

T.C.  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

HÜMİK MADDE ESASLI MONOLİTİK KRİYOJELLERİN  
HAZIRLANMASI VE AYIRMA İŞLEMLERİNDE  
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ

AHMET EREN ÖZKAN

Ağustos 2016



T.C.  
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

HÜMİK MADDE ESASLI MONOLİTİK KRİYOJELLERİN  
HAZIRLANMASI VE AYIRMA İŞLEMLERİNDE  
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ

AHMET EREN ÖZKAN


Yüksek Lisans Tezi

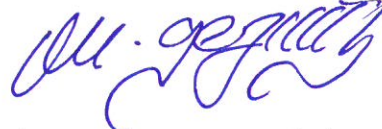
Danışman


Doç. Dr. Orhan GEZİCİ

Ağustos 2016

Ahmet Eren ÖZKAN tarafından Doç. Dr. Orhan GEZİCİ danışmanlığında hazırlanan “Hümik Madde Esaslı Monolitik Kriyojellerin Hazırlanması ve Ayırma İşlemlerinde Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :  Doç. Dr. Mevlüt BAYRAKCI  
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi |

Üye :  Doç. Dr. Orhan GEZİCİ (Danışman)  
Niğde Üniversitesi |

Üye :  Yrd. Doç. Dr. Yavuz SÜRME  
Niğde Üniversitesi |

**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun .../.../20... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ahmet Eren ÖZKAN

## ÖZET

### HÜMİK MADDE ESASLI MONOLİTİK KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI VE AYIRMA İŞLEMLERİNDE KULLANILABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZKAN, Ahmet Eren

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Orhan GEZİCİ

Ağustos 2016, 75 sayfa

HEMA (2-Hidroksietilmetakrilat) ve MBAAm (N,N'-Metilenbisakrilamid) karışımına HA'nın (hüyük asit) uygun bileşimlerde katılması ve radikalik polimerleşme ile -20 °C'de kriyojelleşme işleminin gerçekleşmesine dayanan basit bir yöntemle verimli ve ucuz bir iyon değıştirici monolitik sabit faz (PHEMA-HA) elde edilmiştir. Elde edilen monolitik malzeme elemental analiz, FTIR spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), cıva porozimetresi, hidrolitik stabilite, izolelektrik nokta tayini, su tutma kapasitesi ve su geçirgenliğinin tayini gibi metot ve tekniklerle karakterize edilmiştir. Elemental analiz temelinde yapılan hesaplamalardan, kriyojel yapısına dâhil olan HA miktarı 45 mg HA/g PHEMA-HA olarak bulunmuştur. Elde edilen sabit faz için çalışılan deneysel şartlarda herhangi bir çözünme riskinin olmadığı anlaşılmıştır. Kromatografik çalışmalarda model proteinler ( $\alpha$ -kimotripsorijen a, sitokrom c, lizozim ve insan serum albümini) kullanılmıştır. Deneysel süreçte, protein iyon-değişim kromatografisi üzerinde durulmuş, hareketli fazın iyonik şiddeti, hareketli fazın pH'sı (5,0 ; 6,0 ; 7,0), hareketli fazın akış hızı gibi deneysel parametrelerle proteinlerin alıkonma davranışları arasındaki ilişki incelenmiştir. İyonik şiddetin ve pH'nın etkisi gradyent elüsyon şartlarında çalışılmıştır. Sonuçlar, HA esaslı monolitik kriyojelin bir iyon değıştiriciden beklenen özelliklere uygun bir davranış sergilediğini göstermiştir.

*Anahtar kelimeler:* Frontal analiz, Gradyent elüsyon, HPLC, Hüyük asit, İyon-değişim, Kriyojel, Kromatografi, Monolitik kolon, Protein, Sabit faz

## SUMMARY

### PREPARATION OF HUMIC ACID-DERIVED MONOLITHIC CRYOGELS AND INVESTIGATING THEIR USABILITY IN SEPARATION PROCESSES

ÖZKAN, Ahmet Eren

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Associated Professor Dr. Orhan Gezici

August 2016, 75 pages

An efficient and inexpensive monolithic stationary phase (PHEMA-HA) has been prepared through an easy process comprised of addition of HA (humic acid) to a mixture of HEMA (2-Hydroksiethylmethacrilate) and MBAAm (N,N'-Methylenebisacrylamide), and subsequent radical-polymerization at -20 °C. The prepared monolithic material was characterized in terms of elemental analysis, FTIR spectroscopy, Scanning electron microscopy (SEM), mercury porosimetry, hydrolytic stability tests,  $pH_{pzc}$  measurements, water holding capacity and water permeability techniques/methods. The amount of HA incorporated into the structure was calculated as 45 mgHA/gPHEMA-HA from the elemental analysis results. It was evidenced that there was no solubility risk for the prepared stationary phase under the studied conditions. Some model proteins (i.e.  $\alpha$ -chymotrypsinogen a, cytochrome c, lysozyme and human serum albumin) were used in the chromatographic experiments. The study was conceptualized on the basis of protein ion-exchange chromatography, and the effect of some experimental parameters, such as such as ionic strength, pH (5.0; 6.0; 7.0) and flow rate of mobile phase, on retention behavior of proteins was investigated. The effect of ionic strength and pH was studied under the gradient elution conditions. The results revealed a typical ion exchanger behavior for the prepared HA-derived stationary phase.

*Keywords:* Chromatography, Cryogel, Frontal analysis, Gradient elution, HPLC, Humic acid, Ion-exchange, Monolithic column; Protein, Stationary phase

## ÖN SÖZ

Kromatografik ayırma yöntemlerinde verimliliği etkileyen en önemli parametre hiç kuşkusuz kullanılan katı/sabit fazdır. Bu nedenle alternatif katı/sabit fazların elde edilmesine yönelik çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda, özellikle son yıllarda molekül ağırlığı büyük türlerin (ör. Protein, peptit, monoklonal antikor vs.) ayırma ve saflaştırma işlemlerinde monolitik katı/sabit fazların partikül esaslı olanlara kıyasla üstünlük sağladığı görülmüştür. Monolitik katı/sabit fazlardan kriyojellerin ise, özellikle hazırlama kolaylığı ve elde edilen malzemelerin farklı aplikasyonlara uyumu gibi hususlar göz önünde bulundurulduğunda son derece faydalı olduğu görülmüştür. Bu nedenle, son yıllarda kriyojel esaslı katı/sabit fazlar ile ilgili çalışmalarda da artış gözlenmiştir.

Bu çalışmada, hümik asit-kriyojel esaslı yeni tip bir monolitik sabit fazın hazırlanması ve protein ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılabilirliğinin incelenmesi hedeflenmektedir. Çalışmalarda, doğal makromoleküllerden olan hümik asidin kriyojel matriksine katılması işleminin uygulanabilirliği incelenmiştir. Elde edilen hümik asit esaslı monolitik sabit fazın verimliliği model proteinler kullanılarak kapsamlı bir şekilde ilk defa incelenmiştir.

Çalışmamın yürütülmesi esnasında, çalışmalarına yön veren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Orhan GEZİCİ' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar süresince sürekli yardım ve desteğini gördüğüm Yüksek Lisans Öğrencisi İdris GÜVEN'e minnet duygularımı ve teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Bu çalışmaya FEB 2015/17 numaralı proje ile finansal destek sağlayan Niğde Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanlarına katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Sadece bu çalışmam boyunca değil, her zaman yaptığım tüm işlerde desteğini esirgemeyen ve her türlü fedakârlığı gösteren sevgili eşim Miraç ÖZKAN'a şükranlarımı sunuyorum ve bu tezi "*Ömrümüzün ilk meyvesine*" ithaf ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xi
BÖLÜM I GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Monolitik Malzemeler.....	2
2.1.1 Monolitik kriyojeller.....	3
2.1.2 Monolitik kriyojellerin uygulama alanları.....	7
2.2 Proteinler.....	8
2.3 Kromatografi.....	13
2.4 Hümik Maddeler.....	16
2.4.1 Katı-sabit faz olarak hümik asit.....	17
2.5 Literatür Özeti.....	18
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD.....	21
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	21
3.2 Protein Örnekleri.....	21
3.3 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar.....	22
3.4 Hümik Asidin Saflaştırılması.....	22
3.5 Kriyojel Sentezi.....	23
3.6 Karakterizasyon.....	28
3.6.1 Elemental analiz.....	28
3.6.2 FTIR spektroskopisi.....	28
3.6.3 Hidrolitik stabilite testleri.....	28
3.6.4 $pH_{pzc}$ (Sıfır yük noktasına karşılık gelen pH) tayini.....	29
3.6.5 Cıva porozimetresi.....	29
3.6.6 Monolit için toplam boş fraksiyon tayini.....	30

3.6.7 SEM (Taramalı elektron mikroskopisi) .....	30
3.7 Kromatografik İşlemler .....	30
3.7.1 Protein numuneleri .....	30
3.7.2 Kromatografik kolon ve kolon performansı.....	31
3.7.3 Gradyent elüsyon ve pH etkisi .....	32
3.7.4 Proteinler için kromatografik ayırma şartlarının incelenmesi.....	32
3.7.5 Frontal analiz deneyleri.....	33
<b>BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>34</b>
4.1 Karakterizasyon.....	34
4.1.2 Elemental analiz .....	34
4.1.3 FTIR analizleri .....	35
4.1.4 Hidrolitik stabilite testleri .....	38
4.1.5 $pH_{pzc}$ tayini .....	38
4.1.6 Cıva porozimetresi.....	41
4.1.7 PHEMA-HA için toplam boş fraksiyonun tayini .....	43
4.1.8 SEM analizleri.....	43
4.2 Kromatografik İşlemler .....	45
4.2.1 Kolonun performansı .....	45
4.2.2 Gradyent eğimi ve pH etkisi.....	54
4.2.3 Kromatografik ayırmanın optimizasyonu .....	60
4.2.4 Frontal analiz.....	62
<b>BÖLÜM V SONUÇ .....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>69</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ .....</b>	<b>75</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4. 1. HA, PHEMA ve PHEMA-HA için elemental analiz sonuçları <sup>a</sup> .....	34
Çizelge 4. 2. Monolitlerin FTIR spektrumlarında gözlenen ana bantlar .....	37



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler .....	2
Şekil 2. 2. Kriyojel ve jelin SEM görüntüsü.....	4
Şekil 2. 3. Amino asit yapısı .....	8
Şekil 2. 4. Bir polipeptidi stabilize eden bağlar .....	9
Şekil 2. 5. Bir peptid bağının oluşumu.....	10
Şekil 2. 6. Proteinlerin yapısal organizasyonu (Keha ve Küfrevioğlu 2000).....	11
Şekil 2. 7. Hümik asidin moleküler yapısı (Stevenson 1994).....	17
Şekil 3. 1. Yöntem-1 ile elde edilen kurutulmuş PHEMA-HA'nın fotoğrafı.....	24
Şekil 3. 2. Saflaştırılmış HA'nın immobilizasyon mekanizması.....	26
Şekil 3. 3. PHEMA (sol alt) ve PHEMA-HA (sağ üst) için fotoğraflar .....	27
Şekil 4. 1. PHEMA ve PHEMA-HA için FTIR spektrumları ve karakteristik bantlar ...	36
Şekil 4. 2. PHEMA ve PHEMA-HA için pH-değişim metoduna göre $pH_{pzc}$ tayini .....	40
Şekil 4. 3. PHEMA-HA için gözenek dağılım grafiği .....	42
Şekil 4. 4. PHEMA ve PHEMA-HA için SEM imajları .....	44
Şekil 4. 5. Akış hızı ile teorik tabaka sayısı arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi .....	47
Şekil 4. 6. PHEMA-HA için basınç düşüş grafiği .....	49
Şekil 4. 7. Chy için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....	51
Şekil 4. 8. Cyt için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....	52
Şekil 4. 9. Lys için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar .....	53
Şekil 4. 10. Chy için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler. ....	56
Şekil 4. 11. Cyt için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler. ....	57
Şekil 4. 12. Lys için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler.....	58
Şekil 4. 13. Chy, Cyt ve Lys için $k'$ , pH ve $\beta$ arasındaki ilişki .....	59
Şekil 4. 14. Protein karışımı için kaydedilen kromatogramlar .....	61
Şekil 4. 15. Farklı enjeksiyon hacimlerinde kaydedilen profiller .....	63
Şekil 4. 16. PHEMA-HA üzerinde kaydedilen breakthrough eğrisi .....	65

## SİMGE VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\beta$	Gradyent eğimi
$C$	Molar konsantrasyon (mol/L)
$\varepsilon$	Kolonun toplam boş fraksiyonu
$k'$	Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)
$t_G$	Gradyent süresi
$t_R$	Alıkonma süresi
$t_M$	Ölü zaman

### Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
Chy	$\alpha$ -Kimotripsinojen a
Cyt	Sitokrom c
dak	Dakika
dev/dak	devir/dakika
$d_w$	Suyun Özkütlesi
FA	Frontal Analiz
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	Hümik Asit
HA-APS	<i>End-capping</i> İşlemi Yapılmamış İmmobilize Hümik Asit
HETP	Teorik Tabakaya Eşdeğer Yükseklik
HP-FA	Yüksek Performanslı Frontal Analiz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSA	İnsan Serum Albümini
$k_w$	Su Geçirgenliği (Darcy Kanunu)
Lys	Lizozim
MBAAm	N,N'-Metilenbisakrilamid
mAU	Miliabsorbans Birimi
$m_d$	Kriyojelin Kuru Kütlesi

$m_w$	Kriyojelin Islak Kütlesi
$N$	Teorik Tabaka Sayısı
HEMA	Poly(hidroksietilmetakrilat)
HEMA-HA	Hümik Asit İmmobilize Edilmiş PHEMA
pH <sub>i</sub>	İlk pH Değeri
pH <sub>s</sub>	Son pH Değeri
pH <sub>pzc</sub>	Sıfır Yük Noktasına Karşılık Gelen pH Değeri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletan-1,2-diamin
UV-Vis	Morötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

## BÖLÜM I

### GİRİŞ

Başta proteinler olmak üzere birçok biyofarmasötigin üretim maliyetlerinin %50-80'lik kısmı doğrudan kullanılan ayırma ve saflaştırma işlemleri ile ilgilidir. Bu nedenle, verimli ayırma ve saflaştırma teknikleri, orta ve uzun vadede, daha ucuz ilaçların üretilmesi noktasında kritik öneme sahiptir. Kromatografi, bu amaçla en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Son yıllarda, kromatografik cihazlarda gözlenen teknolojik gelişmeler, daha verimli ayırma ve saflaştırma işlemlerine olanak tanımakla birlikte, kromatografik tekniklerin verimini belirleyen en önemli parametre hâlâ kullanılan sabit fazdır. Proteinlerin verimli ve ucuz yaklaşımlar temelinde saflaştırılmasına olanak tanıyan en önemli yöntemlerden biri olan iyon-değişim kromatografisinde de kullanılan sabit faz büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda, proteinlerin yapı içerisinde transferine uygun bir morfoloji sergileyen monolitik kriyojeller, uygun fonksiyonel gruplarla modifiye edildiklerinde verimli yaklaşımlar sunmaktadır. Fakat amaca uygun fonksiyonel monomerlerin her zaman bulunamaması veya post-immobilizasyon yöntemlerinin düşük verimle gerçekleşmesi gibi nedenler, iyon değiştirici kriyojellerin sentezlenmesinde karşılaşılan en büyük güçlüklerdir. Bu nedenle daha verimli yaklaşımlara gereksinim duyulmaktadır.

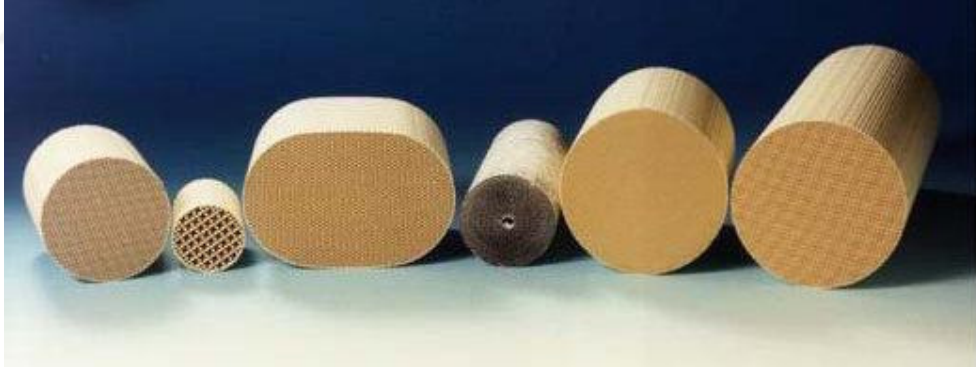
Sunulan bu çalışmada, doğal olarak oluşan biyomakromoleküllerden olan hümitik asidin kriyojelleştirilmesi ve sahip olduğu iyon değiştirici gruplar sayesinde alternatif bir monolitik sabit faz olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Böylece, elde edilen yeni-tip malzemenin protein iyon-değişim kromatografisinde kullanılabilirliği ilk defa kapsamlı bir incelemeye tabi tutulmuş olacaktır.

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Monolitik Malzemeler

“Monolit” kelimesi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde tek parçadan oluşan malzemeleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Monolitik kolonlar, tek bir birimden oluşan, gözenekli bir yapıya sahip sürekli sistemler olup, monomerlerin uygun bir kap içerisinde polimerleştirilmesiyle hazırlanırlar. İçerisinde hazırlandıkları kabın şeklini alabilmelerinden dolayı monolitik yapılar farklı çapta ve şekillerde üretilmektedirler (Şekil 2. 1). Sürekli yataklar olarak da tanımlanabilen monolitler, silindir veya disk şeklinde de hazırlanabilmektedirler (Josic vd. 2001). Monolit hazırlanmasında sentetik organik malzemeler, doğal polimerler veya organik malzemeler kullanılabilir. Literatürde akrilamit, silika, stiren ve metakrilat gibi farklı kimyasallar kullanılarak hazırlanmış farklı özellikte monolitik malzemeler mevcuttur (Podgornik vd. 2000; Svec ve Frechet 1999).



**Şekil 2. 1.** Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler

Monolitler biyolojik moleküllerin ayrılmasında kullanılan önemli araçlardır. Monolitler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin ilk yıllarında yapılmış olmasına rağmen, büyük bir buluş olarak önem kazanmaları 1990'larda gerçekleşmiştir. Bu malzemelerin sergiledikleri düşük kütle aktarım direnci, başta kromatografi olmak üzere katı-sıvı ara-yüzeylerindeki etkileşmelere dayanan ayırma işlemlerinde yoğun bir şekilde kullanım alanı bulmalarına yol açmıştır. Özellikle molekül ağırlığı yüksek biyolojik türlerin (Ör. Proteinler ve monoklonal antikolar) yer aldığı tüm çalışmalarda geleneksel kromatografik sistemlere oranla, monolitlerin çok daha iyi bir performans sergiledikleri görülmüştür (Jungbauer

ve Hahn 2004; Uzun vd. 2004; Xie vd. 1999). Monolitlerin geleneksel dolgulu kolonlardan farkı, tek parçalı bir polimerik yapının içerisinde birbirleri ile muntazam bir şekilde bağlantılı gözenekli yapılardan meydana gelmesidir. Monolitin yapısındaki birbiriyle bağlantılı gözenekler, kanallar arası bir ağ oluşturmaktadır. Kanal içi kütle aktarımı akışla birlikte olduğundan, hareketli faz ile sabit faz arasındaki aktarım çok hızlı gerçekleşmektedir (Courtois vd. 2006). Sonuç olarak, proteinler gibi oldukça büyük moleküller bile çok kısa sürede monolitik kolonlardan ayrılabilirler. Ayrıca, kromatografik sistemlerde sıvı akışı sırasında oluşan basıncın düşük olması istenir. Düzgün akış kanallarına sahip olmalarından ötürü, monolitlerde yüksek basınç oluşmaz ve böylece kolonda oluşabilecek herhangi bir tıkanma önlenmiş olur (Benčina vd. 2004). Yani, monolitlerin hidrodinamik özellikleri sebebiyle sabit faz olarak kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi, ayırma etkinliğinin iyi olması sebebiyle büyük moleküllerin ayrımı kısa zamanda gerçekleştirilmektedir (Podgornik vd. 2000). Amaca uygun ligandların immobilize edilmesiyle, monolitlerin fonksiyonel ve dolayısıyla daha seçici yapılara dönüştürülmesi mümkündür (Josic vd. 2001).

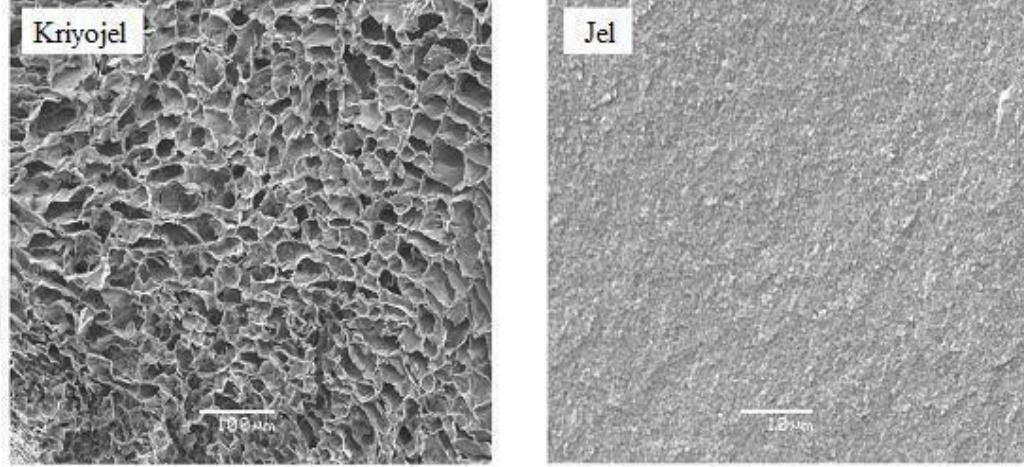
Sonuç olarak; monolitler, biyoteknolojide analitik ve preparatif uygulamalar için alternatif ayırma ortamlarının hazırlanması noktasında üzerinde çalışılması gereken oldukça önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır (Bereli vd. 2006; Mayes ve Mosbach 1997; Wulff 1995; Ye ve Mosbach 2001).

