmektedir.



Şekil 5.22. Genel isteklilik (D) için oluşturulan modele ait kontur ve yanıt yüzey grafikleri.



Şekil 5.23. Box-Behnken tasarımı sonucu bulunan optimum kromatografik koşullarda yapılmış boş plazma (kırmızı) ve motilin içeren plazma (siyah) analizlerine ait kromatogramlar.

Tablo 5.17. Motilin için hesaplanan sistem uygunluk parametreleri.

Parametre (n = 6)	Gözlenen değer	Önerilen değer (Shabir, 2003)
Alıkonma zamanı (dakika)	11,07	-
Kapasite faktörü (k')	6,40	2-10
Kuyruklanma faktörü (T)	1,026	≤ 2
Rezölüsyon (Rs)	1,59	$>1,5$
Teorik tabaka sayısı (N)	46026	>2000
Alıkonma zamanının % BSS 'si	0,11	<1

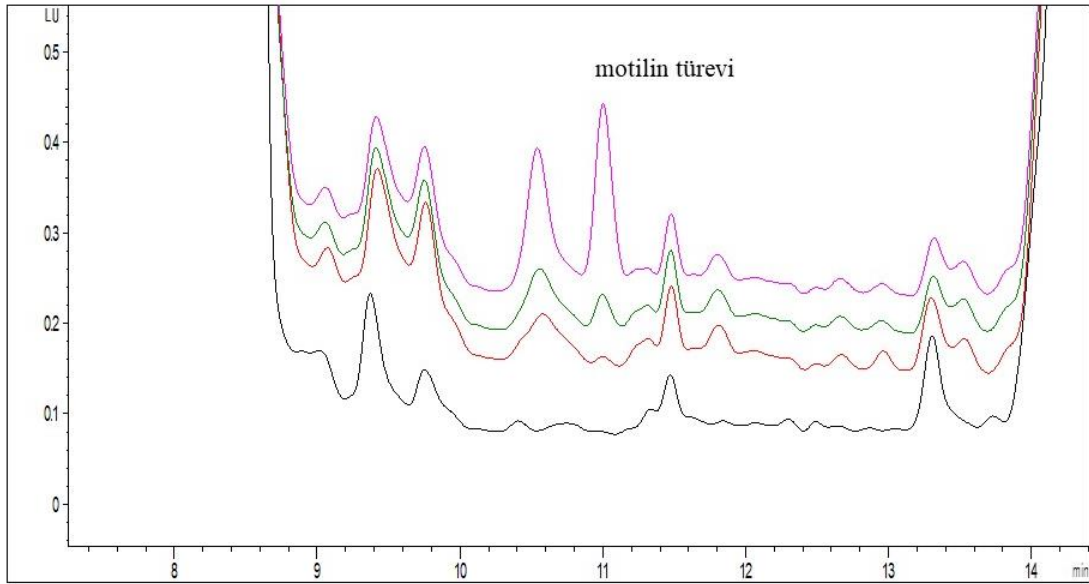
5.3.2. Yöntem validasyonu

5.3.2.1. Kesinlik ve doğruluk

7,5; 30 ve 120 ng/mL derişimlerinde motilin eklenmiş plazma çözeltilerinin analizlerinden elde edilen pik alanı değerleri kullanılarak hesaplanan % geri kazanım ve % BSS değerleri Tablo 5.18'de verilmiştir. Her üç derişim için de %91 ile %108 arasında bulunan geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunu göstermiştir. BSS değerlerinin ise gün içi analizlerde %2'den, günler arası analizlerde %5'ten küçük bulunması yöntemin kesinliğini göstermektedir. Şekil 5.24'te boş ve artan derişimde motilin içeren plazma numunelerinin analizine ait kromatogramlar görülmektedir.

Tablo 5.18. Motilin için kesinlik ve doğruluk verileri.

Eklenen derişim (ng/mL)	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)		
	Hesaplanan derişim (µg/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)	Hesaplanan derişim (µg/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
7,5	7,93	105,79	1,19	8,04	107,13	4,18
30	31,15	103,83	1,30	29,48	98,28	4,88
120	111,66	93,05	0,89	110,08	91,73	1,69



Şekil 5.24. Boş plazma ve artan derişimde motilin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları (aşağıdan yukarıya doğru boş plazma, 7,5; 30 ve 120 ng/mL motilin içeren plazma türev çözeltilerinin kromatogramları verilmiştir).

5.3.2.2. Doğrusallık

2-200 ng/mL derişim aralığındaki kalibrasyon çözeltilerinin analizinden elde edilen veriler ile yapılan regresyon analizi sonucu hesaplanan değerler Tablo 5.19'da gösterilmiştir. Tabloda görülen yüksek R^2 değerleri yöntemin doğrusallığını göstermektedir.