### **2.1.1 Monolitik kriyojeller**

Monolitik malzemelerin üretilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri kriyojelleşme işlemidir. Kriyojel adı 'buz' anlamına gelen Yunanca 'krios' kelimesinden türetilmiştir. Dolayısıyla, soğukta elde edilen jel anlamına gelen kriyojeller, kısmen donmuş monomer ya da polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Birbirine bağlı makro gözeneklerden meydana gelen kriyojeller, monomer çözeltilerinin donma noktalarının altında gerçekleştirilen kriyojelleşme işlemi ile hazırlanmaktadır (Lozinsky vd. 2003).

Kriyojellerin oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı meydana getirir. Kalıp görevi gören buz kristallerinin erimesinden sonra birbiriyle bağlantılı gözenekler açığa çıkar. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle

bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Klasik jellerin çözeltileri homofaz sistemler iken kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşirler. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir (Şekil 2. 2) (Plieva vd. 2007).



**Şekil 2. 2.** Kriyojel ve jelin SEM görüntüsü

Kriyojelleri, sulu ortamda uygun monomerler kullanarak radikalik polimerleşme ile sıfırın altındaki sıcaklıklarda üretmek mümkündür (Plieva vd. 2005). Kriyojellerin büyük bir kısmının poliakrilamit (PAAM), polietilenglikol (PEG), polivinilalkol (PVA), polihidroksietilmetakrilat (PHEMA) yapısında oldukları görülmektedir (Plieva vd. 2007). Kriyojeller, sahip oldukları elastiki yapı sayesinde suya bırakıldıklarında suyu çok kısa sürede emer ve sıkıştırıldıklarında ise kolaylıkla gözeneklerinden dışarı verirler. Bu işlem, (kullanılan polimerin yapısına bağlı olarak) genellikle yapıda herhangi bir bozulma meydana gelmeksizin tekrar tekrar uygulanabilir. Kriyojellerin morfolojisi incelendiğinde gözenek boyutlarının 10–100 µm'ye (ve bazen 200 µm'ye) kadar değişebilmekte olduğu görülebilir.

Kriyojeller birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden meydana geldiği için nanopartiküllerin ve mikro partiküllerin geçişine dahî olanak tanıyan bir özellik sunar. Diğer taraftan jeller kullanılırken jel içerisinden geçiş esnasında madde kaybı gerçekleşebilir; kriyojellerde böyle bir durum söz konusu değildir (Lozinsky vd. 2003). Kriyojellerin temel yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla birleştirildiğinde, biyolojik nanopartiküllerin, mikropartiküllerin (plazmidler, virüsler,

hücre organelleri) ayırma ve saflaştırma işlemleri için bu yapılar uygun kullanım alanları sunmaktadır (Lozinsky vd. 2003).

Gözenek büyüklüğü, gözenek duvarlarının kalınlığı ve gözenek duvarlarının yoğunluğu kriyojellerin performansını etkileyen parametrelerdendir. Gözenek büyüklüğü akış direncini etkilerken; gözenek duvarlarının kalınlığı ve yoğunluğu ise kriyojellerin makroskobik mekanik özelliklerini belirler (Plieva vd. 2005). Kromatografik bir malzemenin gözenek hacmi çok önemlidir. Tamamen su ile şişmiş haldeki bir kriyojelin toplam ağırlığının ortalama olarak yalnızca %3-4'ü kuru polimer ağırlığıdır. Ağırlığın yaklaşık %4-5'i polimere bağlı ve fiziksel olarak sıkıştırılarak yapıdan uzaklaştırılmayan sudan oluşur. Böylece geriye kalan kriyojel ağırlığının yaklaşık %90'ını gözeneklerdeki su oluşturur. Kriyojellerin elastikiyeti sayesinde geniş gözeneklerdeki suyun büyük bir kısmı mekanik olarak sıkıştırılarak yapıdan uzaklaştırılabilir. Bu durum, kriyojel hacminin büyük bir kısmının birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluştuğunu gösterir (Plieva vd. 2004).

Şişme özellikleri nedeniyle kriyojeller biyoyteknolojide fazla sayıda uygulama alanı bulmuştur (Plieva vd. 2008). Değişik monomerlerden hazırlanan kriyojellerin şişme derecesi aynı koşullarda ama yüksek sıcaklıkta hazırlanan jellerin şişme derecesinden en az 3-6 kat daha azdır (Plieva vd. 2007).

Kriyojeller, karyotropik jelleşme (kriyojelleşme) işlemiyle üretilirler. Bu işlem daha çok dondurma-eritme şeklinde gerçekleştirilen bir işlemdir. Hidrofilik yapıdaki kriyojeller makrogözeneklere sahiptirler ve sıfırın altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen polimerizasyon işlemi ile oluşturulurlar. Kriyojel hazırlama sürecinin temel basamaklarından bahsetmek gerekirse, kriyojel oluşturmak için ilk önce monomer karışımları uygun bir çözücüde çözülerek homojen çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti içerisine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli tepkime başlatıcı da eklenerek, hazırlanan homojen karışım belirli bir surede düşük sıcaklıklarda bekletilir ve karışımın donması sağlanır. Bu işlem esnasında elde edilen yapı tek tip bir katı gibi görünmesine rağmen esasında heterojendir ve donmuş çözücü kristalleri içerisinde donmamış sıvı mikro faz içerir. Donma aşamasında, çözücü molekülleri donarak birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, donmamış kısımda bulunan monomerler ise polimerleşerek buz kristallerinin etrafında üç boyutlu bir ağ yapısı meydana getirirler. Daha sonra buz halindeki karışım oda sıcaklığına alınarak polimerik ağ yapısı içerisinde oluşan buz

kristallerinin erimesi sağlanır ve böylece kriyojel oluşumu süreci tamamlanmış olur (Yao vd. 2006).

Kriyojelleşme işleminde çözücü kristalleri, gözenek yapıcı ajan (projen) olarak işlev görmektedir. Gözenek duvarının etrafındaki çözücünün yüzey geriliminden dolayı buz kristallerinin erimesi, kriyojellerdeki gözeneklerin genellikle dairesel şekle sahip olmalarını sağlar. Gözeneklerin şekil ve boyutları, birçok faktöre bağlıdır; monomer derişimi ve polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklık en önemli etki eden faktörlerdir. Kriyojellerin yapısında makrogözeneklerin yanı sıra mikrogözenekler de bulunabilmektedir (Lozinsky vd. 2003).

Kriyojellerin en önemli özelliklerinden biri, deneysel şartların ayarlanmasıyla morfolojinin kolaylıkla değiştirebilmesidir. Bu anlamda en çok kullanılan deneysel parametreler monomer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ile kriyojelleşmenin gerçekleştirildiği sıcaklıktır. Bu parametrelerin etkisi aşağıda kısaca açıklanmıştır:

a) Çapraz Bağlayıcı Miktarı: Çapraz bağlayıcı miktarı ile suda şişme miktarı ters orantılıdır. Yani çapraz bağlayıcı oranı arttırıldıkça suda şişme özelliği düşer. Ayrıca çapraz bağlayıcı miktarı arttırılarak kriyojelin mekanik dayanımı arttırılabilir. Diğer taraftan, çapraz bağlayıcı oranı arttırıldıkça kriyojelin gözenek boyutu genellikle düşer.

b) Monomer konsantrasyonu: Reaksiyon başlangıcında konsantrasyon ne kadar fazla ise elde edilecek polimerik şebeke daha yoğun ve kırılğan olurlar. Konsantrasyon azaldıkça yapı süngerimsi ve elastik olur (Arvidsson vd. 2003; Arvidsson vd. 2002).

c) Kriyojelleşme sıcaklığı: Kriyojelleşme sıcaklığı düşürüldükçe işlemde kullanılan çözücünün katılması esnasında elde edilen kristallerin boyutu küçülür ve bu da polimerik şebekenin daha küçük gözenekli olmasıyla sonuçlanır. Kriyojelleşme sıcaklığının diğer bir etkisi ise gözenek duvarlarının kalınlığı üzerinedir: Kriyojelleşme sıcaklığı düşürüldükçe daha ince ve daha yoğun duvarlar elde edilir. Son olarak; bazı sıcaklıklarda süper soğuk duruma geçme riski olduğundan bu hususta göz önünde bulundurulmalıdır. Yani kriyojelin morfolojisini belirleme noktasında kriyojelleşme sıcaklığı önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. (Plieva vd. 2004).

Şunu da belirtmek gerekir ki kriyojelleşme işleminde kullanılan katalizöründe morfoloji üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Örneğin kriyojellerde kullanılan TEMED miktarının ayarlanması ile gözenek çaplarında değişiklikler meydana getirilebilir.

### **2.1.2 Monolitik kriyojellerin uygulama alanları**

Biyoteknoloji ve biyomedikal amaçlı kullanım için kriyojeller disk, silindir veya tabaka halinde çok çeşitli formlarda üretilebilirler. Malzemenin gözenekliliği %90'lara kadar çıktığı için immobilizasyon ve ayırma tekniklerinde tercih edilmektedir. Bakteri saflaştırması, çeşitli endotoksinlerin uzaklaştırması ve protein saflaştırması gibi farklı alanlarda kullanılmaktadırlar (Hanora vd. 2005; Kumar vd. 2006; Wang vd. 2008).

Kriyojeller, gözenek yapıları ve kullandıkları işlemler boyunca sergiledikleri kararlılık nedeniyle birçok uygulamalı bilim ve tıp alanlarında kullanılmaktadırlar. Biyotıp alanında temel olarak immobilize hücreler ve enzimlerle yapılan biyokatalizde, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisinde, partikül içeren akışkanlardan hedef moleküllerin ayrılması işleminde ve memeli hücre kültürleri için üç boyutlu matrisler olarak kullanılmaktadırlar (Plieva vd. 2007).

Makrogözenekli kriyojeller biyomedikal, biyoteknoloji ve eczacılık alanlarında ilgi görmüşlerdir (Chen vd. 1995). Kriyojellerin gözenek boyutları 10-200 µm aralığında değişim gösterebilmektedir. Bu özellikleri, biyolojik makromoleküllerle çalışılırken herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanılabilmelerine olanak sağlamaktadır (Arvidsson vd. 2002; Kumar vd. 2003).

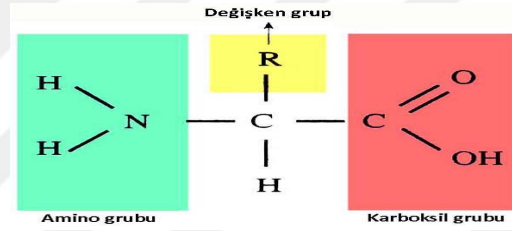
Kriyojeller sahip oldukları yapı nedeniyle kan hücrelerinin ayırımında afinite matrisi olarak, memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak, doku mühendisliğinde ve günlük hayatta filtre ve membran olarak kullanımlarıyla karşımıza çıkmaktadır.

Ayrıca; monolitik kriyojellerin başarılı bir şekilde kullandıkları alanlardan bir tanesi de kromatografidir. Özellikle son yıllarda farklı tip ligandlarla fonksiyonlandırılmış kriyojellerin iyon değişim kromatografisinden afinite kromatografisine kadar geniş bir yelpazede kullandıkları görülmektedir (Perçin vd. 2015). Bu çalışmalardan elde edilen sabit fazlar düşük geri basınç sergileyen kolonların üretilmesine olanak tanımış ve böylece yüksek akış hızlarında yüksek verimle çalışabilme olanağı sunmuşlardır. Ayrıca monolitik kriyojellerin kromatografik şartlarda molekül büyüklüğü yüksek olan türlerin

kolonda herhangi bir tıkanmaya yol açmadan geçmesine de olanak tanıdıkları bilinmektedir (Kumar ve Srivastava 2010).

## 2.2 Proteinler

Tüm canlıların en belirgin yapı taşları olarak karşımıza çıkan proteinler hücrelerde en çok kullanılan biyolojik makromoleküllerdir. Aminoasitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında birbirlerine kovalent bağlanmasıyla (peptid bağları ile) oluşmuş polipeptidlerdir. Kısaca, proteinler monomerleri aminoasitler olan polimerlerdir. Aminoasitlerde amino grubu, karboksile komşu C atomuna, yani  $\alpha$ -C atomuna bağlıdır. Her aminoasidin  $\alpha$ -C atomunda daima bir hidrojen atomu ve bir yan zincir (R) de bulunur (Şekil 2. 3)



Şekil 2. 3. Amino asit yapısı

Tüm proteinler, bakterilerden en kompleks canlılara kadar, var olan aynı 20 standart aminoasidin karakteristik doğrusal diziler halinde kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur. Aminoasitlerin yan zincirlerinin belirleyici kimyasal özelliklerinden dolayı bu 20 standart aminoasit, protein yapısının dilinin yazıldığı bir alfabe gibi düşünülebilir.

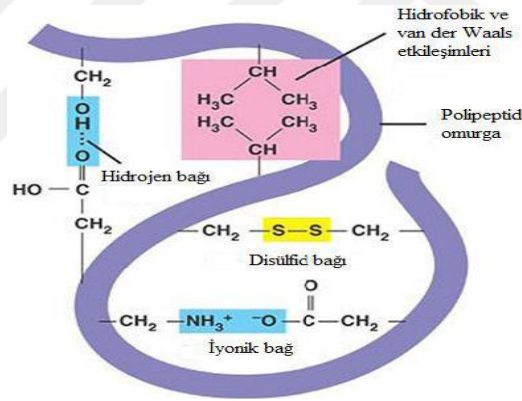
Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar. Tek bir hücrede bile binlerce farklı çeşitte ve büyüklüğü ufak peptidlerden, milyonlarca molekül ağırlığına sahip büyük polimerlere değişebilen proteinler bulunur. Bir bakteri hücresinde yaklaşık 4000 tür protein bulunmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Proteinler, biyolojik işlevlerde aşırı çeşitlilik gösterir ve birçok işlev görüp, yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Enzimler ve polipeptid hormonlar, metabolizmanın düzenlenmesinde önemlidirler. Kastaki kontraktıl proteinler hareketi sağlarlar. Kemikte kollajen, kalsiyum fosfat kristallerinin depolanmasını sağlar. Kanda albümin ve hemoglobin taşıma görevi alırken; immüno globülinler bakteri ve virüslerin yıkılmasında

görev alırlar. Canlıların yapılarında bulunan proteinlerin başlıca biyolojik fonksiyonları; enzimatik katalizleme, taşıma ve depolama, mekanik hareket, mekanik destek, sinir uyarılarının üretimi ve iletimi, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü, hormonlar ve bağışıklık şeklinde sıralanabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

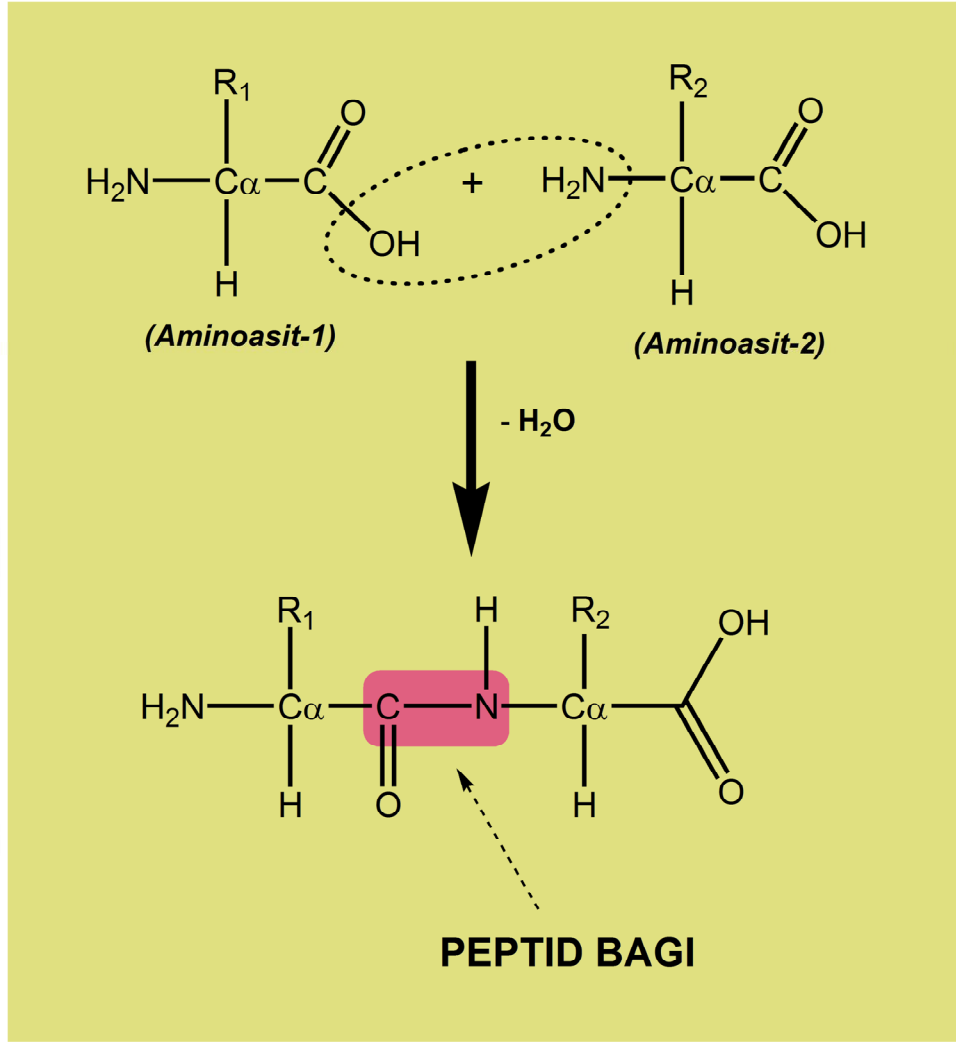
Proteinlerin %50'si karbon, %7'si hidrojen, %23'ü oksijen, %16'sı azot ve %0-3'ü kükürttten ibarettir. Bunların yanı sıra fosfor, demir, iyot, bakır, çinko ve mangan gibi bazı elementler de birtakım spesifik proteinlerde bulunur.

Proteinlerin yapılarında kovalent ve kovalent olmayan bağlar vardır. Proteinlerin yapılarındaki kovalent bağlar, peptid bağları ve disülfid bağlarıdır; kovalent olmayan bağlar ise hidrojen bağları, iyon bağları, dipol-dipol bağları, hidrofobik bağlar (apolar bağlar) ve Van der Waals etkileşimlerine dayanan bağlardır (Şekil 2. 4).



**Şekil 2. 4.** Bir polipeptidi stabilize eden bağlar  
(Kaynak: <http://alevelnotes.com/protein-structure>)

Peptid bağı, bir  $\alpha$ -aminoasidin  $-NH_2$  grubu ile bir başka  $\alpha$ -aminoasidin  $-COOH$  grubu arasından bir mol  $H_2O$  açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bağa denir. Peptid bağı bir çeşit amit bağıdır. Yan grupları  $R_1$  ve  $R_2$  olan iki aminoasit arasındaki peptid bağı oluşumu reaksiyonu aşağıdaki gibidir (Şekil 2. 5).

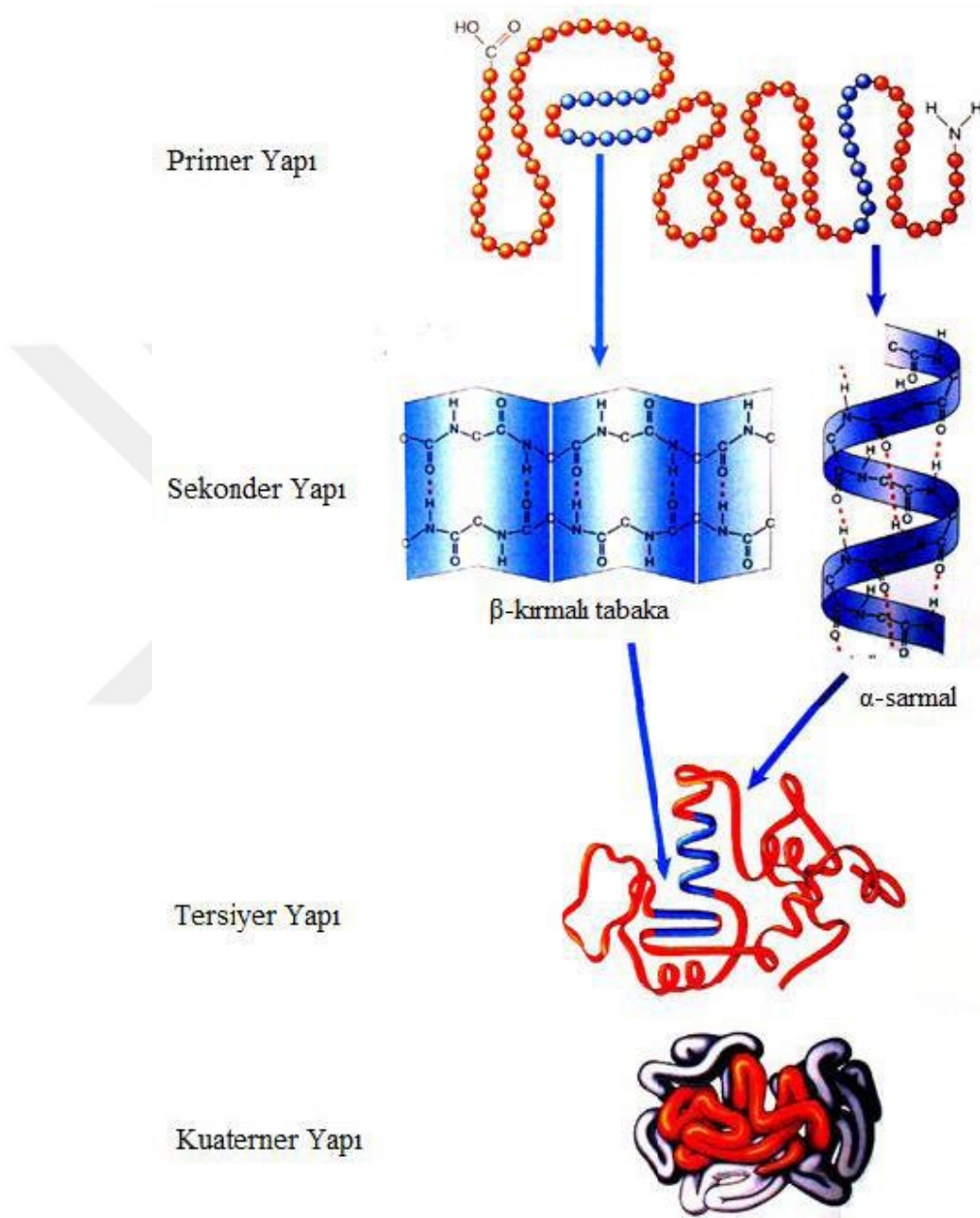


**Şekil 2. 5.** Bir peptid bağının oluşumu.

İki aminoasitten dipeptid, üç aminoasitten tripeptid, 10'a kadar olan aminoasitten oligopeptid, daha çok aminoasitten ise polipeptid meydana gelir. Proteinler, yüzlerce aminoasitten oluşan polipeptidlerdir. Bir peptid zincirini oluşturan aminoasitlerin her birisine rezidü (kalıntı) denir.