Tablo 5.19. Motilin için doğrusallık verileri.

	Gün içi (n = 7)	Günler arası (n = 21)
Eğim, ortalama ± standart sapma	0,0158 ± 0,0001	0,0159 ± 0,0001
Kesim, ortalama ± standart sapma	-0,0522 ± 0,0115	-0,0651 ± 0,0124
Tayin katsayısı (R ²)	0,9992	0,9968
Eğimin %95 güven aralığı	0,01548-0,01606	0,01557-0,01615

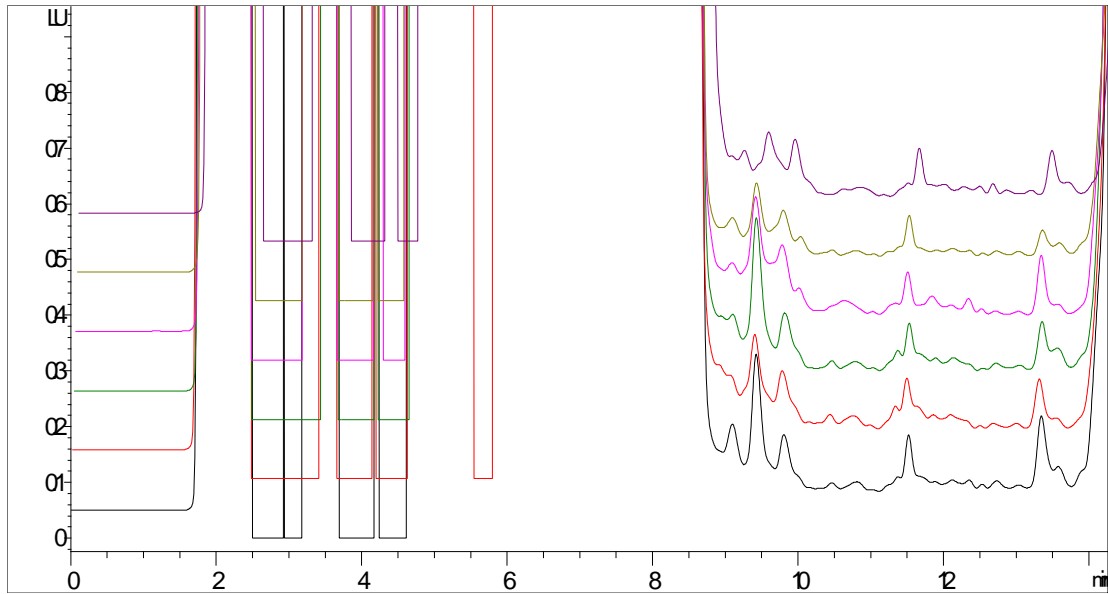
5.3.2.3. Saptama sınırı ve tayin sınırı

Geliştirilen yöntemin LOD değeri 0,55 ng/mL, LOQ değeri ise 1,84 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

5.3.2.4. Özgünlük

Altı farklı gönüllüden toplanan plazma numunelerinin analizine ait kromatogramlar Şekil 5.25'te verilmiştir. Bu kromatogramlarda motilin'in alıkonma zamanında (11.dakika) bozucu piklerin görülmemesi yöntemin özgünlüğünü göstermektedir.

100 ng/mL derişimde motilin içeren plazmanın analizinde motilin pikine ait pik saflığı değeri 999,456 olarak hesaplanmıştır. Gözlenen bu yüksek saflık değeri de yöntemin özgünlüğünü desteklemektedir.



Şekil 5.25. Boş plazma numunelerine ait kromatogramlar.

5.3.2.5. Stabilite

Kısa dönem bekletme, uzun dönem bekletme ve dondurma-eritme döngüsüne maruz bırakılmış çözeltiler ile hazırlanan çalışma çözeltilerinin analizinden hesaplanan stabilite verileri Tablo 5.20’de verilmiştir. Geri kazanım değerlerinin %93-107 aralığında bulunması, motilin çözeltilerinin her üç koşulda da kararlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.20. Motilin için stabilite verileri (n = 3).

Koşul	Eklenen derişim (ng/mL)	Hesaplanan derişim (ng/mL)	Geri kazanım (%)	BSS (%)
Kısa dönem (24 saat, oda sıcaklığı)	7,5	7,97	106,33	1,61
	30	28,36	94,52	0,79
	120	113,32	94,43	0,35
Uzun dönem (1 hafta, -20 °C)	7,5	7,76	103,45	0,54
	30	28,76	95,89	2,53
	120	112,09	93,41	0,87
Dondurma-eritme döngüsü (3 döngü)	7,5	7,76	103,45	1,27
	30	31,91	106,36	0,80
	120	112,69	93,91	0,43

5.3.2.6. Geri kazanım

Numunelerin hazırlanması için ilk olarak asetonitril ile protein çöktürme yöntemi denenmiştir. 90 µL insan plazmasına 10 µL motilin çözeltisi eklenip karıştırıldıktan sonra, 300 µL asetonitril eklenmiştir. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiş, süpernatantı ayrılmıştır. Ayrılan süpernatant çözeltisinin 100 µL’si türevlendirildikten sonra vialerle aktarılıp, analiz edilmiştir. Bu yöntemle hazırlanan düşük derişimlerde motiline ait pik tayin edilememiş, orta ve yüksek derişimlerde ise % 10-18 gibi düşük geri kazanımlar gözlenmiştir.

Düşük geri kazanımları artırmak amacıyla protein çöktürme işleminin ardından ultrafiltrasyon işlemi yapılması denenmiştir. Bu amaçla aynı şekilde ancak daha yüksek hacimde hazırlanan analit eklenmiş plazma çözeltilerinin proteinleri çöktürüldükten sonra elde edilen süpernatantların 1000 µL’si ultrafiltrasyon tüpüne alınmıştır. 4000

rpm’de 40 dakika boyunca santrifüj cihazında süzülmesi sağlanan çözeltilerin membran üstünde kalan yoğunlaştırılmış kısımlarından 100 µL alınarak türevlendirilmiştir. Her üç derişim için de gözlenen pik alanları artmış geri kazanımlar ortalama %34 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan geri kazanım değerleri Tablo 5.21’de verilmiştir.

Tablo 5.21. *Motilin’e ait geri kazanım değerleri.*

Derişim (µg/mL)	Geri kazanım (%)	
	Asetonitril ile protein çöktürme	Asetonitril ile protein çöktürme ardından ultrafiltrasyon
7,5	17,38	33,68
30	9,88	37,48
120	14,07	30,34

5.3.3. Yöntemin uygulanması

Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla beş farklı gönüllüden toplanan plazma numunelerinde motilin miktarı tayin edilmiştir. Numuneler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan alınan 11.12.2018 tarihli, 02 nolu etik izin kapsamında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi’nde toplanmıştır. 18-50 yaş aralığında ve teşhis edilmiş herhangi bir kronik hastalığı (hipertansiyon, diyabet, metabolik sendrom, obezite) olmayan sağlıklı gönüllülerin her birinden 10 mL venöz kan numunesi heparinli tüplere alınmıştır. Bu numuneler “numunelerin hazırlanması” bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra geliştirilen yöntem ile analizleri yapılmıştır. Aynı numuneler karşılaştırma amacıyla ticari olarak temin edilen ELISA kiti ile de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.22’de verilmiştir. İki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbirinden farklı düzeylerde bulunmuş ve sonuçlar arasında korelasyon gözlenmemiştir ($r = 0,2024$).

Tablo 5.22. Numunelerde ölçülen motilin miktarları.

Numune no	Motilin miktarı (ng/mL)	
	ELISA kiti ile	Geliştirilen yöntem ile
1	0,12	7,39
2	0,78	7,06
3	0,44	7,46
4	0,64	8,74
5	0,57	8,52

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Moleküler yapılarının ve reseptörlerinin benzerliği nedeniyle aynı peptit ailesinde yer alan grelin ve motilin, gastrointestinal sistemde etkili olan iki hormondur. Bu iki peptidin memelilerde tokluk süresini kısalttığı, mide hareketliliğini uyardığı ve gastrik boşaltmayı hızlandırdığı bilinmektedir (Chen ve Tsai, 2012; Sakata, 2011). Grel'in ayrıca büyüme hormonu salımını uyarma ve kilo alımını artırma özelliği de vardır (De Vriese vd., 2004).

Grel'in ve motilin'in biyolojik numunelerdeki tayini diğer birçok peptit gibi genellikle immünolojik yöntemler ile yapılmaktadır. Bu yöntemler uygulaması kolay ve duyarlı yöntemler olmasına rağmen, özellikle benzer yapıli moleküllerle çalışırken moleküllerdeki bağlanma bölgelerinin benzerliği nedeniyle özgünlük ve seçicilikleri yeterli olmayabilir (Mesmin vd., 2011). İmmünolojik yöntemler dışında bu peptitlerin tayini için geliştirilmiş olan sınırlı sayıdaki kromatografik yöntemlerin çoğunda SK-KS kullanılmıştır (Delinsky vd., 2004; Eslami vd., 2016; Rauh, Gröschl ve Rascher, 2007; Sidibé, Varesio ve Hopfgartner, 2014). SK-KS yöntemleri yüksek özgünlük ve seçicilik sağlamasına rağmen, KS cihazlarının yüksek maliyeti bu yöntemlerin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır.