Proteinlerin yapısal organizasyonu dört şekilde tanımlanmıştır. Bunlar; primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapılarıdır (Şekil 2. 6). Kovalent bağlarla (başlıca peptid bağları ve disülfid bağları) bağlı polipeptid zinciri birincil (primer) yapıdır. İkincil (sekonder) yapıda ise aminoasit rezidüleri kısmen kararlı düzenlemelerle tekrarlayan yapısal modeller oluşturur. Üçüncül (tersiyer) yapı polipeptidin tüm üç boyutlu katlanmalarının bir görüntüsüdür. Bir protein iki veya daha

çok sayıda polipeptid alt birimi içerdiğinde uzaysal düzeni dördüncül (kuaterner) yapı olarak tanımlanır.



**Şekil 2. 6.** Proteinlerin yapısal organizasyonu (Keha ve Küfrevioğlu 2000)

Proteinler, konformasyon (fibröz ve globuler) ve bileşimlerine (basit ve bileşik) göre iki türlü sınıflandırılır. Fibröz proteinler suda ve seyreltik tuz çözeltilerinde çözünmeyen sert yapıda moleküllerdir. Yapılarındaki polipeptid zincirleri tek bir eksen boyu paralel düzenlenmiş ve uzun lifler veya tabakalar oluşturmuşlardır. Daha çok sert yapıyı

gerektiren veya koruyuculuk görevi yapan yerlerde bulunurlar. Mesela deri ve kemik kollajeni, tüy, tırnak, boynuz ve saç kreatini ve bağ dokusu elastini bu proteinlerdendir. Globular proteinler ise, polipeptid zincirinin birbiri üzerinde katlanıp sıkı bir yumak halini almasıyla ortaya çıkar. Bu tip proteinlerin çoğu sulu çözeltilerde çözünür ve kolayca difüze olurlar. Globular proteinler hücre içerisinde dinamik fonksiyonları yerine getirirler. Bugün bilinen enzimlerin çoğu, antikorlar, bazı hormonlar, serum albümin ve hemoglobin gibi taşıma görevi yapan proteinler hep globular yapıdadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Bazı proteinler ise hem fibröz hem de globular özelliklere sahiptir. Bu tip proteinler fibröz yapılarda olduğu gibi uzun çubuğumsu şekillere sahip iken, aynı globular proteinler gibi tuzlu çözeltilerde çözünürler. Keza önemli bir yapı elemanı olan miyozin ve kan pıhtılaşmasında fibrinin ön maddesi olan fibrinojen, bu çeşit proteinlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Basit proteinler, yapılarında yalnız  $\alpha$ -aminoasitleri bulunduran proteinlerdir. Bileşik proteinler ise biyolojik fonksiyonlarını yerine getirirken protein olmayan yapılara ihtiyaç gösteren ve bunlara bağlı proteinlerdir.

Birçok protein biyolojik aktivitelerini ve iş görebilme kapasitelerini belirli kimyasal ortamda, sınırlı pH ve sıcaklıkta sürdürebilir. Çok asidik ve bazik ortamlarda, yüksek sıcaklıklarda ve bazı kimyasal maddeler karşısında üç boyutlu yapılarında, yani fonksiyon gören tabiatlarında bir değişme olur. Bu olaya denatürasyon denir. Denatüre olan proteinin çözünürlüğünde belirgin bir azalma ve hatta çökme olur. Birçok protein 50-60 °C'nin yukarısında, bazıları 10-15 °C'nin altında denatürasyona uğrar. Bazı proteinler denatürasyondan sonra, bu olayı meydana getiren şartların ortadan kaldırılmasıyla, tekrar eski tabii hallerine kavuşabilmekte ve biyolojik aktivitelerini yeniden kazanabilmektedirler. Bu tip denatürasyonlar dönüşümlü değişimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Her türlü organizma kendisine has proteinlere sahip olduğu gibi, her hücre tipi de binlerce değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli bir pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı proteinin saf şekilde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu, güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen birçok protein saf olarak elde edilebilmiştir. Proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanarak onların saflaştırılması yapılmaktadır. Bu

özellikler; moleköl büyüklüğü, çözünürlük, elektriksel yük, adsorpsiyon davranışlarındaki farklılıklar ve diğer moleküllere karşı biyolojik afiniteleridir.

Protein ayırma ve saflaştırma işlemlerinde en yaygın kullanılan ve katı-sıvı ara yüzeylerindeki etkileşmelere dayanan yöntem hiç kuşkusuz kromatografik yöntemlerdir. Bu amaçla, monolitik katı/sabit fazların yaygın bir kullanım alanı bulunduğu görölmektedir. Özellikle kriyojel esaslı monolitik malzemelerin proteinlerin bu tarz işlemlerinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir.

### 2.3 Kromatografi

Kromatografi, karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir metottur. Kromatografi yüzyılımızın başlarında Rus botanikçisi Mikhail Tswett, tarafından bulunmuştur. Tswett, çözeltileri ince boyutta kalsiyum karbonat içeren bir kolondan geçirerek klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerini ayırmak için bu tekniği kullanmıştır. Ayrılmış türler kolonda renkli bantlar halinde görüldükleri için, Yunanca renk anlamına gelen '*chroma*' ve yazmak anlamına gelen '*graphein*' sözcüklerini birleştirerek metoda kromatografi adını vermiştir. Kromatografik yöntemlerde durgun faz ve hareketli faz olmak üzere iki tür faz vardır. Karışımdaki bileşenler, akış halindeki gaz veya sıvı bir fazla birlikte, durgun faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma gerçekleşir (Skoog vd. 2014).

Kromatografik yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür (Skoog vd. 2014):

a) Ayırma mekanizmalarına göre

- İyon değişim kromatografisi,
- Jel filtrasyon kromatografisi,
- Adsorpsiyon kromatografisi,
- Partisyon kromatografisi,
- Afinite kromatografisi

b) Ayırıcı materyale göre

i) Düzlemsel kromatografi

- İnce tabaka kromatografisi
- Kağıt kromatografisi

ii) Kolon kromatografisi

- Gaz kromatografisi (GC)
- Sıvı kromatografisi (LC)
- Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC)

Kromatografik teknikler arasında en çok kullanım alanı bulmuş olanı hiç kuşkusuz yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). Kolon şartlarında yürütülen klasik sıvı kromatografisinde çapı ve uzunluğu sırasıyla 1-5 cm ve 50-500 cm aralığında değişen kolonlar kullanılmış ve hareketli faz bu kolonlardan yerçekiminin etkisiyle geçirilmiştir. Bu şartlarda uygun akış hızları sağlamak amacıyla sabit fazın tanecik boyutu görece büyük (150-200 µm) tutulmuştur. Fakat bu şartlarda bile çalışılabilen akış hızlarının çok düşük olduğu görülmüştür. Vakum veya basınç sistemleri kullanılarak akış hızları arttırılmıştır, fakat bu sefer de yüksek akış hızlarında teorik tabaka sayısının azalması nedeniyle kolon verimliliğinde önemli düşüşler gözlenmiştir. Kromatografiyle ilgilenen araştırmacılar, yüksek kolon verimliliği elde etmek amacıyla sabit fazın parçacık ebadının düşürülmesi gerektiğini anlamıştır. Düşük parçacık ebadına sahip kolonlardan hareketli fazı yüksek akış hızlarıyla geçirebilmek için de yüksek basınçlarda çalışmayı mümkün kılan özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmuştur (Skoog vd. 2014).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); sıvı haldeki hareketli fazın kromatografik kolonda yer alan sabit faz üzerinden yüksek akışlarda geçirilebilmesini mümkün kılan özel teçhizatların bulunduğu bir kromatografik teknik olup, günümüzde hem analitik hem de preparatif amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. HPLC'de yaygın kullanım alanı bulan uygulamalardan bazıları dağılma kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi, iyon-değiştirme kromatografisi, ligand değiştirme kromatografisi ve boyut eleme kromatografisidir.

İyon-değiştirme; aynı yüke sahip iyonların sabit faz ve onunla temas halinde olan hareketli faz arasında tersinir bir Őekilde yer değiştirmesi olarak tanımlanır. İyon değiştiricinin iyonları tutma gücü, birçok parametrenin fonksiyonudur. Bunlar pH, iyon yükü, iyon yarıçapı, rećinenin gözenekliliği, çözücü ve sıcaklıktır.

Kimyasal zelliklerine göre iyon değiştiriciler inorganik ve organik olmak üzere 2 grupta incelenebilir. İnorganik iyon değiştiricilerden en çok bilinenler zeolitlerdir. Genel olarak  $\text{Na}_2\text{Al}_2\text{SiO}_2$ , formülünde gösterilirler. Zeolitler yapılarında bulunan sodyum iyonlarını  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  gibi iyonlarla değiştirme özelliğine sahip olan maddelerdir. Organik iyon değiştiriciler (rećineler) suda ve birçok organik çözücülerde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü polimer maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem de katyon değiştirmede ve hatta sećici iyon değiştirmede kullanılırlar.

İyon değişim kromatografisi, HPLC'nin en çok kullanılan Őekillerinden biri olup protein ayırma ve saflaştırma işlemlerinde sunduğu verimli ve ucuz yaklaşımlar nedeniyle tercih edilmektedir. Protein kromatografisinde iyon değişiminin en büyük avantajlarından biri ise proteinleri denatüre etmeden saflaştırabilme olanağı sunmasıdır. Dięer HPLC türlerinde olduğu gibi iyon değişim kromatografisinde de verimi belirleyen en önemli parametre kullanılan sabit fazdır. Yüksek kapasite, sećicilik, kimyasal ve mekanik dayanım ve proteinlerle tersinir bir Őekilde etkileŐebilme iyon değiştirici sabit fazlarda aranan belli başlı özelliklerdendir.

Silika esaslı materyaller HPLC ile yapılan işlemlerde en çok kullanılan sabit faz tipleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun nedeni silikanın yüksek mekanik dayanımı ve yüzey modifikasyonlarına uygun bir özellik sergilemesidir. Bununla birlikte silika esaslı materyallerin pH=8 'in üzerinde ve pH=2'nin altında hidroliz olabilme özelliği bu malzemelerin kimyasal dayanımlarının düşük olmasıyla sonuçlanmaktadır. Özellikle protein saflaştırma işlemlerinde bazen 1 M NaOH zeltisi kullanılarak sabit fazın temizlenmesi gerektiğinden silika esaslı sabit fazlar bu anlamda protein iyon değişim kromatografisi için uygun bir yapı sergilememektedirler. Bu nedenle kimyasal dayanımları daha yüksek olan polimerik sabit fazlara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Protein iyon-değişim kromatografisinde en önemli kısıtlamalar kütle transfer direnci ve yüksek geri basınçtır. Bunlardan ilki düşük verime ikincisi ise sabit fazın bozulmasına

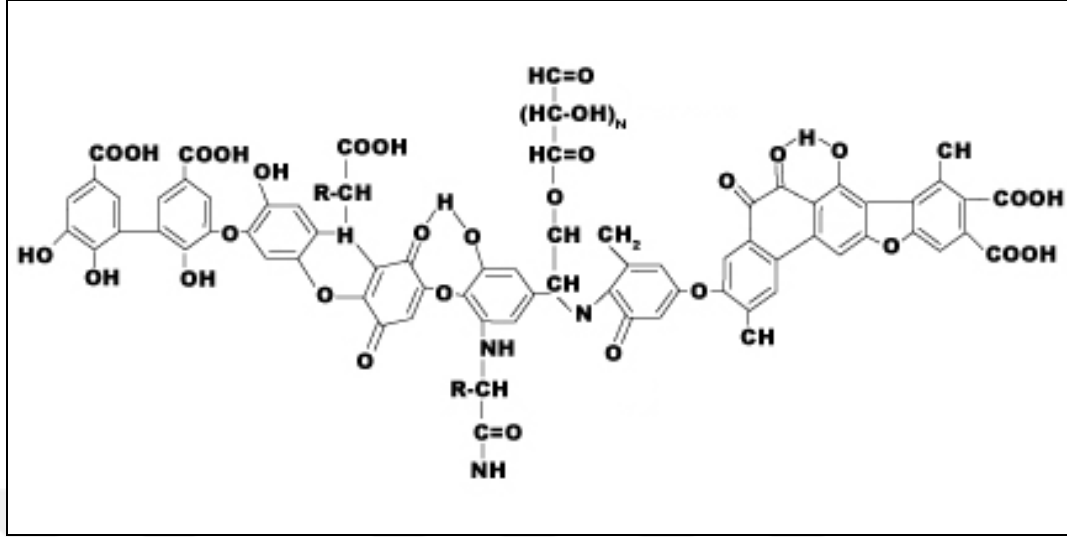
yol açar. Diğer taraftan monolitik sabit fazlarla çalışıldığında bu kısıtlamalar büyük oranda bertaraf edilebilir.

Proteinlerin yüksek molekül ağırlıkları ve dolayısıyla yüksek moleküler büyüklükleri nedeniyle gözenek çapı 20 µm veya daha yüksek olan sabit fazlar ile çalışmak gerekmektedir. Bu şartları sağlayan monolitik kriyojeller özellikle son yıllarda hem afinite kromatografisinde hem de iyon değişim kromatografisinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. İyon değiştirici monolitik sabit fazlar elde etmek için kullanılacak monomer sayısının kısıtlı olması nedeniyle immobilizasyon, atom transfer radikal polimerleştirme (ATRP) ve yüze aşılama (*grafting*) kullanılan yöntemlerdendir (Perçin vd. 2015). Kullanılan kimyasal miktarının fazla olması ve diğer çevresel nedenlerden dolayı yüzeyinde iyon değiştirici gruplar içeren ve doğal olarak oluşmuş biyomakromoleküllerin doğrudan kriyojelleştirilip monolitik sabit fazlara dönüştürülmesi fikri ilginç bulunmuştur. Yeryüzündeki organik maddelerin büyük bir kısmını oluşturan hümik maddelerin bu anlamda alternatif çözümler sunabileceği düşünülmektedir.

## 2.4 Hümik Maddeler

Hümik maddeler doğadaki organik maddelerin önemli bir kısmını teşkil eder ve çoğunlukla bitkisel kaynaklıdır. Toprak ve su kaynaklı hümik maddelerin olduğu bilinmektedir (Tipping 2004). Hümik maddeler için genel bir tanım vermek güç olmakla beraber aşağıdaki sınıflandırma temelinde tanımlamalar yapmak mümkündür:

- a) Fulvik Asit: Tüm pH değerlerinde çözünen fraksiyondur.
- b) Hümik Asit: pH>3'te çözünmeye başlayan ve pH=7'de büyük oranda çözünmüş olan fraksiyondur. Hümik asit için önerilen bir moleküler yapı Şekil 2. 7'da verilmiştir.
- c) Hümin: Tüm pH değerlerinde suda çözünmeyen fraksiyondur.



**Şekil 2. 7.** Hümik asidin moleküler yapısı (Stevenson 1994)

Hümik asit için polimerlerde olduğu gibi kapalı bir kimyasal formülden bahsetmek mümkün olamamakla beraber, makromoleküler yapıdaki fonksiyonel grupların büyük bir kısmı bilinmektedir. Bu bilgiler, hümik asidin etkileşme tiplerini yorumlama noktasında büyük kolaylık sağlar.

#### 2.4.1 Katı-sabit faz olarak hümik asit

HA'nın farklı tip türlerle etkileşebilme özelliği, katı/sabit faz olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Fakat, HA'nın sulu ortamda çözünebilme özelliği bu noktada engel teşkil etmiştir. Buna ilaveten, parçacık ebadının ayarlanmasında karşılaşılan birtakım güçlüklerin bulunduğu da bilinmektedir (Gezici vd. 2005).

Bu tarz kısıtlamaları bertaraf edebilmek amacıyla literatürde aşağıda belirtilen bazı yöntemler önerilmiştir:

- a) Çözünürsüzleştirme (*Insolubilization*)
- b) İmmobilizasyon (*Immobilization*)
- c) Polikondensasyon (*Polycondensation*)

Çözünürsüzleştirmede; katı hümik asit 330 °C'ta 1,0 saat süreyle ısıtılıp işleme tâbi tutulur ve ısıнын etkisiyle yapıda meydana gelen bazı değişikliklerin bir sonucu olarak düşük çözünme özelliği sergileyen bir şekle dönüştürülür (Seki ve Suzuki 1995).

İmmobilizasyonda ise; hümik asit, uygun bir katı destek maddesine fiziksel ve/veya kimyasal etkileşmelerle tutturulur. Katı destek maddesi olarak genellikle yüzeyi uygun fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş silika ve bazı polimerik maddeler kullanılmaktadır. Yapısal özelliklerinin iyi bir şekilde kontrol edilebilmesi, sergilediği yüksek mekanik dayanım ve kimyasal kararlılık nedeniyle silika, kromatografik işlemlerde tercih edilen bir katı destek maddesidir (Gezici ve Kara 2011a).

Hümik asidin çözünmeyen bir şekle dönüştürülmesi amacıyla kullanılan diğer bir yöntemde ise hümik asit; formaldehit (ve bazen fenolik bir bileşik) ile etkileştirilerek bir dizi polikondensasyon reaksiyonuna tâbi tutulur ve böylece çözünmeyen bir yapıya dönüştürülür (Klavins ve Eglte 2002).

Bu çalışmada; hümik asidin çözünme özelliği daha düşük olan yeni bir şekle dönüştürülmesi ve elde edilen malzemenin ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılabilirliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla klasik immobilizasyon yöntemlerinden farklı olarak, uygun monomerlerin varlığında hümik asidin kriyojel adı verilen monolitik malzemelerin polimer matriksine hapsedilmesi esasına dayanan bir yöntem önerilmiştir. Elde edilen kompozit monolitik sabit fazın protein iyon değişim kromatografisinde kullanılabilirliği incelenmiştir.

## **2.5 Literatür Özeti**

Doğal olarak oluşan makromoleküllerden olan hümik asidin (HA) sahip olduğu moleküler yapı, geniş bir spektrumda farklı tip kimyasal ve biyolojik öneme sahip türlerle etkileşmesine yol açmaktadır. Bu durum, katı-sıvı ara-yüzeylerindeki etkileşmelere dayanan ayırma ve saflaştırma yöntemleri için alternatif, ucuz ve verimli sabit fazların tasarlanması fikrini oluşturmuştur. Bu kapsamda literatürde, metal iyonlarından proteinlere kadar farklı tip türlerin adsorpsiyonunda ve kromatografik saflaştırmalarında HA esaslı çeşitli adsorban/sabit fazların kullanıldığı görülmektedir (Bayrakci vd. 2014; Gezici vd. 2007a; Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b).

HA'nın ayırma ortamı olarak kullanılması fikrinin önündeki en büyük engel hiç kuşkusuz sulu ortamda 3'ten büyük pH değerlerinde çözünebilme riski olmuştur. Belirtilen kısıtlamayı gidermek için literatürde çeşitli metodolojiler önerilmiş ve farklı

özelliklere sahip HA-esaslı sabit fazlar çalışılmıştır (Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b).

Seki ve Suzuki (Seki ve Suzuki 1995), HA'nın çözünme özelliğini azaltıp metal iyonlarının adsorpsiyonunda kullanılabilir verimli bir malzemeye dönüştürebilmek amacıyla katı HA'nın 330 °C'de 1 saat süreyle ısıtılmasına dayanan bir yöntem önermiştir. Çözünürsüzleştirme (*Insolubilization*) adı verilen bu yöntemle HA'daki –COOH gruplarının yaklaşık %25'i ısıtma işlemi neticesinde yapıdan uzaklaştırılmış ve HA, sulu ortamda pH 10'a kadar çözünmeyen bir şekilde dönüştürülmüştür. Elde edilen materyal, bazı metal iyonlarının adsorpsiyonunda kullanım alanı bulmuştur (Baker ve Khalili 2004; Bigalke vd. 2010; Celebi ve Erten 2010; Gezici vd. 2007a; Gezici vd. 2007b; Gezici vd. 2005).

HA esaslı adsorban/sabit fazların eldesi için önerilen en etkili yöntemlerden bir tanesi de, HA'nın uygun bir destek katısına bağlanmasına dayanan “immobilizasyon”dur (*Immobilization*). Bu yöntemde, HA reaktif gruplar içeren bir destek katısına güçlü etkileşimler üzerinden tutuklanır. Literatürde, silika esaslı destek katılarından polimerik destek katılarına kadar farklı özelliklerde materyallerin bu amaçla kullanıldığı görülmektedir (Bulman vd. 1998; Guzzi vd. 1992; Koopal vd. 1998; Szabo vd. 1990). HA immobilize edilmiş aminopropil silikanın ise bazı nükleosit ve nükleobazların kromatografik ayrılmalarında kullanılabilirliği incelenmiş ve önerilen sabit fazın RPLC (ters faz sıvı kromatografisi), HILIC (hidrofilik etkileşme kromatografisi) ve LEC (ligand-değişim kromatografisi) olmak üzere 3 farklı HPLC modunda sabit faz olarak kullanılabildiği görülmüştür (Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b).

Bir diğer çalışmada ise, aminopropil silikaya immobilize edilmiş HA, normal faz kromatografik şartlarda, yağlardaki tokoferollerin ayrılmasında sabit faz olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Ayyıldız 2015).

Son zamanlarda HA-esaslı materyallerin nanoskopik adsorbanların sentezinde de kullanıldığı anlaşılmaktadır. Örneğin, HA immobilize edilmiş manyetit nanopartiküllerin insan serum albüminini güçlü bir şekilde adsorbe ettiği tespit edilmiştir (Bayrakci vd. 2014).

Kısa bir süre önce yapılan bir diğer çalışmada ise, HA, poliakrilonitril nanofiberlerine elektrospining işlemi esnasında başarılı bir şekilde immobilize edilmiş ve elde edilen nanofiberlerin katyonik boyaya (kristal viyole) karşı yüksek düzeyde kapasite sergilediği anlaşılmıştır (Gezici vd. 2016).

HA'nın adsorban/sabit faz olarak kullanıldığı çalışmalarda, elde edilen materyallerin partikül esaslı olduğu ve dolayısıyla HA-esaslı monolitik katı/sabit fazlarla ilgili çalışmaların neredeyse hiç bulunmadığı görülmektedir. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada (Sargın vd. 2016), HA'nın metakrilat esaslı monolitik malzemeye immobilize edilmesi çalışılmıştır. Belirtilen çalışmada, HA monolitik polimere Cu(II) iyonları aracılığıyla immobilize edilmiş ve BSA (sığır serum albümini) adsorpsiyonunda adsorban olarak kullanılmıştır. Fakat adı geçen çalışmada, HA kriyojel yapısına Cu(II) iyonları yardımıyla immobilize edilmiş ve Cu(II) iyonları olmaksızın hidrolitik stabilitesi yüksek bir ürün elde edilememiştir.

Sunulan bu çalışmada ise, HA'nın doğrudan monolitik şebekeye kimyasal bağ yoluyla immobilize edilmesi ve dahası, immobilizasyon işleminin kriyojelleşme aşamasında gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen materyalin hem lineer hem de lineer olmayan kromatografik şartlarda sergilediği sabit faz özellikleri kapsamlı bir incelemeye tabi tutulmuş ve bu anlamda, HA-esaslı bir sabit fazın protein iyon-değişim kromatografisinde kullanılabilirliği ilk defa kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda (Sargın vd. 2016) elde edilen HA içerikli kriyojellerde gözlenen çözünme problemi bu çalışmada tamamen giderilmiş ve yüksek hidrolitik dayanıma sahip bir kriyojel elde edilmiştir.

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Çalışmalar süresince, ticari olarak temin edilebilen Aldrich hümkik asit (Aldrich) ön-saflaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra kullanılmıştır. Katı NaOH (Sigma) ve %37'lik HCl'den (Merck) hazırlanan sulu çözeltiler kullanılarak hümkik madde eldesi/saflaştırılması ve pH ayarlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kriyojel eldesinde monomer olarak HEMA (2-Hidroksietilmetakrilat; Sigma) ve çapraz bağlayıcı olarak da MBAAm (N,N'-Metilenbisakrilamit; Sigma) kullanılmıştır. APS (Amonyum persülfat; Sigma) ve TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletan-1,2-diamin; Sigma) sırasıyla radikal başlatıcı ve katalizör olarak kullanılmıştır. %10'luk etil alkol (Sigma) çözeltisi elde edilen kriyojellerin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Tüm deneysel işlemler süresince ultrasaf su kullanılmıştır. Kromatografik analizler süresince kullanılan tamponları hazırlamak için  $K_2HPO_4$  (Potasyum monohidrojenfosfat; Sigma) ve  $KH_2PO_4$  (Potasyum dihidrojenfosfat; Sigma) kullanılmıştır. Hareketli faz iyon şiddetini ayarlamak için ise NaCl katısından (Sigma) hazırlanmış 0,5 M veya 1,0 M'lık çözeltiler kullanılmıştır. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmıştır. Çözeltiler kullanılmadan önce 0,45  $\mu m$ 'lik selüloz asetat filtrelerden (Sartorius) süzülmüştür.

#### 3.2 Protein Örnekleri

Deneysel süreçte kullanılan model proteinler hazır olarak satın alınmış ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır. Kullanılan proteinler ve elde edildikleri kaynaklar aşağıda verilmiştir:

- Lisozim: Yumurta akı (Fluka; Tavuk)
- $\alpha$ -kimotripsinojen a (Sığır pankreası; Sigma)
- Sitokrom c (Domuz kalbi; BioChemica)
- Serum albümin (İnsan; Sigma)

Protein çözeltilerini hazırlamak için ilgili pH (5,0-7,0) değerindeki 20 mM'lık fosfat tamponları çözücü olarak kullanılmıştır. Hazırlanan numuneler (5 mg/mL) 0,2  $\mu m$ 'lik

şırınga ucu filtrelerden (selüloz asetat; Sartorius™) süzülüp 4 C’de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

### **3.3 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar**

Elemental analiz, FTIR spektroskopisi ve cıva porozimetresi analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Araştırma Laboratuvarı’na yaptırılmış olup; C, H, N ve S elementlerinin hazırlanan monolitlerdeki yüzde içerikleri LECO, CHNS-932 marka/model cihaz ile belirlenmiştir. Fourier Dönüşümlü İnfrared spektroskopisi analizleri (FTIR), ATR-FTIR tekniği ile elmas kristal kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Perkin-Elmer 400 marka/model cihaz kullanılmış ve spektrumlar  $4\text{ cm}^{-1}$ ’lik çözünürlükle kaydedilmiştir. Sentezlenen monolitik kriyojellerin gözenek boyutlarını analiz etmek için cıva porozimetresi tekniği kullanılmıştır. Cıva porozimetresi ölçümleri düşük basınçta (0–50 psi) gerçekleştirilmiş ve bu amaçla Poremaster 60 (Quantachrome Corporation) marka/model cihaz kullanılmıştır. Monolitlerin mikro yapısını analiz etmek için Zeiss Evo Basic model SEM cihazı kullanılmış olup görüntüler numuneler platin ile kaplandıktan sonra alınmıştır ( $1,32 \times 10^{-2}$  Pa vakum altında). pH ölçümleri, Mettler-Toledo marka kombine pH elektrotu ve pH metresi ile gerçekleştirilmiştir. Monolitik kriyojellerin sentezinde, yerli üretim polimerik kolonlar kullanılmıştır (5,0x120 mm; iç çap ve uzunluk). Kriyojelleşme işlemi, Uğur marka derin dondurucu buzdolabı kullanılarak yapılmıştır.

Kromatografik analizler süresince Agilent 1260 model 4’lü pompa, degazör, otomatik enjeksiyon sistemi, numune soğutucu, kolon fırını ve UV-VIS detektörden oluşan bir HPLC cihazı kullanılmıştır. Sinyaller Chemstation yazılımı ile kaydedilip işlenmiştir.

UV-Vis. Spektrofotometrik analizlerde ise PG Instruments T80 marka/model cihaz kullanılmış ve analizler kuvarz küvetler ile yürütülmüştür.

Tüm işlemler süresince Human marka cihazdan elde edilen ultrasaf su kullanılmıştır.

### **3.4 Hümik Asidin Saflaştırılması**

Ticari olarak temin edilen Aldrich hümik asit alkalide çözünmeyen safsızlıklar içerebildiği için alkalide çözme ve ardından asitle çöktürme işlemi uygulanarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 2 g hümik asit 1,0 L 0,1 M NaOH çözeltisine ilave

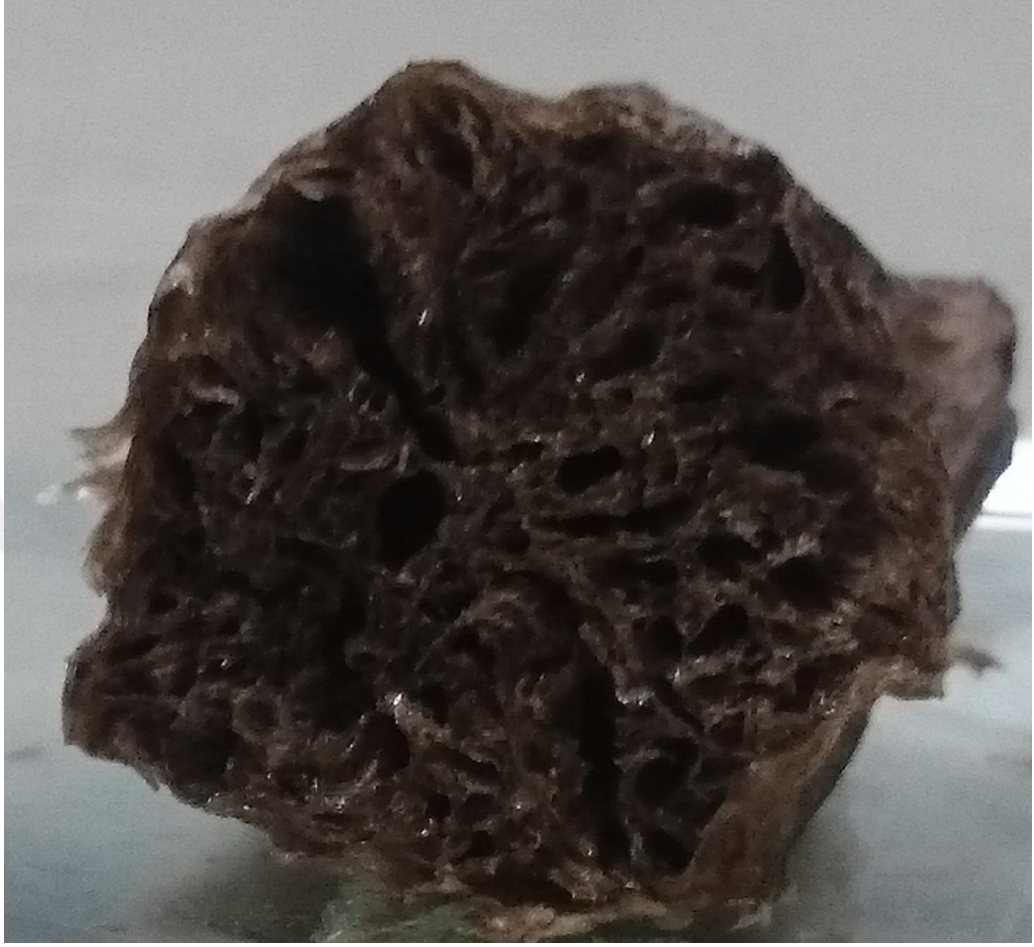
edilerek 1,0 saat süreyle bir manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 4000 dev/dak'da 10 dakika süreyle santrifüjlenerek çözünmeyen katılar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra süzünüye pH=2 oluncaya kadar yavaş yavaş 1,0 M HCl çözeltisi ilave edilerek (kuvvetli bir şekilde karıştırarak) siyah yumaklar halinde hümkik makromoleküller çöktürülmüştür. Karışım 24 saat süreyle bekletildikten sonra santrifüjlenerek katı hümkik asit elde edilmiş ve berrak çözelti elde edilene kadar da 0,05 M HCl çözeltisi ile yıkama işlemi yapılmıştır. Katı hümkik asit kurutulup desikatörde saklanmıştır.

### 3.5 Kriyojel Sentezi

PHEMA-HA sentezinde bir dizi farklı stratejinin uygulanabilirliği incelenmiş ve elde edilen verilerden amaca uygun sentez yöntemi belirlenmiştir. İzlenen yöntemleri 2 kategoride sınıflandırmak mümkündür:

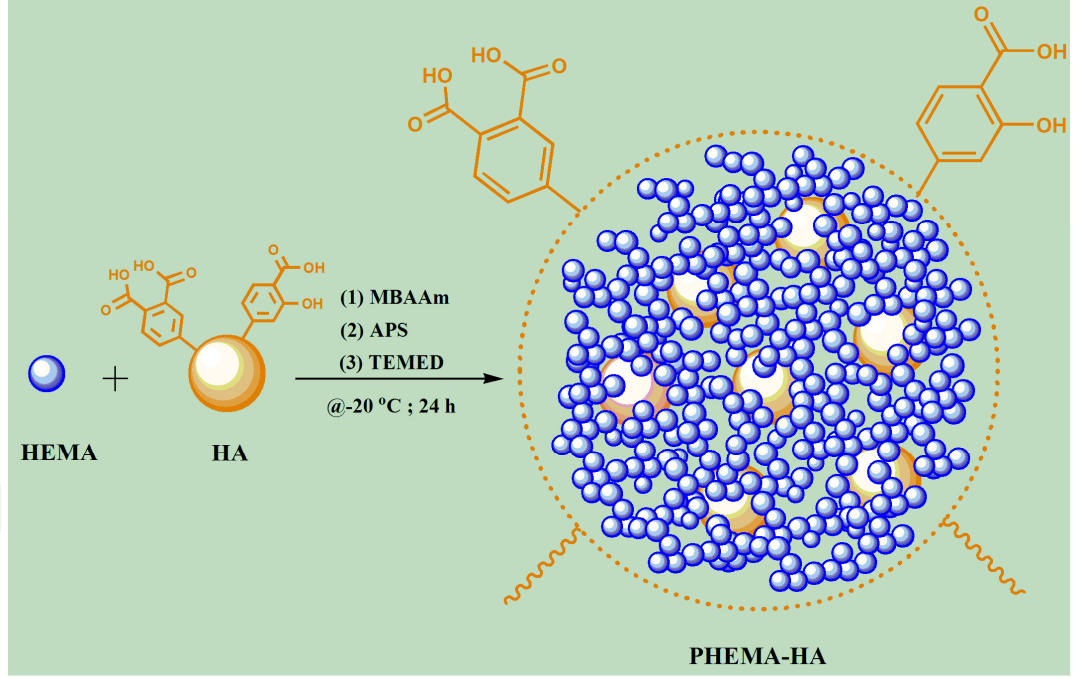
- a) HA çözeltisinin monomer karışımına ilavesi,
- b) Katı HA'nın monomer karışımına ilavesi.

*Birinci yöntemde*, 0,05 g HA 0,01 M NaOH çözeltisinde çözündürülmüş ve ardından 0,01 M HCl ilavesi ile HA çözeltisinin pH değeri 7'ye ayarlanmıştır. Bu çözelti, HEMA ve MBAAm içeren karışıma APS ve TEMED ilavesinden sonra ilave edilmiştir. Burada, deneysel parametre olarak, a) ortama ilave edilen TEMED miktarının etkisi ve b) ortama ilave edilen HA çözeltisinin miktarının etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla, ortama 20, 40 ve 75 µL olacak şekilde farklı oranlarda katalizör ilave edilmiştir. Yukarıda belirtilen HA çözeltisinden ise 1,0; 2,5 ve 5,0 mL olacak şekilde monomer karışımına HA ilaveleri gerçekleştirilmiştir. Farklı şartlarda elde edilen monolitik malzemelerin protein tutma özellikleri incelendiğinde, bu şekilde elde edilen PHEMA-HA'ların çok büyük gözeneklere sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, proteinlerin gözeneklerden herhangi bir etkileşmeye uğramadan yol almalarıyla sonuçlanmıştır. Nitekim bu yöntemle elde edilen PHEMA-HA'ların gözenek büyüklüklerinin gözle görülür düzeyde büyük olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3. 1). Ayrıca, bu şekilde elde edilen PHEMA-HA'ların düşük hidrolitik dayanım ve ayrıca yüksek düzeyde şişme sergiledikleri de görülmüştür.



**Şekil 3. 1.** Yöntem-1 ile elde edilen kurutulmuş PHEMA-HA'nın fotoğrafı

*İkinci yöntem ise*, katı HA'nın monomer çözeltisine en son ilave edilmesi esasına dayanmaktadır. Burada, yaklaşık 1,0 dakika kadarlık kısa bir sürede çözünebilen hümitik madde fraksiyonlarının bir tür makromoleküler seçicilik temelinde kriyojel yapısına katılması esas alınmıştır. Elde edilen monolitlerin, birinci yöntemle elde edilenlere kıyasla daha uygun bir morfolojiye sahip olduğu görülmüş ve bu nedenle deneysel çalışmalarda ikinci yöntemin izlenmesine karar verilmiştir. Buna göre; degaze edilmiş 2,0 ml ultrasaf suya monolitik kriyojelin ana iskeletini meydana getirecek monomer olan HEMA'dan 0,6 mL eklendi ve ağzı kapatılarak manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırıldı. Başka bir behere alınan 8,0 mL degaze suya ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 0,10 g MBAAm eklendi ve ağzı kapatılıp manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırıldı. Elde edilen iki karışım birbirine eklenerek buz banyosunda 10 dakika karıştırıldı. Karışıma, 0,02 g APS (radikal başlatıcı) eklendi ve buz banyosunda çözününceye kadar karıştırıldı. Son olarak, karışıma 40 µL TEMED (katalizör) ilave edildi ve 1 dakika buz banyosunda karıştırıldıktan sonra karışımdan alınan 4 ml'lik kısım buz içerisinde bekletilen kolona ve viallere aktarıldı (PHEMA). Geriye kalan 6 ml'lik karışıma 0,06 g saflaştırılmış HA eklendi ve 1,0 dakika kadar karıştırıldıktan sonra buzda bekletilen kolon ve viallere aktarıldı (PHEMA-HA). Kolonlar ve vialler hemen -20 °C'de derin dondurucuya alınarak burada 24 saat süreyle bekletildi. Belirtilen süre sonunda oda sıcaklığına alınan kolon ve viallerdeki buzun kendi halinde erimesi sağlandı. Su ve etil alkol ile yıkanan monolitler daha sonra 1,0 M NaCl çözeltisinde hazırlanmış  $1 \times 10^{-3}$  M NaOH ile yıkandı. Son olarak bol miktarda ultra saf su ile yıkanan kolonlar kromatografik işlemlerde ve karakterizasyonda kullanılmak üzere hazırlanmış oldu. PHEMA-HA sentezi için temsili şema Şekil 3.2'de verilmiş olup elde edilen monolitlerin fotoğrafları da Şekil 3. 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. 2. Saflaştırılmış HA'nın immobilizasyon mekanizması



**Şekil 3. 3.** PHEMA (sol alt) ve PHEMA-HA (sağ üst) için fotoğraflar

### 3.6 Karakterizasyon

Kriyojelleşme işlemi sonunda elde edilen materyal hakkında fikir edinmek ve işleminin verimliliğini değerlendirmek amacıyla; elde edilen Kriyojeller aşağıdaki yöntem ve tekniklerle karakterize edilmiştir:

- a) Elemental analiz
- b) FTIR spektroskopisi
- c) Cıva porozimetresi
- d) SEM
- e)  $pH_{pzc}$  tayini
- f) Monolit için toplam boş fraksiyon tayini
- g) Hidrolitik dayanım

#### 3.6.1 Elemental analiz

DeneySEL süreçte kullanılan saflaştırılmış HA, PHEMA ve PHEMA-HA'nın C, H, N ve S elementleri bakımından elemental bileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla kurutulmuş numuneler kullanılmış olup, sonuçlar kuru madde temelinde verilmiştir. Elemental analiz sonuçlarından, kriyojel yapısına dâhil olan HA miktarı da hesaplanmış olup, veriler, 2 tekrar analizinin ortalaması olarak verilmiştir.

#### 3.6.2 FTIR spektroskopisi

FTIR analizleri Perkin-Elmer® 400 model ATR-FTIR (*Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) cihazı ile  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  aralığında  $4\text{ cm}^{-1}$ 'lik bir rezolüsyon ile kaydedilmiştir. Bu amaçla, kurutulmuş PHEMA ve PHEMA-HA örnekleri ATR-FTIR spektroskopisi cihazı ile analiz edilmiş ve spektrumlar  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  frekans aralığında kaydedilmiştir. Spektrumların karşılaştırılmasıyla, PHEMA-HA eldesine dair işlemin verimliliği değerlendirilmiştir.

#### 3.6.3 Hidrolitik stabilite testleri

Bir sabit fazda aranan en önemli özelliklerden bir tanesi, çalışılan dENEYSSEL şartlarda herhangi bir çözünme özelliği sergilememesidir. Bu amaçla, sulu ortamda  $pH=11$ 'de 72 saat süreyle bekletilen PHEMA-HA süzöldü ve süzöntü spektrofotometrik olarak analiz

edildi (410 nm). Belirtilen süre sonunda elde edilen çözelti PG Instrument T80 marka UV-Vis cihazı ile analiz edilmiş ve böylece HA çözünmesine dair bulgular değerlendirilmiştir.

#### **3.6.4 $pH_{pzc}$ (Sıfır yük noktasına karşılık gelen pH) tayini**

Kriyojellerin izoelektrik noktası tayini için PHEMA ve PHEMA-HA kullanıldı. İşlemler 0,01 M'lık NaCl çözeltisi kullanılarak yürütüldü ve böylece veriler iyonik şiddetin sabitlendiği şartlarda elde edilmiş oldu. Bu amaçla,  $pH=2,0-7,0$  aralığında pH değerlerine sahip yaklaşık 15 mL 0,01 M NaCl çözeltilerine eşit miktarlarda PHEMA veya PHEMA-HA katıldı ve 24 saat sonra karışımın pH değeri tekrar ölçüldü. pH değerlerindeki farklılaşmadan,  $pH_{pzc}$  değerleri hem PHEMA hem de PHEMA-HA için grafik temelinde hesaplandı. Bunun için,  $\Delta pH$ 'a ( $pH_{son}-pH_{ilk}$ ) karşı  $pH_{ilk}$  grafiğe geçirildi ve veri noktalarının dağılımı polinomal eğri uyumu temelinde analiz edilip eksen kesim noktası  $pH_{pzc}$  olarak alındı.