İmmünolojik yöntemlerin ve SK-KS yöntemlerinin bahsedilen dezavantajlarından dolayı grelin ve motilin tayini için geliştirilecek olan YPSK yöntemlerinin hem bu peptitlerin biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalarda hem de bu peptitler ile yürütülecek biyomarker ve ilaç tasarımı çalışmalarında yararlı olacağı düşünülmüştür.

Grel'in ana metaboliti olan des-asil grelin'in dolaşımında grelin'e yakın miktarlarda olduğu ve yapılarındaki tek farkın serin amino asidine bağlı oktanil grubu olmasına rağmen, farklı biyoaktivite gösterdiği bilinmektedir. Biyolojik sistemlerdeki bu farkının yanı sıra biyolojik numunelerle çalışırken saklama ve numune hazırlama işlemleri sırasında oktanil modifikasyonuna bağlı olarak grelin'in des-asil grelin'e dönüşebildiği bilinmektedir (Hosoda vd., 2004). Bu sebeplerle grelin tayini için geliştirilen bu yöntemde grelin'in bu formunun da grelin'den ayrı olarak ölçülmesinin önemli olduğu düşünülmüştür. Bu amaçla grelin ve des-asil grelin'in birlikte tayini ile motilin tayinine olanak veren iki YPSK yöntemi geliştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerde duyarlılığı artırmak için analitler floreskamin ile türevlendirilmiştir. Türev reaksiyonunun koşulları deneysel tasarım yöntemleri ile optimize edilmiştir. Deneysel tasarım yöntemleri, geleneksel optimizasyon yöntemlerine

göre daha az sayıda deney, çaba ve maliyet gerektirmekte ve tüm deneysel alan hakkında geniş bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmada önce türev reaksiyonuna etki eden önemli faktörleri belirlemek için bir tarama yöntemi olan parçalı faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Bu yöntemle birçok faktörün (tampon pH ve derişimi, floreskamin çözeltisinin derişimi ve sıcaklığı) türev verimi üzerine etkisi eş zamanlı olarak incelenmiştir. Reaksiyona en çok etki eden faktörlerin pH, floreskamin derişimi ve sıcaklık olarak belirlenmesinin ardından bir yanıt yüzey yöntemi olan Box-Behnken tasarımı ile bu faktörlerin yanıtlar üzerine etkileri araştırılmıştır. Yanıt yüzey yöntemi ile kurulan model yardımıyla türev veriminin en yüksek olduğu noktalar her iki analit için de pH 9, 100 mM tampon derişimi (borat tamponu) ve 50°C olarak belirlenmiştir.

Grelin ve des-asil grelin için geliştirilen yöntemin kromatografik optimizasyonu tek değişkenli optimizasyon yöntemi ile yürütülmüştür. Bu basamakta deneysel tasarım yöntemleri yerine geleneksel optimizasyon yöntemi seçilmesinin sebebi, kromatogramlarda plazma ve türev ajanı kaynaklı çok sayıda pikin grelin'e ait görece geniş pik ile girişim yapması, bu nedenle araştırılacak alanın belirlenmesinde güçlük çekilmesi olmuştur. Kromatografik optimizasyon amacıyla çeşitli kolonlar, hareketli fazlar, akış hızı ve kolon sıcaklığı taranmıştır. En iyi ayırım Zorbax C₈ kolonda (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,2 trifloroasetik asit içeren su ve %0,2 trifloroasetik asit içeren asetonitril ile gerçekleştirilmiştir. Analizler için gradient program kullanılmış, organik faz yüzdesi 15 dakikada %40'dan %70'e artırılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 30°C'dir. Eksitasyon dalgaboyu 390 nm, emisyon dalgaboyu 495 nm olarak ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi, yıkamalar dahil 23 dakikadır.

Grelin ve des-asil grelin tayini için geliştirilen yöntem ICH (2005) ve FDA'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu'na (FDA, 2018) uygun olarak valide edilmiştir. Yöntem her iki analit için 20-800 ng/mL derişim aralığında doğrusal bulunmuştur. Grelin için kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 0,0109x - 0,2549$ ($R^2 = 0,9936$), des asil grelin için ise $y = 0,0085x - 0,0673$ ($R^2 = 0,9977$) olarak bulunmuştur. Yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği %4'ten küçük BSS değerleri ile, doğruluğu ise yüksek geri kazanım değerleri (%95-102) ile gösterilmiştir. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri, grelin için sırasıyla 3,40 ve 11,32 ng/mL ve des-asil grelin için sırasıyla 2,94 ve 9,81 ng/mL olarak belirlenmiştir. Altı farklı insan plazmasının analizinde grelin ve des-asil grelin piklerinin tutunma zamanlarında girişim yapan pikler olmaması yöntemin

özgünlüğünü kanıtlamıştır. Bu validasyon parametrelerine ilaveten analit çözeltilerinin farklı çalışma koşullarındaki stabilitesi araştırılmıştır. Hem grelin hem de des-asil grelin çözeltilerinin 1 hafta boyunca -20°C’de stabil oldukları, dondurma eritme döngüsü sonrası ise düşük derişimli çözeltilerde analit miktarlarının azaldığı gözlenmiştir. Her iki analitin çözeltileri de oda sıcaklığında bozunmaya uğramıştır.

Grelın için geliştirilen yöntemin düşük LOD ve LOQ değerleri floresans türevlendirme ile analizin duyarlılığının artırılmış olduğunu göstermektedir. Ancak yine de bu yöntemle SK-KS yöntemleri ile gözlenen pg/mL düzeylerindeki düşük LOQ seviyelerine erişilememiştir (Tablo 2.2).

Numune hazırlama yönteminin belirlenmesi için farklı derişimlerde grelin ve des-asil grelin eklenmiş plazma numunelerine çeşitli numune hazırlama teknikleri uygulanmıştır. Asetonitril ile plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve katı faz ekstraksiyon yöntemlerinin ikisi ile de başarı sağlanamamış, her iki analite ait pikler gözlenememiştir. Bunun olası sebepleri olarak analitlerin yüzey adsorpsiyonu, stabilite sorunları veya plazma proteinlerine bağlanması olabileceği düşünülmüş ve bu olumsuzlukları engellemek adına farklı denemeler yapılmıştır. Bütün çabalara rağmen analitlerin tayini için yeterli olacak bir verim sağlanamamış, bu nedenle geliştirilen birinci yöntem numunelerde kullanılamamıştır.

Motilin tayini için geliştirilen yöntemin kromatografik koşullarının optimizasyonunda, yine biyolojik numune ve türev ajanı kaynaklı çok sayıda pik gözlenmesi nedeniyle bir tarama tasarımı yürütülemediğiştir. Yanıtlar üzerine etkili olan faktörler ve faktör seviyeleri ön denemeler ile belirlenmiştir. Kolon çeşidi, hareketli faza eklenen trifloroasetik asit yüzdesi ve gradient programın başlangıç ve bitişteki organik faz yüzdesi gibi parametreler ön denemeler sırasında yapılan analizlerle belirlenmiştir. Ardından gradient süresi, akış hızı ve kolon sıcaklığının kromatografik sistem üzerine etkisi Box-Behnken tasarımı ile araştırılmış ve optimum çalışma koşullarının bulunması sağlanmıştır. Bütün bu çalışmalar sonucunda optimum koşullar Zorbax C₈ kolon (4,6 × 150 mm, 3,5 µm partikül boyutu), hareketli faz olarak %0,1 trifloroasetik asit içeren su ve %0,1 trifloroasetik asit içeren asetonitril olarak belirlenmiş, 20°C kolon sıcaklığı ve 1 mL/dk akış hızında analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan gradient programda organik faz yüzdesi 13 dakikada %30’dan %65’e artırılmıştır. Eksitasyon dalgaboyu 390 nm, emisyon dalgaboyu 495 nm olarak ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi, yıkamalar dahil 21 dakikadır.

Motilin tayini için geliştirilen yöntem de ICH (2005) ve FDA'nın Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu'na (FDA, 2018) uygun olarak valide edilmiştir. Yöntem 2-200 ng/mL derişim aralığında motilin çözeltileri için doğrusal bulunmuş, kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0,0159x - 0,0651$ ($R^2 = 0,9968$) olarak hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğu %91-108 arasındaki geri kazanım değerleri ile gösterilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik %5'ten düşük BSS değerleri ile kanıtlanmıştır. Yöntemin LOD değeri 0,55 ng/mL, LOQ değeri ise 1,84 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntemin özgünlüğünü göstermek için altı farklı insandan alınan plazma numuneleri geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve hiçbirinde motilin pikinin tutunma zamanında girişim piklerine rastlanmamıştır. Motilin çözeltilerinin çalışma koşullarındaki stabilitesi araştırılmış ve her üç koşulda da stabil olduğu gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntem düşük LOQ değeri ile, literatürde motilin tayini için geliştirilmiş tek kromatografik yöntem olan Delinsky vd.'nin (2004) SK-KS yönteminden daha düşük düzeylerde tayine olanak vermektedir (Tablo 2.2).