#### **3.6.5 Cıva porozimetresi**

Cıvalı porozimetreler, reaksiyona girmeyen ve ıslatma özelliğine sahip olmayan bir sıvının uygun bir basınç altında küçük gözeneklere nüfuz etmesi esasına dayanır. Uygulanan basınç ile gözenek çapı arasındaki ilişki Washburn eşitliği ile elde edilmektedir:

$$d=(-4\gamma \cos\theta)/P \quad (3. 1)$$

Burada  $P$  uygulanan basınç,  $d$  gözenek çapı,  $\gamma$  cıvanın yüzey gerilimi (480 dyne/cm) ve  $\theta$  ise cıva ile gözenek duvarı arasındaki temas açısını göstermektedir ki bu değer genellikle  $140^\circ$  dolaylarındadır. Cıva intrüzyon verileri, gözenek boyutu/hacim dağılımlarının tahmin edilmesinde kullanılır.

PHEMA-HA'nın gözenek dağılımını analiz etmek amacıyla cıva porozimetresi ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler, Poremaster 60 (Quantachrome Corporation) model cihaz ile düşük basınçta (0–50 psi) gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerden PHEMA-HA'nın morfolojisi değerlendirilmiştir.

### 3.6.6 Monolit için toplam boş fraksiyon tayini

Sentezlenen PHEMA-HA'nın toplam boş fraksiyonunu ( $\varepsilon_T$ ) tayin etmek amacıyla literatürde bilinen yöntem izlenmiştir (Perçin vd. 2015; Yao vd. 2006). Bunun için; bilinen miktarda kurutulmuş monolit tartıldı ( $m_d$ ) ve ardından  $V_1$  mL saf su içeren bir mezüre daldırıldı. Mezürdeki suyun son hacmi  $V_2$  ölçüldükten sonra ıslak monolitin kütlesi ( $m_w$ ) ölçüldü ve aşağıdaki formülden de monolitin toplam boş fraksiyonu ( $\varepsilon_T$ ) hesaplandı:

$$\varepsilon_T = \frac{m_w - m_d}{d_w V_0} \quad (3.2)$$

Burada,  $V_0=(V_2 - V_1)$  ve  $d_w$  ise suyun özkütlesini göstermektedir.

### 3.6.7 SEM (Taramalı elektron mikroskopisi)

Hazırlanan kriyojellerin morfolojisi ve mikro yapısı hakkında daha fazla bilgi edinebilmek amacıyla taramalı elektron mikroskopisi analizleri yürütülmüştür. Ölçümler, platin ile kaplanmış numuneler ile  $1,32 \times 10^{-2}$  Pa'lık vakum altında gerçekleştirilmiştir. Numuneler analizden önce kurutulmuştur.

## 3.7 Kromatografik İşlemler

### 3.7.1 Protein numuneleri

Çalışmalar süresince, ilgili pH değerine karşılık gelen 20 mM'lık fosfat tamponunda hazırlanmış protein örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan model proteinler Chy (Sigma), Cyt (BioChemica), Lys (Sigma) ve HSA'dır (Sigma). Tüm örnekler, ultrasonik banyoda (Isolab™) ve orbital çalkalayıcıda (Heidolph™) karıştırılarak hazırlanmış ve kullanılmadan önce 0.20  $\mu$ m'lik selüloz asetat (Sartorius™) filtrelerden süzümüştür. Gradyent eğimi ile alıkonma davranışları arasındaki ilişkinin incelendiği deneylerde, 5 mg/mL'lik protein numuneleri; karışımlarda ise yaklaşık 1,5-2,0 mg/L'lik numuneler kullanılmıştır. Bu numunelerden 10-20  $\mu$ L'lik enjeksiyonlar yapılmıştır. Aşırı yükleme (*overloading*) şartlarında yürütülen analizlerde ise sadece Lys kullanılmış ve bu amaçla 10 mg/mL'lik numuneden 10-500  $\mu$ L'lik enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Gerek analiz

süresince ve gerekse analiz dışındaki zaman dilimlerinde tüm protein numuneleri 4°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.7.2 Kromatografik kolon ve kolon performansı

Deneysel süreçlerde, 5,0x120 mm (iç çap ve uzunluk) ebadında boş polimerik kolonlar kullanılmıştır. Kolonlar kullanılmadan önce su ve alkol ile temizlenmiş ve kolon giriş çıkışları sentez işlemlerinden sonra selüloz asetat membran filtreleri ile kapatılmıştır.

Kolonun performansı teorik tabaka sayısı,  $N$ , ve su geçirgenliği,  $k_w$ , cinsinden test edilmiştir:

Tabaka sayısı deneylerinde, prob tür olarak Chy kullanılmış ve deneyler, adsorpsiyonun olmadığı şartlarda 0,15–1,00 mL/dak akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, hareketli faz olarak 20 mM’lık fosfat tamponunda hazırlanmış 1,0 M’lık NaCl çözeltisi (pH=7) kullanılmış olup, hesaplamalarda, pik yarı yüksekliğine dayanan aşağıdaki ilişkiler esas alınmıştır (van Deemter vd. 1995; Perçin vd. 2015):

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (3.3)$$

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (3.4)$$

Burada,  $t_R$ , alıkonma zamanını,  $w_{0.5}$ , pik yarı yüksekliğindeki pik genişliğini,  $L$ , kolonun uzunluğunu ve  $HETP$  ise bir teorik tabakaya eşdeğer yüksekliği göstermektedir.

Protein kromatografisinde kullanılan sabit fazın proteinlerle tersinir bir tarzda etkileşmesi gerekir; aksi takdirde, zaman içerisinde kolonun performansında belirgin düşüşler gözlenir. Bu şekilde performans kaybına uğrayan kolonlar zaman zaman *clean-in-place* adı verilen ve derişik bazik çözeltileri ile kolonun temizlenmesi esasına dayanan yöntemlerle temizlenir (Perçin vd. 2015). PHEMA-HA’nın çalışılan proteinlerle tersinmez bir şekilde etkileşip-etkileşmediğini değerlendirebilmek amacıyla aynı protein örnekleri ile bir dizi tekrar analizi gerçekleştirilmiş ve kaydedilen piklerin alıkonma zamanları ile alanlarından yola çıkarak bu tarz istenmeyen bir etkileşmenin varlığı irdelenmiştir. Veriler, % bağıl standart sapma (%RSD; *percent relative standard*

*deviation*) cinsinden, Chy, Cyt ve Lys için en az 3 tekrar analizi yürütülerek elde edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **3.7.3 Gradyent elüsyon ve pH etkisi**

Günümüzün en verimli protein kromatografisi türlerinden olan iyon-değişim kromatografisi, hareketli fazın iyon şiddetinde yapılan değişikliklerle proteinlerin birbirinde ayrılmasına olanak tanır. Hareketli fazda herhangi bir organik çözücünün veya zararlı kimyasalın kullanılmaması, bu yöntemle olan ilginin gün geçtikçe artmasıyla neticelenmiştir. Ayrıca, hareketli fazda proteinleri denatüre edici herhangi bir türün bulunmaması da bu yöntemi üstün kılan özelliklerdendir.

Protein iyon değişim kromatografisinin en karakteristik özelliklerinden bir tanesi, hareketli fazda uygulanan tuz gradyentinin eğimi ile proteinlerin alıkonma süreleri arasında bir ilişkinin bulunmasıdır. Sabit fazdaki iyon değiştirici gruplara karşı hareketli faz bileşenleri ile proteinler arasında açığa çıkan yarışmalı durum, proteinlerin farklı hızlarda elue olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, tuz gradyentinin eğimi arttırıldıkça, proteinlerin kolondan daha hızlı bir şekilde elue olması beklenir. Aksi durum, iyon-değişiminin hâkim mekanizma olmadığını gösterir.

PHEMA-HA'nın iyon değiştirici karakterini ortaya koymak amacıyla hareketli fazda farklı eğimlerde tuz gradyentleri uygulanmış ve elde edilen piklerden de sabit fazın karakteri değerlendirilmiştir. Bu amaçla; hareketli fazdaki tuz konsantrasyonu 5-30 dak'lık periyotlarda 0,00–0,50 M aralığında tedricen arttırılmıştır. 0,50 mL/dak'lık akış hızında gerçekleştirilen bu deneylerden elde edilen piklere karşılık gelen kapasite faktörleri ile gradyent eğimi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmalar Chy, Cyt ve Lys ile pH 5,0; 6,0 ve 7,0'da yürütülmüştür. Böylece;

- a) Farklı izoelektrik noktalara sahip proteinlerin elüsyon davranışları,
- b) pH etkisi
- c) Gradyent eğiminin etkisi

gibi üç önemli deneysel parametrenin etkisi kolektif bir şekilde değerlendirilmiştir.

### **3.7.4 Proteinler için kromatografik ayırma şartlarının incelenmesi**

Çalışılan protein örneklerinden HSA, Chy, Cyt ve Lys'nin karışımlarından ayrılması için yürütülen analizlerde, her bir türün konsantrasyonu yaklaşık olarak 1,5-2,0 mg/mL

olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneyler süresince 10-20 µL'lik enjeksiyonlar yapılmış ve kolonun ayırma verimliliği değerlendirilmiştir.

### 3.7.5 Frontal analiz deneyleri

Yukarıda belirtilen ve lineer kromatografi şartlarında yürütülen analizlerden sonra, lineer olmayan (*nonlinear*) kromatografi şartlarında Lys ile bazı analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerdeki temel hedef, sabit fazın protein tutma kapasitesini tespit etmek ve alıkonmada rol alan mekanizma hakkında fikri edinmektir. Aşırı yükleme şartlarında (*overloading conditions*) gerçekleştirilen deneylerin ilk bölümünde, PHEMA-HA içeren kolona 0,5 mg/mL'lik Lys çözeltisi (pH 7) beslenmiş ve cihazdan kaydedilen breakthrough eğrilerinden adsorbe olan protein miktarı hesaplanmış ve de birbiriyle karşılaştırılmıştır.

Lys'nin alıkonma mekanizmasını irdelemek amacıyla yüksek performanslı frontal analiz (*high performance frontal analysis, HPFA*) şartlarında yürütülen ikinci kademe deneylerde ise 600 µL ve 1350 µL'lik 10 mg/mL Lys çözeltisi PHEMA-HA'ya enjekte edildi ve elde edilen breakthrough eğrilerinden tutulma mekanizması değerlendirildi.

## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1 Karakterizasyon

##### 4.1.2 Elemental analiz

HA, PHEMA ve PHEMA-HA için elde edilen elemental analiz sonuçlar Çizelge 4. 1’de verilmiştir. Çalışmalarda kullandığımız HA için elde edilen sonuçlar, HA için gözlenen tipik veriler ile uyumlu olup, yapının büyük oranda C ve O elementlerinden oluşan bir şebekeden meydana geldiği ve daha düşük düzeylerde ise H, N ve S elementleri içerdiği anlaşılmıştır.

Elemental analiz sonuçları incelendiğinde, HA ile PHEMA arasındaki tek farklı elementin kükürt olduğu anlaşılabilir. Bu element sadece HA’da yer almaktadır. Diğer taraftan, S’nin saf HA’daki miktarının da çok düşük düzeyde olması, kriyojel yapısına HA’nın ne düzeyde katıldığına bu element temelinde değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Nitekim tablodan, PHEMA-HA’daki S miktarının tespit edilebilir düzeyde olmadığı anlaşılmaktadır. Kriyojel yapısına HA katıldıktan sonra C, H ve N elementlerinin miktarlarında gözlenebilir düzeyde farklılaşmaların meydana geldiği ve dolayısıyla mâkul bir matematiksel yaklaşımla yapıdaki HA miktarının hesaplanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, 100 g materyal temelinde C, H, ve N elementlerinin HA, PHEMA ve PHEMA-HA’daki miktarlarından yola çıkarak PHEMA-HA’nın yapısındaki HA miktarı 45 mgHA/gPHEMA-HA olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu değerin, HA immobilize edilmiş silika esaslı materyaller için hesaplanan verilerle (Koopal vd. 1998) uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

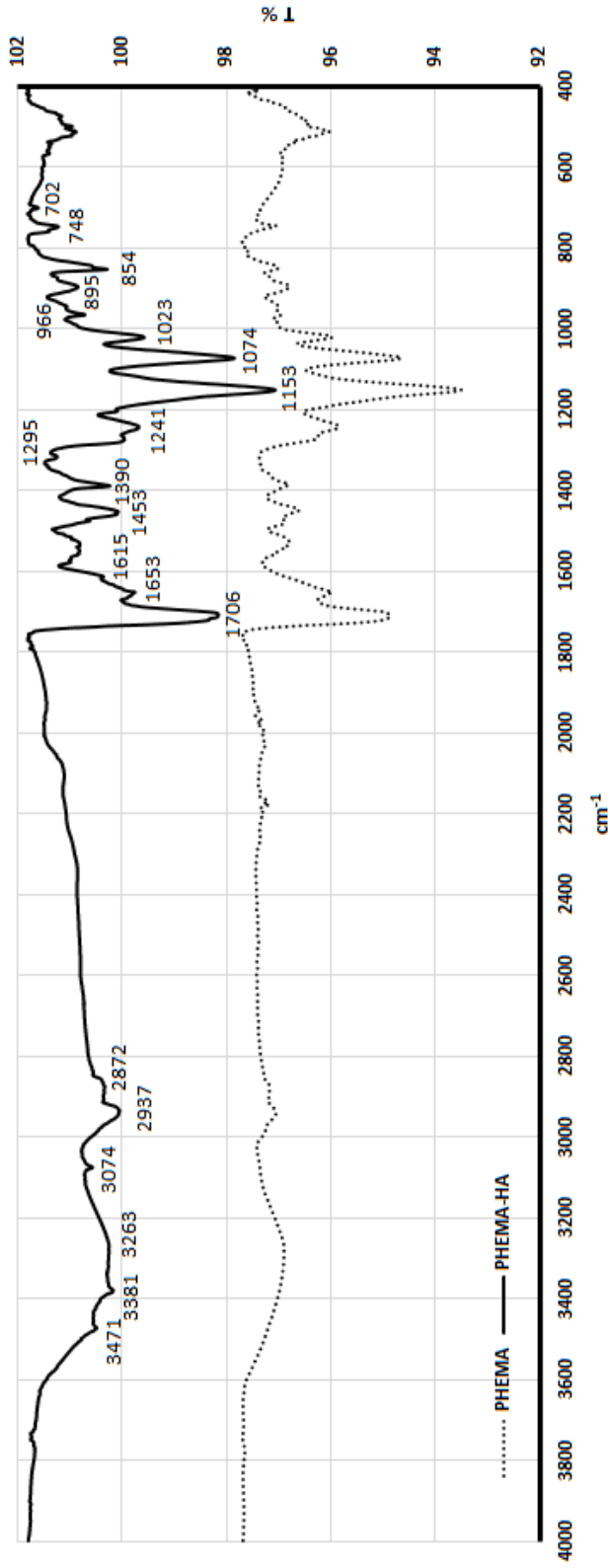
**Çizelge 4. 1.** HA, PHEMA ve PHEMA-HA için elemental analiz sonuçları <sup>a</sup>

	C %	H %	N %	S %
HA	44,30	3,51	1,18	0,47
PHEMA	51,97	7,41	2,64	--
PHEMA-HA	51,50	7,31	2,57	--

<sup>a</sup> Kuru madde temelinde.

### 4.1.3 FTIR analizleri

PHEMA ve PHEMA-HA'ya ait FTIR spektrumları Şekil 4. 1'de verilmiştir. FTIR spektrumlarından da görüldüğü üzere, yapıya HA katıldıktan sonra spektrumda önemli değişimler meydana gelmekte ve özellikle PHEMA yapısında bulunmayan ve fakat HA'nın yapısına bol miktarda bulunan aromatik yapılara ilişkin bantların (ör. 966; 1615  $\text{cm}^{-1}$ ) açığa çıktığı görülmektedir. Bu durum, HA'nın yapıya katıldığını açık bir şekilde göstermektedir. Bazı şartlarda ( $\text{pH}>10$ ) sergilediği yüksek hidrolitik dayanım nedeniyle, HA'nın yapıya kimyasal bağ oluşumu üzerinden dâhil olduğu düşünülmektedir. Nitekim hümitik makromoleküllerin kararlı radikaller oluşturduğu bilinmekte ve bu nedenle de radikalik polimerizasyon üzerinden yürütülen kriyojelleşme işlemlerinde polimerik yapıya kimyasal bağ oluşturarak dâhil olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, HA'nın kriyojelleşme mekanizmasının aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmaların yürütülmesi gerektiği belirtilmelidir. Spektrumlarda gözlenen temel bantlar Çizelge 4. 2'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. PHEMA ve PHEMA-HA için FTIR spektrumları ve karakteristik bantlar

**Çizelge 4. 2.** Monolitlerin FTIR spektrumlarında gözlenen ana bantlar

Dalga sayısı (cm <sup>-1</sup> )	Titreşim türü ve ilgili yapı
3000-3500	-OH ve -NH gerilme titreşimleri
2937 ve 2872	Alifatik C-H simetrik ve antisimetrik gerilme titreşimleri
1706	Karbonil grupları için C=O gerilme titreşimleri
1653	Amid yapıları için C=O gerilme titreşimleri
1615	C=C aromatik yapılardaki gerilme titreşimleri
1453	CH <sub>3</sub> antisimetrik deformasyon ve CH <sub>2</sub> makaslama
1390	COO- grupları için simetrik titreşimler
1295	Alkil aril eterler için C-O titreşimleri
1241 ve 1153	Ester yapıları için C-O-C antisimetrik gerilme titreşimi
1074	Ester ve eter yapıları için C-O-C gerilme titreşimleri
1023	Primer alkol yapıları için C-O titreşimi
966	CH=CH- yapıları için düzlem dışı deformasyon
895	Viniliden (CH <sub>2</sub> =CRR') yapıları için CH <sub>2</sub> düzlem dışı sallanma ve ayrıca alkil yapıları için gerilme titreşimleri
854	Aromatik C-H için düzlem dışı eğilme ayrıca alkil yapıları için gerilme titreşimleri
702	Karboksilik asit grupları için O-C=O eğilme

#### 4.1.4 Hidrolitik stabilite testleri

PHEMA-HA, 72 saat süreyle, pH=11'lik bazik bir çözeltilde bekletildikten sonra süzölmüş ve sulu faz spektrofotometrik analize tabi tutulmuştur (410 nm). Sonuçlar, PHEMA-HA'daki HA miktarının ancak %5'inin sulu faza geçtiğini göstermiştir. Bu nedenle, PHEMA-HA'nın, çalışılan deneysel şartlarda yüksek bir hidrolitik dayanım sergilediği ve dolayısıyla sabit fazın çözünmesi ile ilgili bir riskin bulunmadığı görölmüştür. Saf HA'nın pH>3'te çözünmeye başladığı dikkate alındığında, HA makromoleküllerinin kriyojel yapısına kimyasal bağ oluşumu üzerinden katılmış olabileceğine dair güçlü bir kanıt elde edilmiştir.

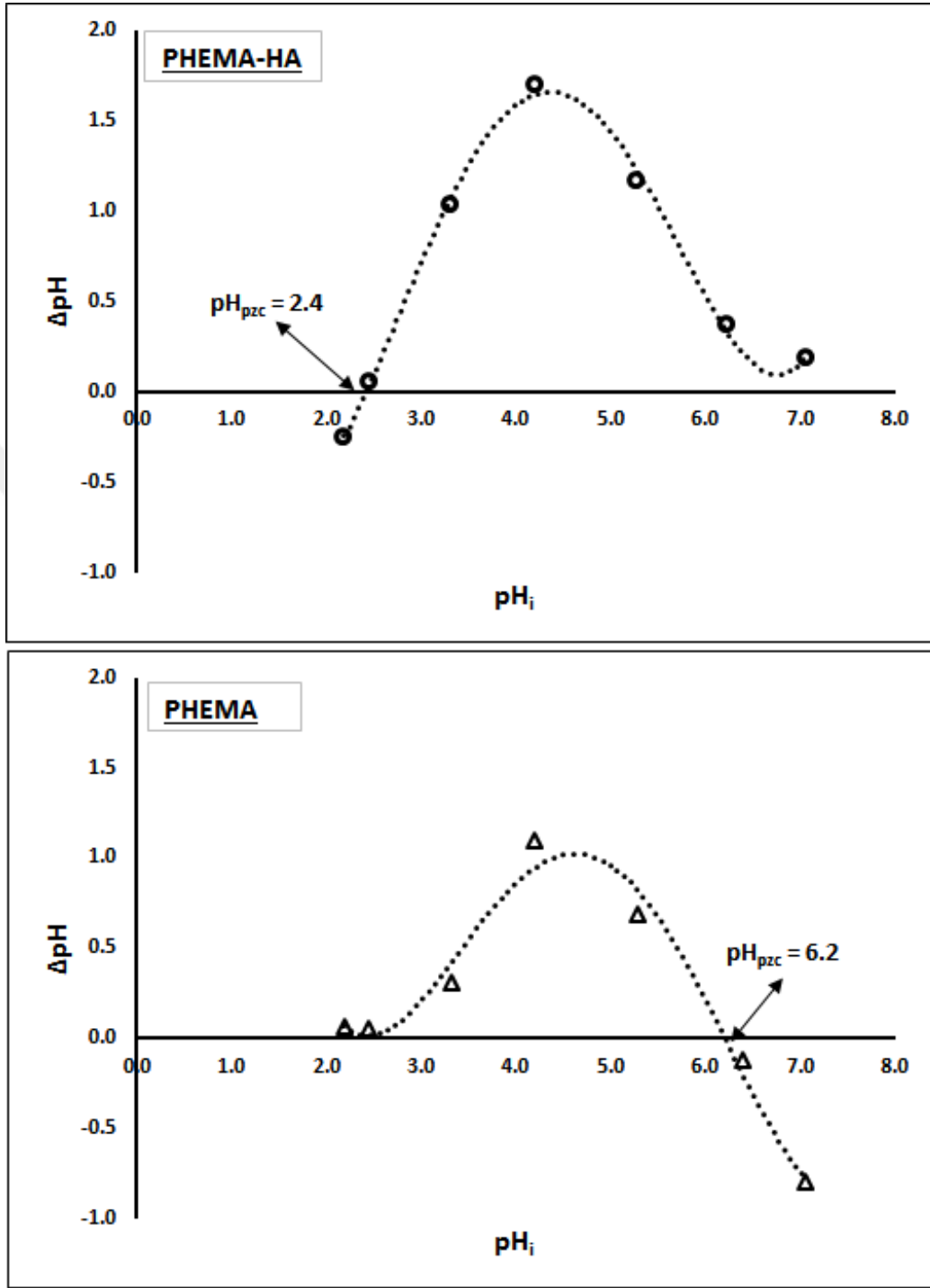
#### 4.1.5 pH<sub>pzc</sub> tayini

Kromatografik bir sabit fazın türlere karşı afinitesini belirleyen en önemli özelliklerinden bir tanesi, sabit fazın yüzey yük karakteristiğidir. Sabit fazın, herhangi bir pH değerine sahip hareketli faz ile etkileştirildiğinde hangi tür yük ile yükleneceği, o materyalin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar ile yakından ilgilidir.

Bir sabit fazın yüzey yük özelliklerini tanımlamak için kullanılan en pratik terimlerden biri "sıfır yük noktasına karşılık gelen pH" olarak bilinen pH<sub>pzc</sub>'dir. Bu değer, sabit fazın üzerindeki (+) ve (-) yüklerin birbirini dengelediği noktada, sabit fazın etrafındaki sıvının sahip olduğu pH değerine karşılık gelir. Yani, sabit faz pH<sub>pzc</sub>'dan daha düşük pH değerine sahip bir sulu çözeltiliye daldırıldığında sabit fazın yüzeyi (+) yük ile yüklenecek ve dolayısıyla hareketli fazdaki (-) yüklü türlere karşı daha yüksek afinite sergileyecektir. Benzer şekilde, pH<sub>pzc</sub>'dan daha yüksek pH değerine sahip sulu bir çözeltiliye daldırıldığında ise sabit fazın yüzeyi (-) yük ile yükleneceğinden hareketli fazdaki (+) yüklü türlere karşı çekim, (-) yüklü olanlara karşı ise bir itme sergileyecektir (Gezici vd. 2006).

PHEMA ve PHEMA-HA için pH-değişim metoduna (*pH-drift method*) (Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b) göre yürütölen deneylerden elde edilen veriler Şekil 4. 2'te grafiksel olarak verilmiştir. Grafiklerden, PHEMA ve PHEMA-HA için pH<sub>pzc</sub> değerlerinin sırasıyla 6,2 ve 2,4 olduğu görölebilmektedir. Buradan, PHEMA yapısına HA katıldıktan sonra yüzeyin asidik karakterinde belirgin bir artışın meydana geldiği sonucuna varılabilir. HA'nın yapısında bulunan ve asidik özelliğe sahip -COOH

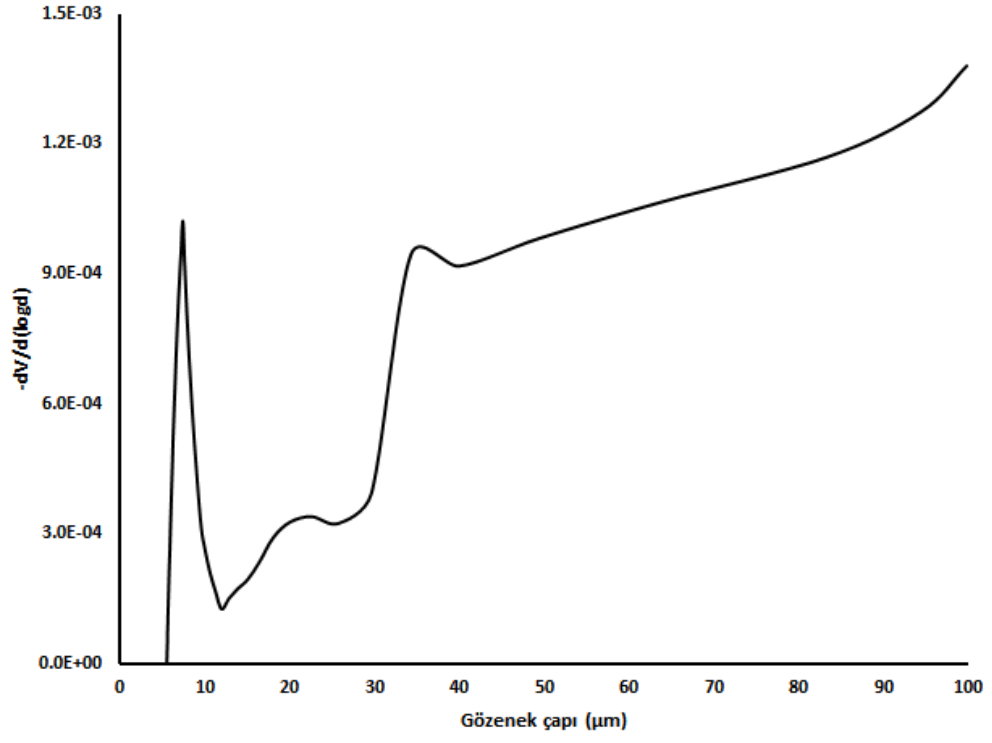
gruplarının burada belirleyici bir rol üstlendiği söylenebilir. HA'nın silika destek katısına immobilize edilmesinden sonra da yüzeyin asidik karakterinde benzer değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir (Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b; Koopal vd. 1998). Nitekim aminopropil silikanın 9,8 olan  $pH_{pzc}$  değerinin HA immobilizasyonu ve *end-capping* işleminden sonra 2,7'e düştüğü bildirilmiştir (Gezici ve Kara 2011a; Gezici ve Kara 2011b). PHEMA-HA için bulunan 2,4 değerinin literatürdeki verilerle uyumlu olduğu ve geniş bir pH aralığında yüzeyinde (-) yük bulundurabilecek bir katyon değiştirici özellik sergileyeceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, PHEMA-HA'nın protein iyon-değişim kromatografisinde zayıf katyon değiştirici özellik sergileyen bir sabit faz olarak kullanılabilmesi anlaşılmıştır.



Şekil 4. 2. PHEMA ve PHEMA-HA için pH-değişim metoduna göre  $pH_{pzc}$  tayini

#### 4.1.6 Cıva porozimetresi

PHEMA-HA'daki gözenek dağılımı hakkında bilgi edinmek amacıyla yürütülen cıva porozimetresi deneylerinden elde edilen veriler Şekil 4. 3'te grafik olarak verilmiştir. Grafikten, gözeneklerin büyük bir bölümünün çaplarının 30  $\mu\text{m}$ 'den daha büyük olduğu ve genel anlamda makrogözenekli bir yapının hâkim olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonucun, PHEMA-HA için yürütülen su tutma kapasitesi ölçümlerinden elde edilen sonuçlarla da uyumlu olduğu görülmüştür. Nitekim adı geçen analizlerden, PHEMA-HA'nın %88'e yakın oranda gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca verilerin, SEM analizlerinden elde edilenlerle de uyum içinde olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, PHEMA-HA'nın, proteinler gibi büyük moleküler kütleyle sahip türlerin transferine olanak tanıyan bir morfoloji sergilediği sonucuna varılmıştır.



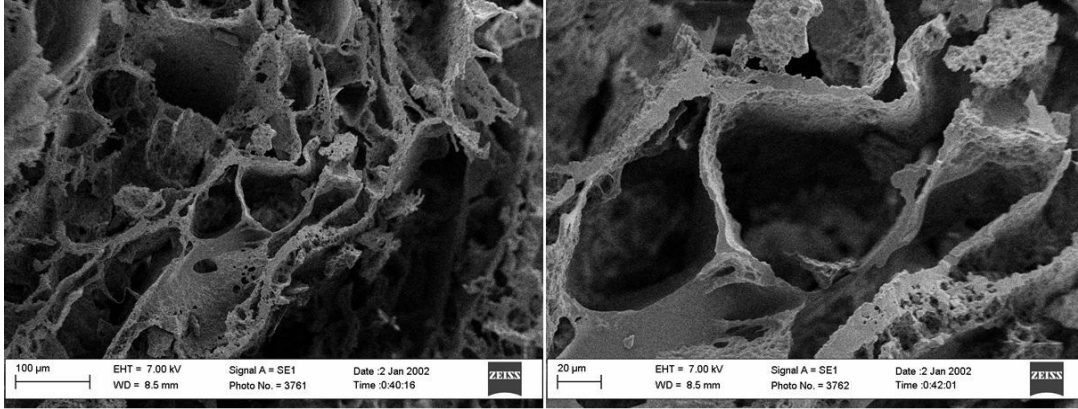
Şekil 4. 3. PHEMA-HA için gözenek dağılım grafiği

#### 4.1.7 PHEMA-HA için toplam boş fraksiyonun tayini

Cıva porozimetresi ve SEM analizlerinden elde edilen verileri teyit etmek amacıyla monolitin su tutma kapasitesinin tayinini kapsayan bazı deneyler yürütülmüştür. Yürütülen deneylerden elde edilen verilerden monolit için toplam boş fraksiyon,  $\varepsilon_T$ , 0,88 olarak hesaplanmıştır. Bu değerin, daha önce PHEMA esaslı kriyojeller için bulunan değerlerle uyum içinde olduğu görülmüştür (Perçin vd. 2015). Bu nedenle, PHEMA-HA'nın yüksek oranda gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve böylece kromatografik işlemler için aranan düşük geri basınç ve az düzeyde kütle transfer direnci gibi özellikleri sergileyeceği öngörülmüştür.

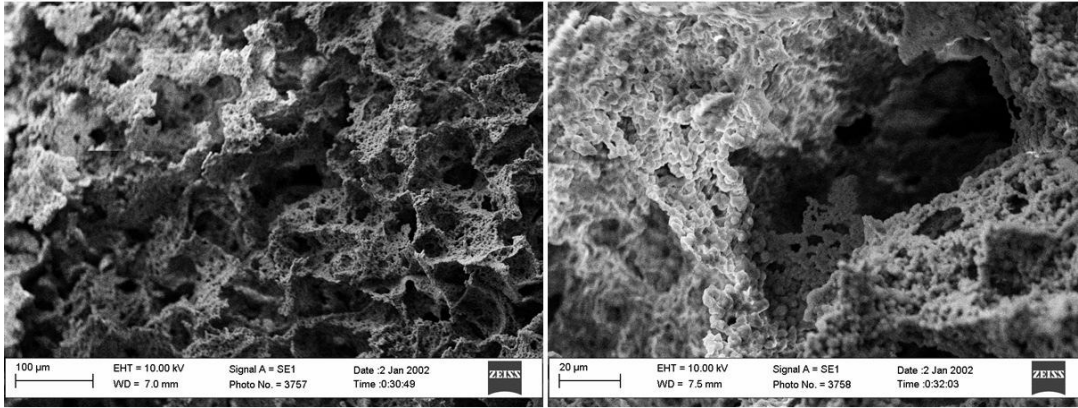
#### 4.1.8 SEM analizleri

Şekil 4. 4'te verilen imajlardan da görüldüğü üzere, her iki yapı da makrogözenekli bir morfoloji sergilemektedir. Ayrıca, monolitik kriyojellerin tipik özelliklerinden olan ince ve sürekli duvarlar da belirgin bir şekilde görülmektedir. Diğer taraftan, PHEMA ile kıyaslandığında, PHEMA-HA'nın daha büyük gözeneklere sahip olduğu ve yer yer 200  $\mu\text{m}$  ve daha büyük gözeneklerin de yapıda bulunduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, hümitik makromoleküllerin, PHEMA'nın morfolojisi üzerinde önemli farklılaşmalara yol açtığını söylemek mümkündür. Cıva porozimetresinden elde edilen verilere benzer şekilde, SEM imajlarından, PHEMA-HA'nın protein kromatografisi işlemleri için yeterli büyüklükte gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve bu anlamda protein transferi için uygun bir morfoloji sergilediği anlaşılmıştır.



**PHEMA-HA**

**PHEMA-HA**



**PHEMA**

**PHEMA**

**Şekil 4. 4. PHEMA ve PHEMA-HA için SEM imajları**

## 4.2 Kromatografik İşlemler

PHEMA-HA'nın sabit faz özelliklerini incelemek amacıyla öncelikle kolonun performansı (a) *teorik tabaka sayısı* ve (b) *su geçirgenliği* bakımından değerlendirilmiştir. Sonraki aşamada ise kromatografik verilerin tekrarlanabilirlikleri incelenmiştir. Bu kapsamda, PHEMA-HA'nın proteinler ile tersinmez bir şekilde etkileşmeye girip-girmediği de test edilmiştir. Bu analizlerin ardından tek bileşenli protein numuneleri kullanılarak farklı pH değerlerinde bir dizi gradyent elüsyon deneyleri yürütülmüştür. Daha sonra, birden fazla protein içeren karışımlar kullanılarak kolonun karışımdaki her bir proteini ayırabilme özelliği incelenmiştir. Son aşamada ise, kolonun Lys'ye karşı sergilediği adsorpsiyon kapasitesi incelenmiş ve yüksek performanslı frontal analizler ile de bağlanmanın mekanizması hakkında fikir yürütülmüştür. Belirtilen deneysel aşamalardan elde edilen veriler aşağıda sunulmuş ve tartışılmıştır.

### 4.2.1 Kolonun performansı

Kolonun performansı, teorik tabaka sayısı ve su geçirgenliği cinsinden değerlendirilmiş ve ayrıca elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği de irdelenmiştir.

Akış hızı ile tabaka yüksekliği (HETP) arasındaki ilişki van Deemter eşitliği (van Deemter vd. 1995; Perçin vd. 2015) ile verilir:

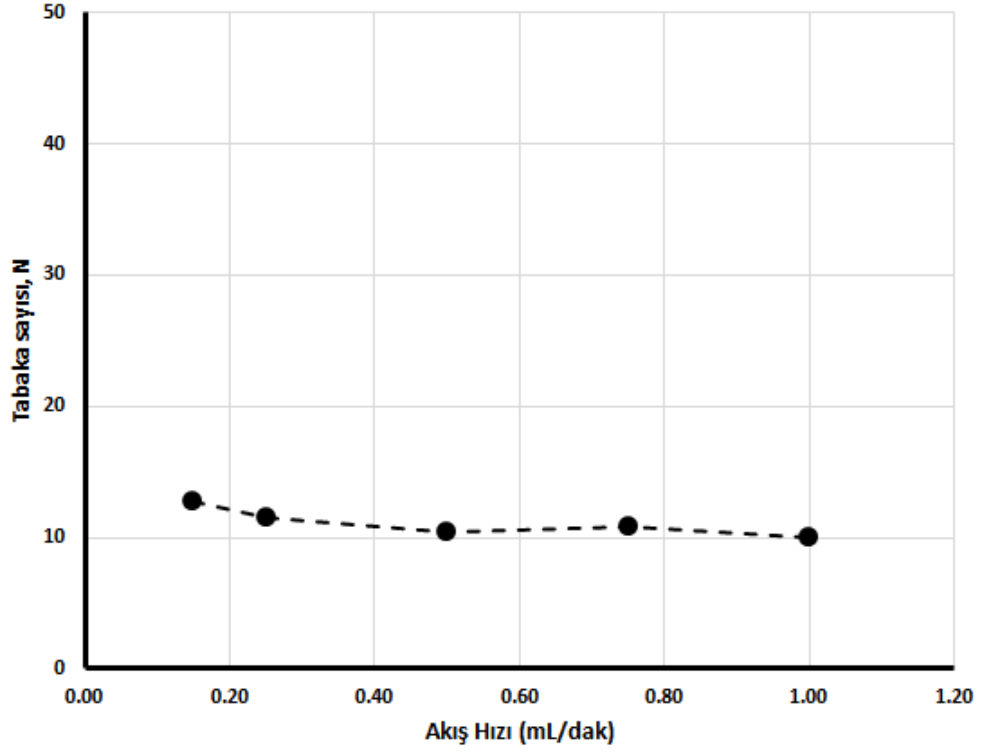
$$HETP = A + \frac{B}{u} + C_s u \quad (4.1)$$

Burada,  $A$ , eddy difüzyonu ile ilgili bir katsayıyı,  $B$ , boyuna difüzyon katsayısını,  $C_s$ , kütle-transfer katsayısını ve  $u$  ise hareketli fazın akış hızını göstermektedir. Sıvı kromatografisinde, boyuna difüzyon hızı çok önemli olmadığından,  $HETP$  ile  $u$  arasındaki ilişki büyük oranda kütle-transfer ifadesi ( $C_s u$ ) ile ilişkilidir (van Deemter vd. 1995; Perçin vd. 2015; Wang ve Sun 2013).

PHEMA-HA kullanılarak 0,15–1,00 mL/dak akış hızı aralığında yürütülen deneylerden, teorik tabaka sayısının ( $N$ ) ve dolayısıyla  $HETP$ 'nin akış hızından neredeyse bağımsız olduğu görülmüştür (Şekil 4. 5). Bu, kriyojel esaslı monolitik sabit fazlarda gözlenen tipik bir durum olup, kolon içerisinde kütle transfer direncinin çok düşük düzeyde

olduğu ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca belirtilen bu durum, kriyojel esaslı kolonlarda madde taşınımının difüzyondan ziyade konveksiyon ile alakalı olduğu gerçeği ile uyumludur (Plieva vd. 2004). Sonuç olarak, PHEMA-HA'nın, kriyojellerde gözlenen temel akış özelliklerini sergilediği ve akış hızı ile kromatografik davranışların literatürdeki veriler ile uyumlu olduğu görölmüştür.



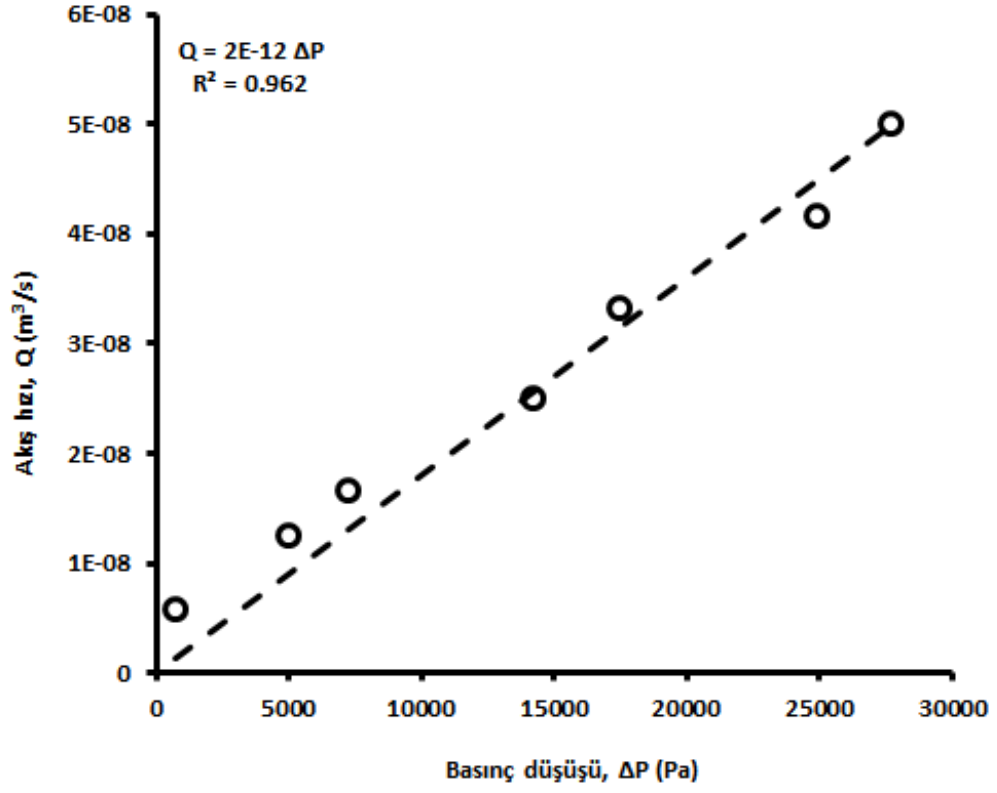


**Şekil 4. 5.** Akış hızı ile teorik tabaka sayısı arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi  
Deneysel şartlar: Akış hızı: 0,15-1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 °C; Deteksiyon dalga boyu:  
UV 280 nm; Kolon: 5,0x120 mm; Analit: Chy (5 mg/mL; pH 7,0)

Kolonun su geçirgenliği,  $k_w$ , Darcy kanununa (Perçin vd. 2015; Yao vd. 2006) göre aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$k_w = \frac{Q \eta L}{\Delta P A} \quad (4. 2)$$