Motilin tayini için geliştirilen yöntemde numune hazırlama yöntemi olarak asetonitril ile proteinlerin çöktürülmesi yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin geri kazanımını artırmak için protein çöktürme işleminin ardına ultrafiltrasyon tüpleri ile konsantre etme basamağı eklenmiş, bu sayede geri kazanımlar %34 seviyesine artırılmıştır. Sağlıklı gönüllülerden alınan plazma numuneleri geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve motilin düzeyleri 6,79-8,20 ng/mL düzeyinde bulunmuştur. Karşılaştırma amacıyla aynı numuneler ELISA kiti ile de analiz edilmiş, ancak sonuçlar birbiri ile uyumlu değildir. Geliştirilen YPSK yöntemi ile ELISA sonuçlarının farklılık göstermesi, geliştirilen yöntemin duyarlılığını sorgulatabileceği gibi, daha önce bahsedildiği gibi immünolojik yöntemlerin özgünlüğünün düşük olması ile ilişkili bir durum da olabilir.

Geliştirilen YPSK yöntemlerinin grelin, des-asil grelin ve motilin ile yürütülen biyolojik aktivite, biyomarker ve ilaç tasarımı çalışmalarında araştırmacılara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Aydin, S., Karatas, F. ve Geckil, H. (2008). Simultaneous quantification of acylated and desacylated ghrelin in biological fluids. *Biomedical Chromatography*, 22 (12), 1354-1359.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. ve Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965-977.
- Brereton, R.G. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Wiley.
- Cardinael, P., Casabianca, H., Peulon-Agasse, V. ve Berthod, A. (2015). Sample Derivatization in Separation Science. *Analytical Separation Science* içinde).
- Chen, C.Y. ve Tsai, C.Y. (2012). Ghrelin and motilin in the gastrointestinal system. *Curr Pharm Des*, 18 (31), 4755-4765.
- Cheng, Y., Guo, C., Zhao, B. ve Yang, L. (2017). Fast analysis of domoic acid using microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 40 (7), 1583-1588.
- Chih-Yen, C. ve Chang-Youh, T. (2012). Ghrelin and Motilin in the Gastrointestinal System. *Current Pharmaceutical Design*, 18 (31), 4755-4765.
- Coppex, L. (2000). *Derivatives for HPLC Analysis* [Diploma Thesis, University of Genf].
- De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P. ve Delporte, C. (2004). Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. *Endocrinology*, 145 (11), 4997-5005.
- Delinsky, D.C., Hill, K.T., White, C.A. ve Bartlett, M.G. (2004). Quantitative determination of the polypeptide motilin in rat plasma by externally calibrated liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (3), 293-298.
- Donzanti, B.A. ve Yamamoto, B.K. (1988). An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sciences*, 43 (11), 913-922.
- Duan, Y., Liu, Y., Shen, W. ve Zhong, W. (2017). Fluorescamine Labeling for Assessment of Protein Conformational Change and Binding Affinity in Protein-Nanoparticle Interaction. *Analytical Chemistry*, 89 (22), 12160-12167.
- Eggenreich, K., Zach, E., Beck, H. ve Wintersteiger, R. (2004). Determination of 4-amino-m-cresol and 5-amino-o-cresol by high performance liquid chromatography and fluorescence derivatization using fluorescamine. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61 (1), 35-46.
- Eslami, Z., Ghassempour, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2017). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry analyses of ghrelin and related peptides. *Biomed Chromatogr*, 31 (1), e3796.
- Eslami, Z., Torabizadeh, M., Talebpour, Z., Talebpour, M., Ghassempour, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2016). Simple and Sensitive Quantification of Ghrelin Hormone in Human Plasma Using SBSE-HPLC/DAD-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 54 (9), 1652-1660.
- FDA. (2018). Bioanalytical Method Validation.
- Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Taché, Y. ve Reeve, J.R., Jr. (2011). The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*, 414 (1), 38-46.