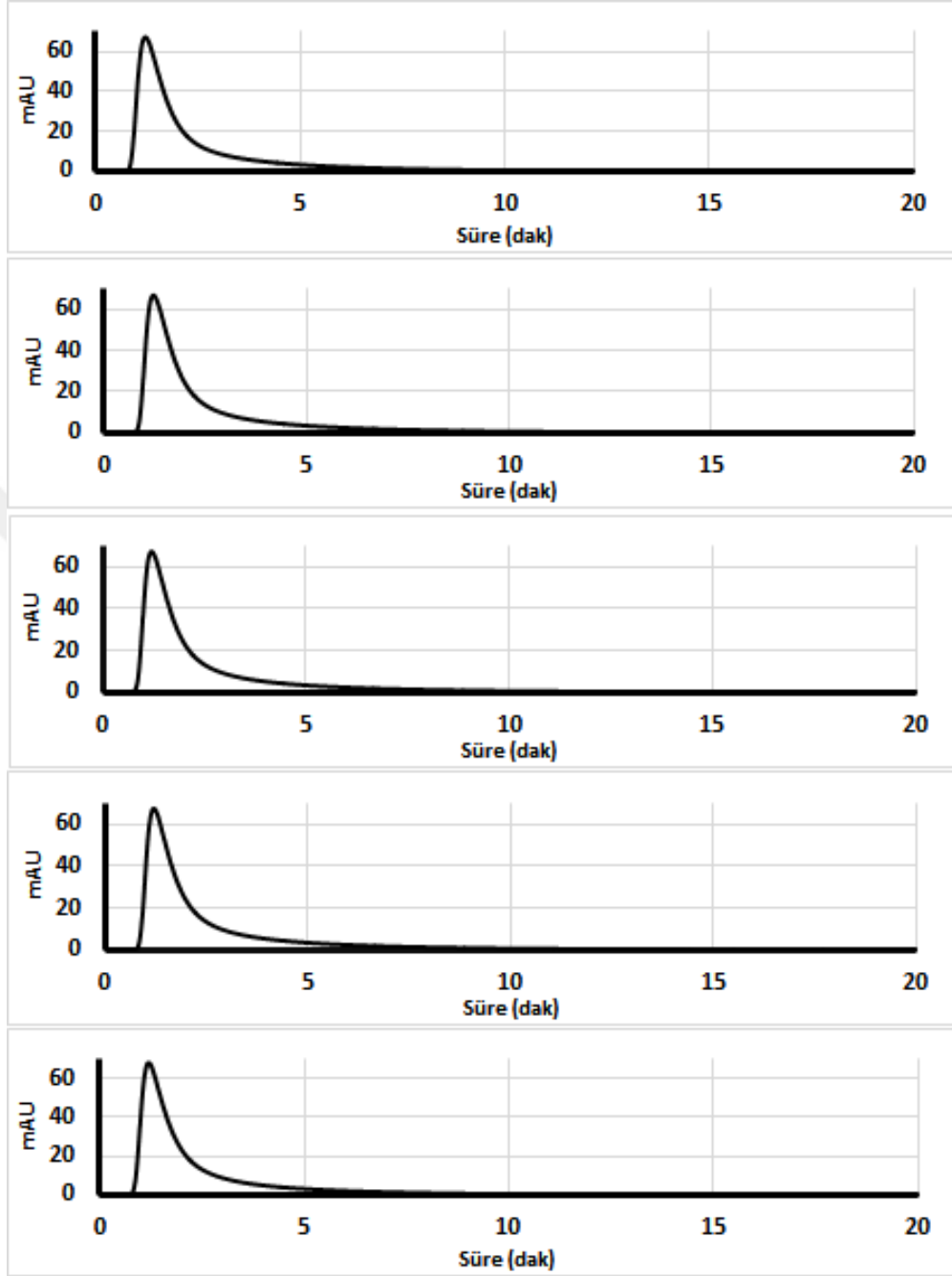
Burada,  $Q$ ,  $\eta$ ,  $L$  ve  $A$  sırasıyla doğrusal akış hızı ( $m^3/s$ ), suyun vizkozitesi ( $1,003 \times 10^{-3}$  Pa s), kolonun uzunluğu ( $0.110$  m) ve monolit kesitinin alanını ( $1,96 \times 10^{-5}$   $m^2$ ) göstermektedir. Deneysel verilerin lineer uyumundan (şekil 4. 6), PHEMA-HA için  $k_w$  değereri  $1,12 \times 10^{-11}$   $m^2$  olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer, literatürde kriyojeller için verilen bazı değerlere göre daha yüksek olup (Carvalho vd. 2014; Perçin vd. 2015; Yao vd. 2006), bazı değerlere (Yun vd. 2012) ise yakın bir durum sergilemiştir. Elde edilen bulgular, PHEMA-HA'nın, kriyojellerde gözlenen tipik makrogözenekli bir yapının sonucu olarak yüksek su geçirgenliği sergilediğini ortaya koymuştur. Nitekim,  $10^{-12}$ – $10^{-10}$   $m^2$  aralığında  $k_w$  değerlerine sahip bazı kriyojeller için gözenekliğin %81-90 aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Yun vd. 2016). PHEMA-HA için elde edilen cıva porozimetresi, SEM analizi ve su tutma kapasitesi verilerinden elde edilen sonuçların su geçirgenliği sonuçları ve de literatürdeki verilerle uyumlu olduğu görölmüştür.



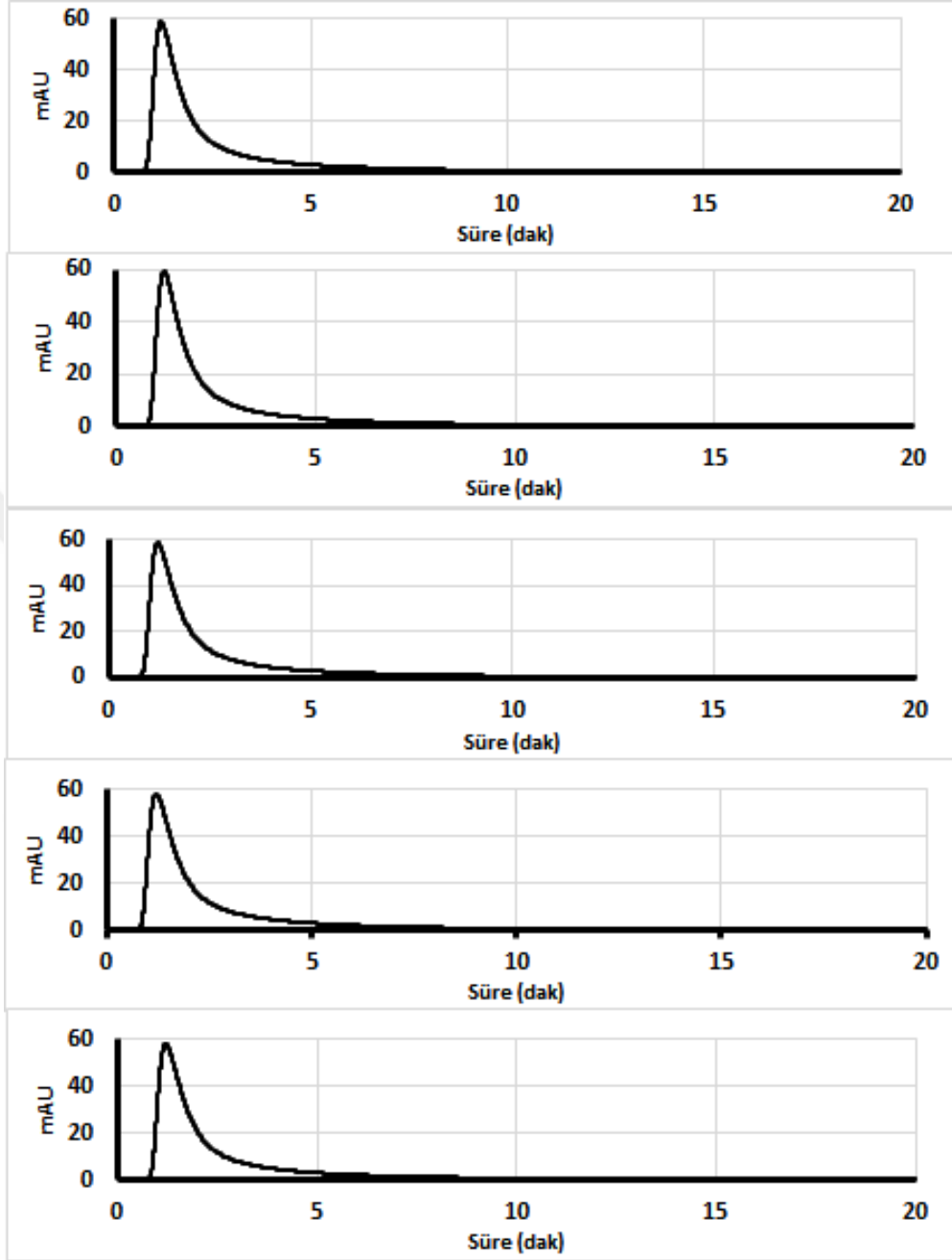
**Şekil 4. 6.** PHEMA-HA için basınç düşüş grafiği  
 $\Delta P$ =Basınç düşüşü= $(P_{\text{kolon}} - P_{\text{sistem}})$ ;  $Q$ =Doğrusal akış hızı,  $m^3/s$

PHEMA-HA ile elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sadece analitik verilerin güvenilirliği açısından değil, aynı zamanda sabit fazın proteinlerle etkileşme tarzını değerlendirme bakımından da önem arz etmektedir. Çalışılan proteinlerin tekrar deneylerinde sergilediği alıkonma sürelerindeki farklılaşma, proteinlerin sabit faz ile tersinmez bir tarzda etkileştiği noktasında önemli veriler sunar. Belirtilen hususları incelemek amacıyla, Chy, Cyt ve Lys ile en az 3 tekrar analizi yürütüldü ve elde edilen piklerin (Şekil 4. 7, Şekil 4. 8, Şekil 4. 9) alıkonma süreleri istatistiksel olarak analiz edildi.

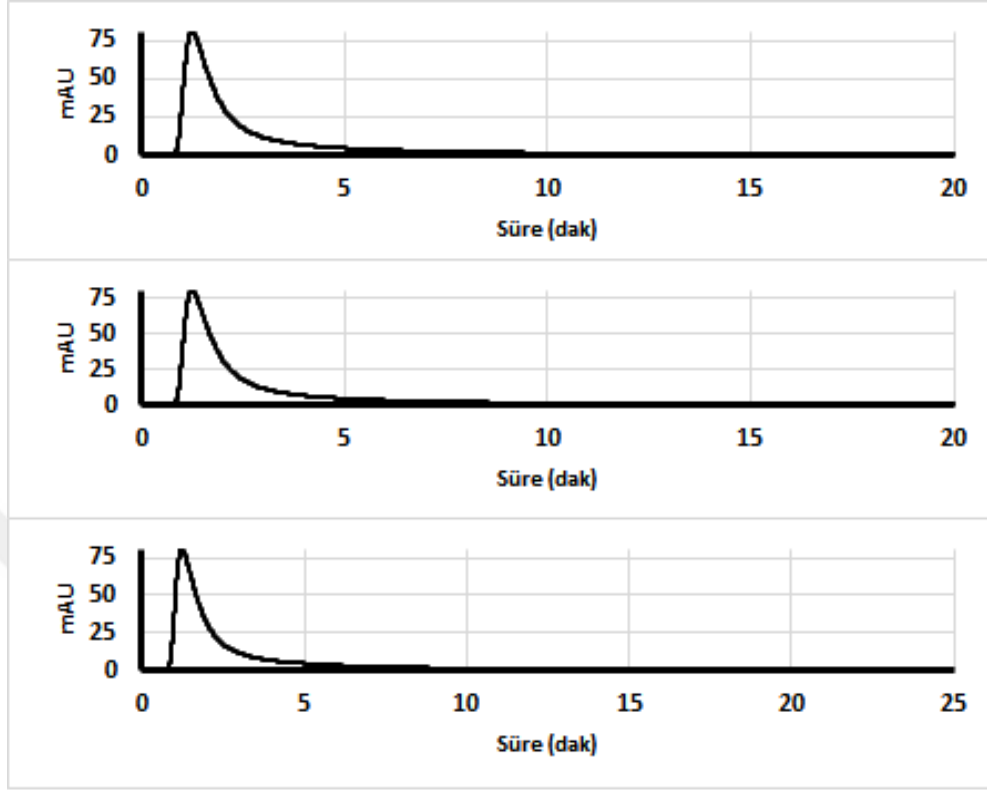
HA'nın kompleks yapısına rağmen, çalışılan proteinlerin alıkonma sürelerindeki bağıl standart sapma düzeyinin Chy, Cyt ve Lys için sırasıyla %0,32; %0,17 ve %0,05 düzeyinde olduğu görülmüştür. Pik alanı temelinde yapılan değerlendirmelerden de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, PHEMA-HA'nın çalışılan proteinlerle tersinir bir şekilde etkileştiği ve kolonun tekrar tekrar kullanılabilceğini göstermektedir. Nitekim PHEMA-HA ile 2 aylık bir süre zarfında yürütülen onlarca analizden sonra kolonun performansında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuç olarak; PHEMA-HA'nın protein iyon-değişim kromatografisi için uygun özellikler sergilediği görülmüştür.



**Şekil 4. 7.** Chy için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar  
Deneysel şartlar: Akış hızı: 0,50 mL/dak; Sıcaklık: 25 °C; Deteksiyon dalga boyu: UV 280 nm; Kolon: 5,0x120 mm; Analit: Chy (5 mg/mL; pH 7,0); Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Hareketli faz: 0,25 M NaCl (pH=7; 20 mM fosfat tamponunda)



**Şekil 4. 8.** Cyt için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar  
Deneysel şartlar: Akış hızı: 0,50 mL/dak; Sıcaklık: 25 °C; Deteksiyon dalga boyu: UV-  
Vis. 410 nm; Kolon: 5,0x120 mm; Analit: Cyt (5 mg/mL; pH 7,0); Enjeksiyon hacmi:  
20 µL; Hareketli faz: 0,25 M NaCl (pH=7; 20 mM fosfat tamponunda)



**Şekil 4. 9.** Lys için tekrar analizlerinden elde edilen kromatogramlar  
Deneysel şartlar: Akış hızı: 0,50 mL/dak; Sıcaklık: 25 °C; Deteksiyon dalga boyu: UV 280 nm; Kolon: 5,0x120 mm; Analit: Lys (5 mg/mL; pH 7,0); Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Hareketli faz: 0,25 M NaCl (pH=7; 20 mM fosfat tamponunda)

#### 4.2.2 Gradyent eğimi ve pH etkisi

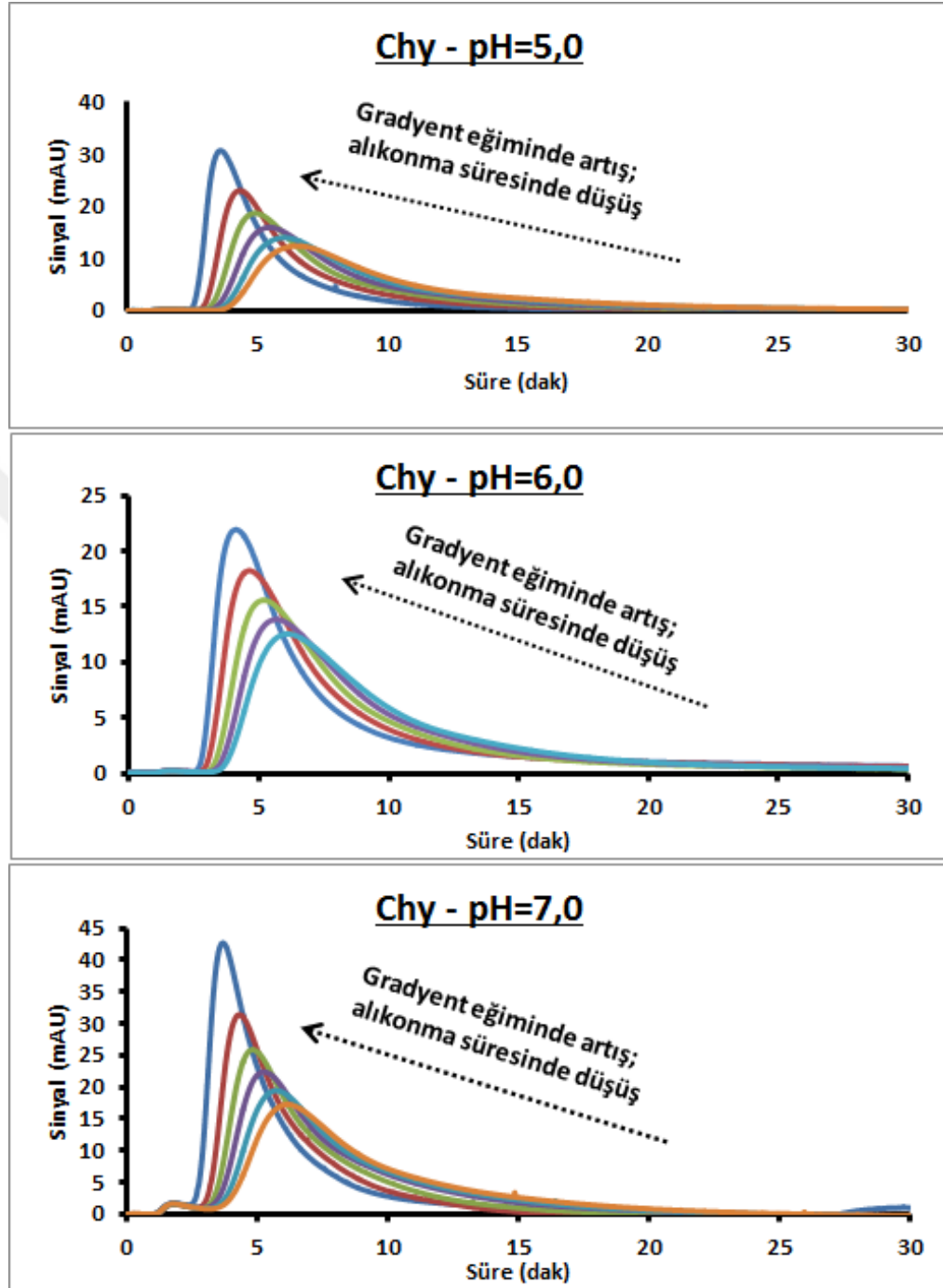
PHEMA-HA ile farklı gradyent eğimlerinde ve farklı pH değerlerinde Chy, Cyt ve Lys ile yürütülen analizler, sabit fazın bir iyon değiştiriciden beklenen tarzda etkileşme sergilediğini göstermiştir. Hareketli fazdaki tuz konsantrasyonu arttırıldıkça, proteinlerin alıkonma sürelerinin düştüğü ve dolayısıyla kolondan daha kısa sürede elue olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4. 10 (Chy), Şekil 4. 11 (Cyt) ve Şekil 4. 12 (Lys)'de verilen kaydedilmiş pikler ile Şekil 4. 13'te verilen toplu grafikten de görüldüğü üzere, bu durum çalışılan 3 protein için de söz konusudur. Diğer taraftan, gradyent eğimindeki farklılaşmalara Lys'nin daha duyarlı olduğu gözlenmiş ve bu durumun da Lys'nin izoelektrik noktasının Chy ve Cyt'den daha yüksek olmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür.

Gradyent elüsyon denemelerinden varılan bir diğer sonuç ise, incelenen her 3 protein için kapasite faktörlerinin (alıkonma faktörü,  $k'$ ) hareketli fazın pH değerine bağlı olarak farklılaşmasıdır. Genel bir eğilim olarak, hareketli fazın pH değeri düştükçe  $k'$  değerlerinde belirgin düşüşler gözlenmiş ve bu durumun Chy, Cyt ve Lys sırasında daha da belirginleştiği görülmüştür. Belirtilen bu sıra, esasında, adı geçen proteinlerin izoelektrik noktaları ile de uyum sergilemektedir. Nitekim Chy, Cyt ve Lys için izoelektrik noktalarının sırasıyla 8,97; 10,0 ve 11,35 olduğu bilinmektedir. PHEMA-HA üzerinde elde edilen alıkonma sürelerinin belirtilen sırada artması Chy'den Lys'ye doğru proteinlerdeki yük yoğunluğunun artması ve dolayısıyla sabit faz ile daha güçlü elektrostatik etkileşmeye girmesiyle sonuçlanmış olmalıdır. Hareketli fazın pH değeri düştükçe  $k'$  değerlerinin genel olarak düşmesinin ise, PHEMA-HA'daki asidik fonksiyonel grupların kısmen protonlanması ve dolayısıyla karboksilat gruplarına karşı proton ve proteinler arasında gerçekleşen yarışmalı etkileşmelerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu durum, PEMA-HA'nın zayıf katyon değiştirici bir özellik sergilediği gerçeği ile uyum içindedir.