- Hibbert, D.B. (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2-13.
- Hosoda, H., Doi, K., Nagaya, N., Okumura, H., Nakagawa, E., Enomoto, M., Ono, F. ve Kangawa, K. (2004). Optimum Collection and Storage Conditions for Ghrelin Measurements: Octanoyl Modification of Ghrelin Is Rapidly Hydrolyzed to Desacyl Ghrelin in Blood Samples. *Clinical Chemistry*, 50 (6), 1077-1080.
- ICH. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline.
- John, H., Walden, M., Schäfer, S., Genz, S. ve Forssmann, W.-G. (2004). Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378 (4), 883-897.
- Kaiya, H. (2016). Subchapter 21A - Ghrelin. Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Ed.), *Handbook of Hormones* içinde (183-e121A-187). San Diego: Academic Press.
- Kojima, M. ve Kangawa, K. (2005). Ghrelin: Structure and Function. *Physiological Reviews*, 85 (2), 495-522.
- Kojima, M., Nakamura, Y., Sato, T. ve Kangawa, K. (2013). Chapter 104 - Ghrelin A2 - Kastin, Abba J. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* içinde (776-783). Boston: Academic Press.
- Koller, M. ve Eckert, H. (1997). Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods. *Analytica Chimica Acta*, 352 (1), 31-59.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3 ed.). Springer US.
- Lozanov, V., Petrov, S. ve Mitev, V. (2004). Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide. *Journal of chromatography. A*, 1025 (2), 201-208.
- Mesmin, C., Fenaille, F., Ezan, E. ve Becher, F. (2011). MS-based approaches for studying the pharmacokinetics of protein drugs. *Bioanalysis*, 3 (5), 477-480.
- Milne, G.L. ve Morrow, J.D. (2009). Chapter 5 - Measurement of Biological Materials. *Clinical and Translational Science* içinde (69-86). San Diego: Academic Press.
- Min, C., Ohta, K., Kajiya, M., Zhu, T., Sharma, K., Shin, J., Mawardi, H., Howait, M., Hirschfeld, J., Bahammam, L., Ichimonji, I., Ganta, S., Amiji, M. ve Kawai, T. (2012). The antimicrobial activity of the appetite peptide hormone ghrelin. *Peptides*, 36 (2), 151-156.
- Montgomery, D.C. (2012). *Design and Analysis of Experiments* (8th Edition ed.). John Wiley & Sons, Incorporated.
- Novák, P. ve Havlíček, V. (2016). 4 - Protein Extraction and Precipitation. P. Ciborowski & J. Silberring (Ed.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)* içinde (51-62). Boston: Elsevier.
- Otto, M. (2016). *Chemometrics*. Germany: Wiley-VCH.
- Peeters, T.L. (2013). Chapter 167 - Ghrelin. A. J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* içinde (1236-1240). Boston: Academic Press.
- Poitras, P. (2013). Chapter 170 - Motilin. A. J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)* içinde (1257-1264). Boston: Academic Press.
- Poitras, P. ve Peeters, T.L. (2008). Motilin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 15 (1), 54-57.
- Powar, C.B. ve Chatwal, G.R. (2007). *Biochemistry*. Mumbai: Global Media.

- Rauh, M., Gröschl, M. ve Rascher, W. (2007). Simultaneous Quantification of Ghrelin and Desacyl-Ghrelin by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in Plasma, Serum, and Cell Supernatants. *Clinical Chemistry*, 53 (5), 902-910.
- Sakai, T. (2016). Subchapter 21B - Motilin. Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Ed.), *Handbook of Hormones* içinde (186-e121B-182). San Diego: Academic Press.
- Sakata, I. (2011). *The Gut Peptide Hormone Family, Motilin and Ghrelin*. IntechOpen.
- Sanger, G.J. ve Furness, J.B. (2016). Ghrelin and motilin receptors as drug targets for gastrointestinal disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13 (1), 38-48.
- Sewald, N. ve Jakubke, H.D. (2009). Fundamental Chemical and Structural Principles. *Peptides: Chemistry and Biology* içinde (5-61). Wiley.
- Shabir, G.A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987 (1), 57-66.
- Sidibé, J., Varesio, E. ve Hopfgartner, G. (2014). Quantification of ghrelin and des-acyl ghrelin in human plasma by using cubic-selected reaction-monitoring LCMS. *Bioanalysis*, 6 (10), 1373-1383.
- Staes, E., Rozet, E., Učakar, B., Hubert, P. ve Prétat, V. (2010). Validation of a method for the quantitation of ghrelin and unacylated ghrelin by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (3), 633-639.
- Takei, Y., Ando, H. ve Tsutsui, K. (2015). *Handbook of Hormones : Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Toseland, C.P. (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of chemical biology*, 6 (3), 85-95.
- Vera Candiotti, L., De Zan, M.M., Cámara, M.S. ve Goicoechea, H.C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.
- Yang, C., Huang, H., Zhang, H. ve Liu, M. (2006). Analysis of Insulin by High Performance Liquid Chromatographic Method with Precolumn Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole. *Analytical Letters*, 39 (12), 2463-2473.
- http-1. <https://chemicalize.com/#/calculation> (Erişim tarihi: 04.12.2018)
- http-2. <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool#Results> (Erişim tarihi: 14.12.2018)

EK-1. Etik Kurul Onayı

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Sakine Atila Karaca

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2007-2012, Lisans eğitimi, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- 2014-2016, Yüksek lisans eğitimi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir.
- 2014, Araştırma Görevlisi, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir.

Bilimsel Projelerde Yaptığı Görevler:

- Antidepresan Etkili Vortiksetin'in Kapiller Elektroforez Yöntemiyle Farmasötik Formlarındaki Tayini, AUBAP projesi, 2005S050, 08.06.2020-08.06.2021 (Araştırmacı).
- Kromatografik yöntemlerle biyolojik olarak aktif peptitlerin tayini, AUBAP projesi, 1808S290, 09. 10.2018-01.12.2021 (Araştırmacı).
- Antidepresan Etkili Vortiksetin'in UHPLC Yöntemiyle Farmasötik Formlarındaki Tayini, AUBAP projesi, 1805S211, 06/06/2018-06/06/2019 (Araştırmacı).
- Polifarmasi uygulaması bulunan iki antipsikotik ilacın farklı kolonlar üzerindeki ayırım davranışlarının araştırılması, AUBAP projesi, 1705S168, 02/06/2017-02/06/2018 (Araştırmacı).
- Yeni Nesil Atipik Antipsikotik İlaçların UHPLC Yöntemiyle Farmasötik Formlarındaki Tayini, AUBAP projesi, 1605S287, 03/06/2016-27/10/2017 (Araştırmacı).
- Klinik Kullanımları Yeni Olan Atipik (İkinci Jenerasyon) Antipsikotik İlaçların Sıçan Plazmasında Tayini için Basit, Hızlı ve Duyarlı Bir Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Yöntemin Tam Olarak Validasyonu, AUBAP projesi, 1302S023 Proje no, 29/03/2013 - 29/09/2017 (Araştırmacı) .

Yayınlar

- Aliyeva Sona, Atila Karaca Sakine, Uğur Alper, Dal Poçan Arın Gül, Yeniceli Uğur Duygu (2020). A novel capillary electrophoresis method for the quantification of asenapine in pharmaceuticals using Box-Behnken design. *Chemical Papers*, 74, 4443-4451., Doi: 10.1007/s11696-020-01256-5
- Atila Karaca Sakine, Rashidova Nurana, Uğur Alper, Yeniceli Uğur Duygu (2020). Development of a simple HPLC method for the quantitation of vortioxetine in pharmaceuticals using DoE approach. *Chemical Papers*, 74, 1541-1549., Doi: 10.1007/s11696-019-01008-0
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2018). Development of a validated HPLC method for simultaneous determination of olanzapine and aripiprazole in human plasma. *Journal of Research in Pharmacy*, 22(1), 162-171., Doi: 10.12991/jrp.2018.90
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2018). Chemometrically assisted optimization and validation of a new HPLC method for the determination of paliperidone in pharmaceuticals. *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 41(3), 129-134., Doi: 10.1080/10826076.2018.1426599
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2018). Determination of loperidone in Pharmaceuticals by Validated High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, 51(1-2), 24-32., Doi: 10.1080/00032719.2017.1302462
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2017). Development of a validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of Lurasidone in pharmaceuticals. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(4), 931-937., Doi: 10.12991/mpj.2017.32
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2017). A Stability Indicating Ion-Pair LC Method for the Determination of Asenapine in Pharmaceuticals. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62(1), 3325-3329., Doi: 10.4067/S0717-97072017000100004
- Atila Sakine, Yılmaz Işıl Tan Şener Erol, Yeniceli Uğur Duygu (2016). Development and Validation of a New HPLC Method for the Determination of Quetiapine and its Metabolites 7 Hydroxy Quetiapine and Quetiapine Sulfoxide in Rat Plasma. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17-26.

Bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler:

- Atila Sakine, Yılmaz Işıl Tan, Şener Erol, Yeniceli Uğur Duygu (2015). Development and Validation of a Simple and Specific UHPLC Method for the Determination of Quetiapine and its Metabolites 7 Hydroxy Quetiapine and Quetiapine Sulfoxide in Rat Plasma. International Symposium On Pharmaceutical Sciences, Isops 11th (Poster).
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2015). Development and validation of an Ion Pair Liquid Chromatography method for determination of Asenapine in tablets. 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Poster).
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2016). Development and Validation of a Simple and Rapid HPLC Method for the Determination of Iloperidone in Tablets. 10th Aegean Analytical Chemistry Days (Poster).
- Atila Karaca Sakine, Yeniceli Uğur Duygu (2017). Lurasidon'un tabletlerde tayini için basit ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirilmesi ve validasyonu. 1. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sempozyumu (ANES) (Poster).

Kurs ve Sertifikalar

- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney Hayvanları Kullanımı ile ilgili B Sınıfı Eğitim Programı, Türkiye / Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sertifika, 13.03.2017-07.04.2017.