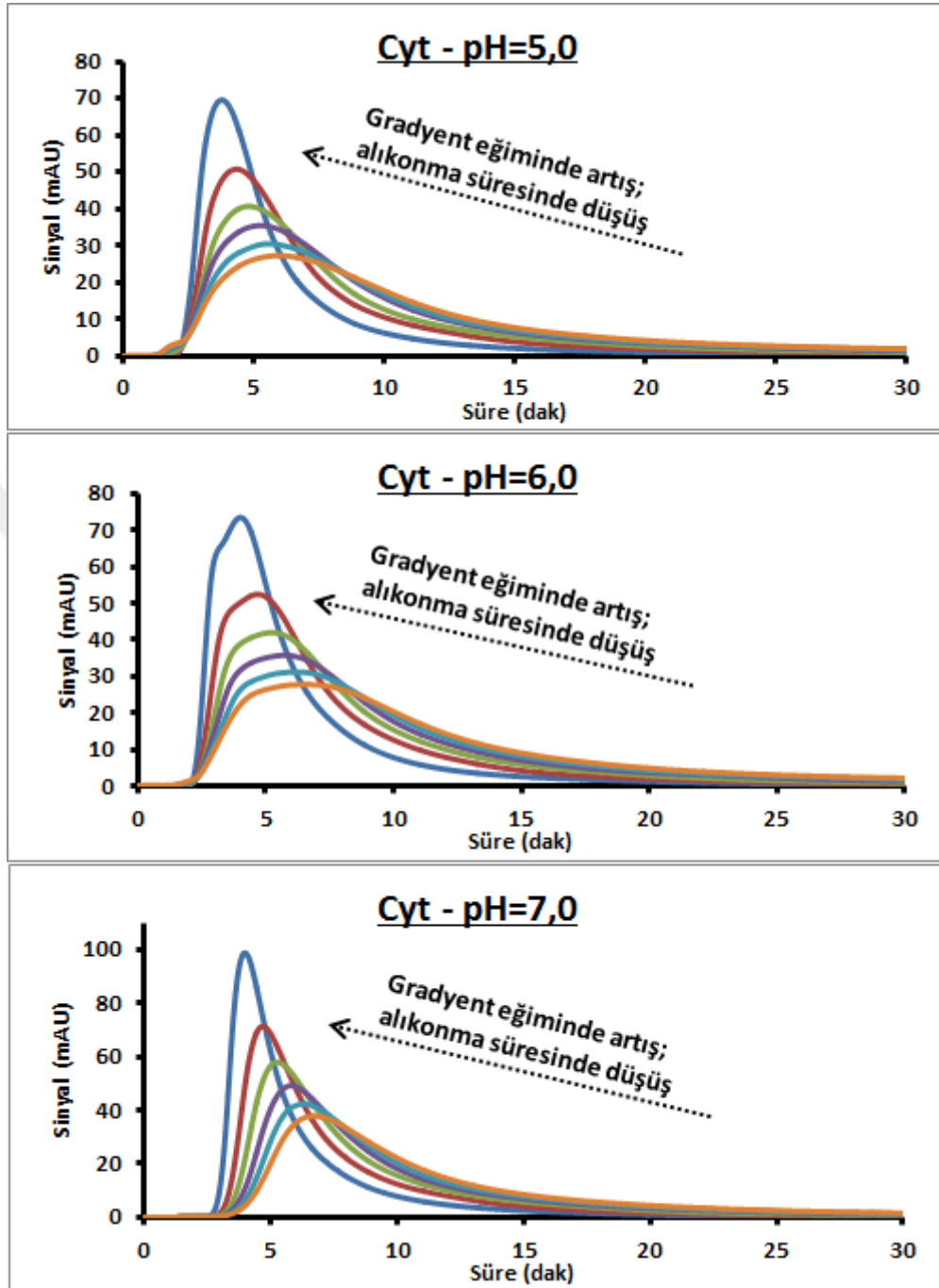
Gradyent elüsyon deneylerinden elde edilen bir diğer önemli sonuç ise, pH 5,0; 6,0 ve 7,0 sırasında piklerdeki kuyruklanmanın azalması ve dolayısıyla daha simetrik piklerin elde edilmesidir (Bkz. Şekil 4. 10, Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12). Gözlenen bu durum, iyon-değişim mekanizmasının yanı sıra, H-bağı oluşumu gibi etkileşmelerin düşük pH değerlerinde daha etkin olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Nitekim pH düştükçe, PHEMA-HA'daki karboksilat gruplarından bir kısmının protonlanacağı ve bunun etkisiyle

PHEMA-HA ile proteinler arasındaki belirtilen etkileşmelerin düzeyinde artış olacağı düşünülmektedir. Bu sonucun, PHEMA-HA'nın zayıf katyon değiştirici özelliğinin ortaya konması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

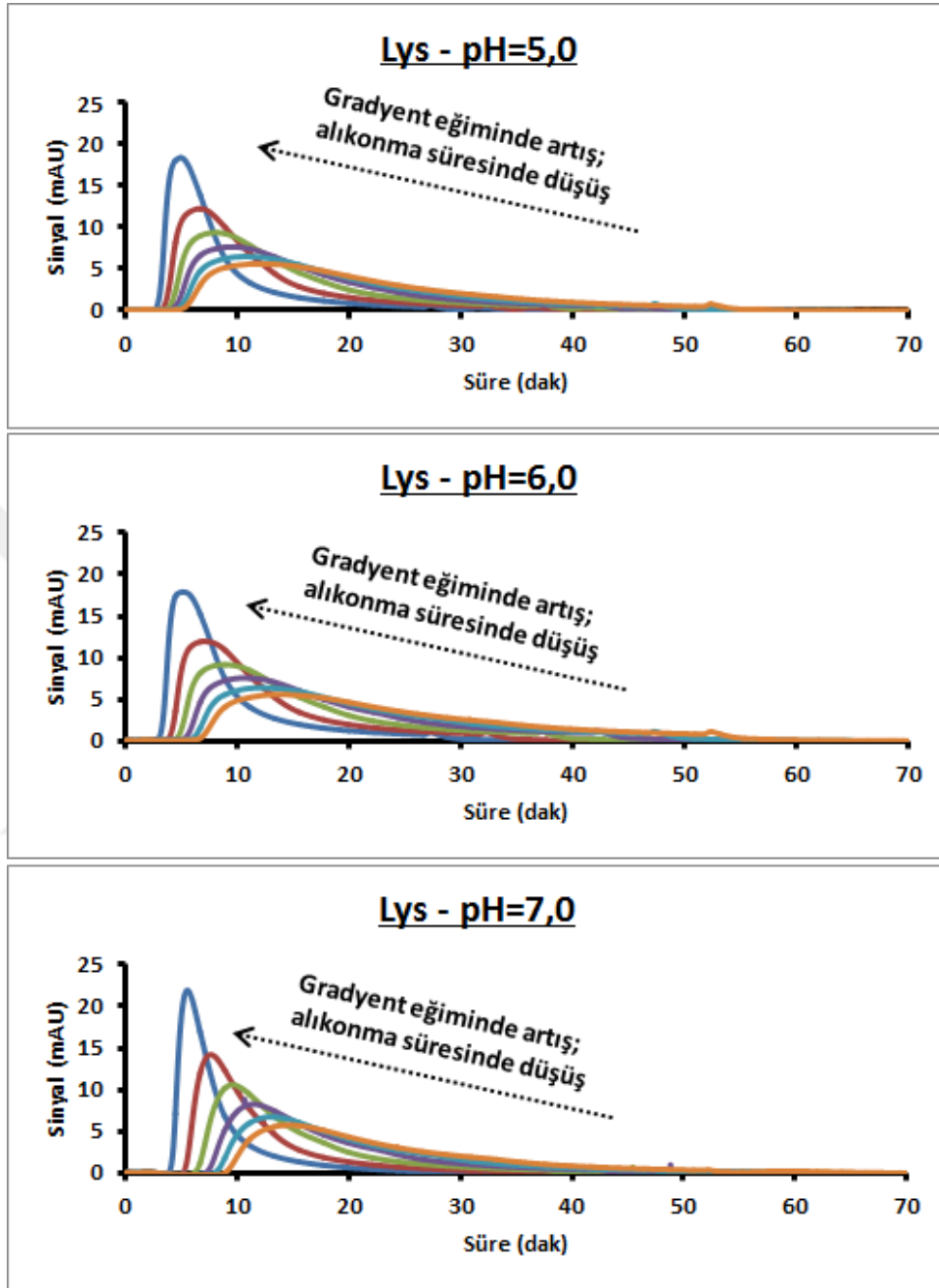




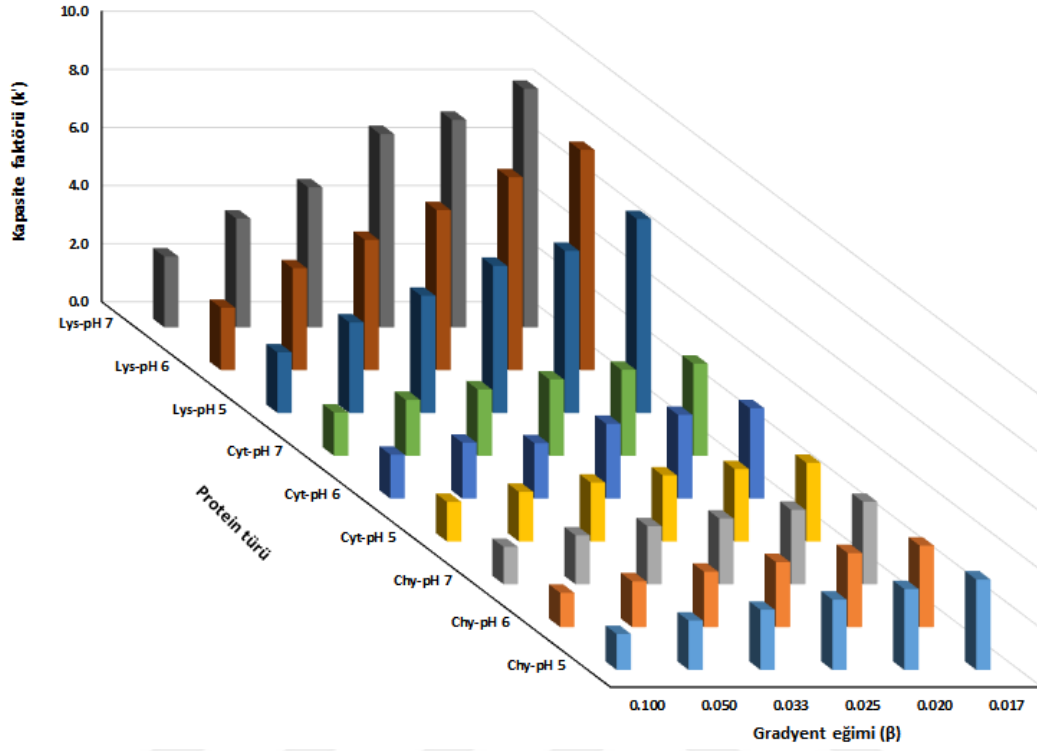
**Şekil 4. 10.** Chy için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler. Gradyent: Hareketli fazdaki NaCl konsantrasyonu 0-5 dak, 0-10 dak, 0-15 dak, 0-20 dak, 0-25 dak ve 0-30 dak zaman aralıklarında tedricen 0,00-0,50 mol/L aralığında lineer olarak artırılmıştır. Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: 5,0x120 mm; Deteksiyon: UV 280 nm; protein konsantrasyonu: 5 mg/mL (pH 5,0, 6,0 veya 7,0; 20 mM fosfat tamponunda); pH: 5,0; 6,0 ve 7,0 (20 mM fosfat tamponu)



**Şekil 4. 11.** Cyt için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler. Gradyent: Hareketli fazdaki NaCl konsantrasyonu 0-5 dak, 0-10 dak, 0-15 dak, 0-20 dak, 0-25 dak ve 0-30 dak zaman aralıklarında tedricen 0,00-0,50 mol/L aralığında lineer olarak arttırılmıştır. Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: 5,0x120 mm; Deteksiyon: UV-Vis. 410 nm; protein konsantrasyonu: 5 mg/mL (pH 5,0, 6,0 veya 7,0; 20 mM fosfat tamponunda); pH: 5,0; 6,0 ve 7,0 (20 mM fosfat tamponu)



**Şekil 4. 12.** Lys için farklı gradyent eğimlerinde ve pH'larda kaydedilen pikler. Gradyent: Hareketli fazdaki NaCl konsantrasyonu 0-5 dak, 0-10 dak, 0-15 dak, 0-20 dak, 0-25 dak ve 0-30 dak zaman aralıklarında tedricen 0,00-0,50 mol/L aralığında lineer olarak artırılmıştır. Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: 5,0x120 mm; Deteksiyon: UV 280 nm; protein konsantrasyonu: 5 mg/mL (pH 5,0, 6,0 veya 7,0; 20 mM fosfat tamponunda); pH: 5,0; 6,0 ve 7,0 (20 mM fosfat tamponu)

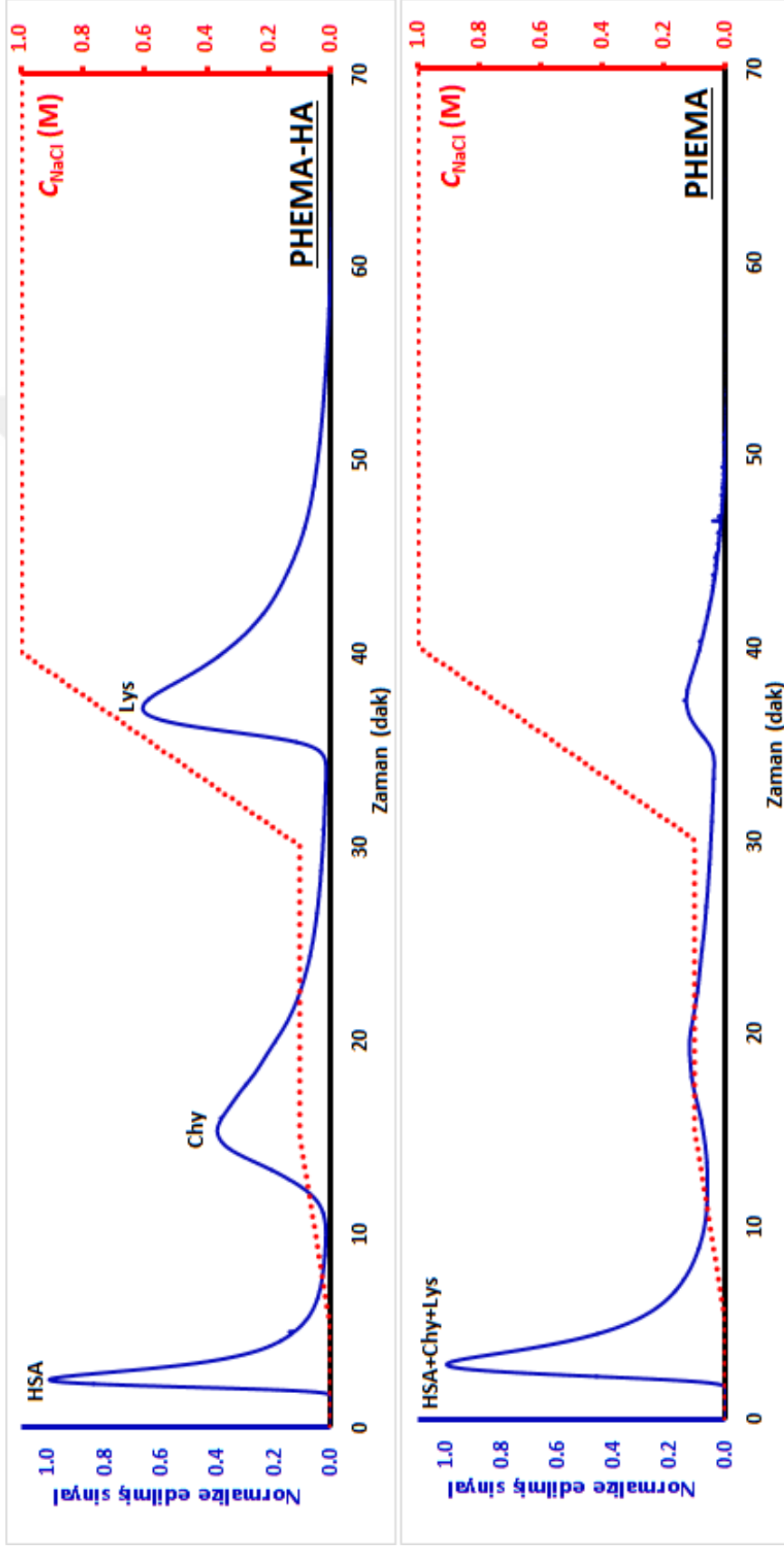


**Şekil 4. 13.** Chy, Cyt ve Lys için  $k'$ , pH ve  $\beta$  arasındaki ilişki  
 $\beta = (C_f - C_i) / t_G$ ;  $C_i$ : Hareketli fazdaki başlangıç tuz konsantrasyonu (0,00 mol/L);  $C_f$ : Hareketli fazdaki son tuz konsantrasyonu (0,50 mol/L);  $t_G$ : gradyent süresi (5; 10; 15; 20; 25 ve 30 dak); Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon: 280 nm (Chy ve Lys), 410 nm (Cyt)

### 4.2.3 Kromatografik ayırmanın optimizasyonu

Tek bileşenli numunelerle yürütülen gradyent elüsyon deneylerinden sonra birden fazla bileşen içeren numunelerdeki türlerin ayrılması ile ilgili bazı deneyler yürütülmüştür. Deneylerdeki temel beklenti, farklı izoelektrik noktalarına sahip Chy, Cyt ve Lys'nin PHEMA-HA üzerinde ayrılması yönündeydi. Fakat Chy ve Cyt'nin sergilediği alıkonma faktörlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle, bu iki türü birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır. Bu nedenle, karışım analizlerinde Cyt yerine numuneye HSA eklenerek ayırma işlemleri yürütülmüştür. HSA'nın izoelektrik noktası 4.7 dolaylarında olduğundan çalışılan pH değerlerinde (5,0; 6,0; 7,0) negatif yükle yüklenmiş bir formda bulunması ve bu nedenle de çalışılan şartlarda pozitif yükle yüklenmiş Chy ve Lys'den kolayca ayrılması beklenir. Nitekim sonuçlar, HSA'nın, hareketli fazda sadece fosfat tamponu bulunduğu, yani NaCl bulunmadığı, şartlarda bile kolonda kolaylıkla yürüdüğünü ve Chy ile Lys'den ayrıldığını göstermiştir (Şekil 4. 14). Şekilden de görüldüğü üzere, minimum sentetik işlem ile elde edilen PHEMA-HA ile 3 farklı protein, hareketli fazda sadece sulu çözeltiler kullanılarak birbirinden base-line ayrılabilmiştir. Diğer taraftan, PHEMA içeren kolon kullanıldığında, adı geçen 3 proteini birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır (Şekil 4. 14). PHEMA ve PHEMA-HA ile elde edilen kromatogramlar normalize edilmiş sinyaller cinsinden verilmiş ve böylece, özellikle PHEMA ile elde edilen kromatogramdaki base-line dalgalanmaları ile proteinlere ait pikler birbirinden ayırt edilebilmiştir. Ayrıca, her bir pikin ait olduğu proteinin tekli numuneleri kullanılarak karışımlardan elde edilen kromatogramlardaki pikler teyit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, PHEMA-HA'nın proteinlerle başlıca katyon-değişim mekanizması üzerinden etkileştiğini teyit etmiştir. Bu nedenle, katyonik formdaki Chy, Cyt ve Lys'nin Langmuir tipi etkileşimler temelinde PHEMA-HA ile etkileştiği sonucuna varılmıştır. Daha detaylı bilgi edinmek amacıyla, yüksek performanslı frontal analiz (*High Performance Frontal Analysis*, HPFA) ile farklı enjeksiyon hacimlerinde lineer olmayan kromatografik şartlarda bazı analizler yürütülmüştür.



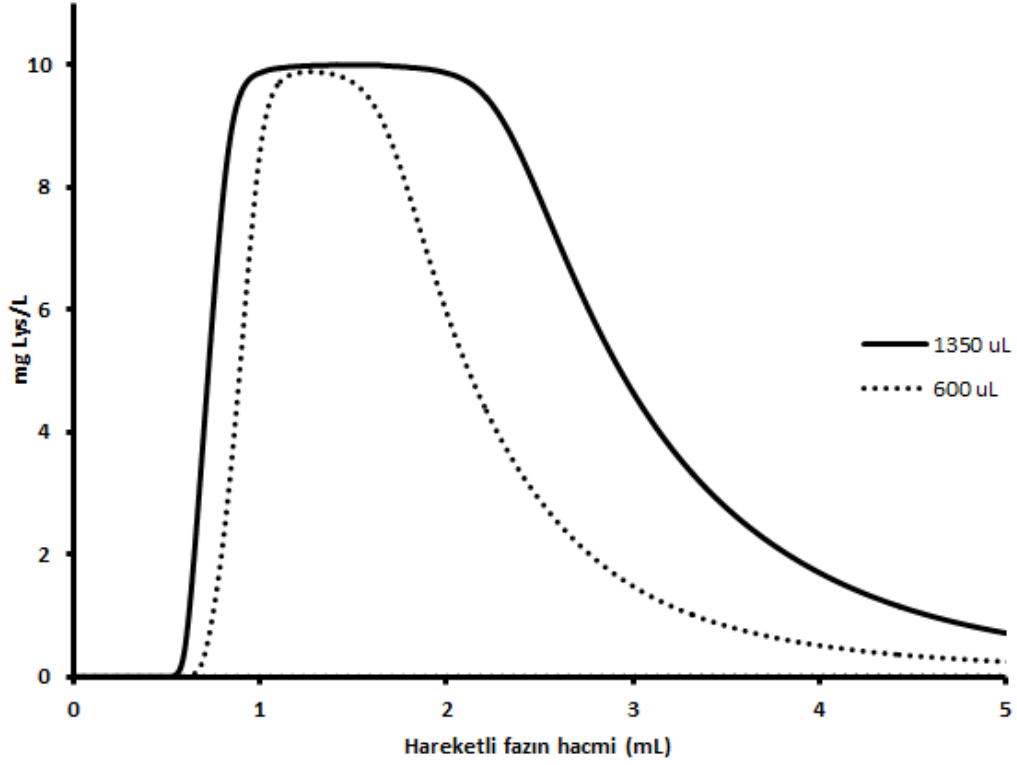
**Şekil 4. 14.** Protein karışımı için kaydedilen kromatogramlar

Hareketli fazda uygulanan tuz gradyenti şekil üzerinde gösterilmiştir. Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: 5,0x120 mm; Deteksiyon: UV 280 nm; Protein konsantrasyonu: 1,5 mg/mL (pH 7; 20 mM fosfat tamponunda); pH: 7 (20 mM fosfat tamponu); HSA: Serum albümin; Chy:  $\alpha$ -Kimotripsinojen a; Lys: Lizozim; Sabit faz: PHEMA ve PHEMA-HA

#### 4.2.4 Frontal analiz

Aşırı yükleme şartlarında yürütülen frontal analiz, sabit fazın kapasitesini belirlenmesinin yanı sıra, analit ile sabit faz arasındaki etkileşme tipinin değerlendirilmesi noktasında da önemli veriler sunar. Fakat bu metodun en büyük dezavantajlarından biri yüksek miktarda numuneye gereksinim duyulması olup, proteinler gibi pahalı türlerin adsorpsiyon izoterm verilerinin türetilmesi için tercih edilmemesine neden olmaktadır. Bu amaçla kullanılacak karakteristik noktaya göre frontal analiz (*Frontal Analysis by Characteristic Point*; FACP) ve karakteristik noktaya göre elüsyon (*Elution by Characteristic Point*; ECP) gibi teknikler ise ancak yüksek performanslı (teorik tabaka sayısı birkaç bin olan) kolonlarla verimli sonuçlar verebilmektedir.

Çalışılan proteinlerin PHEMA-HA üzerinde adsorpsiyon izoterm verilerinin türetilmesi bu çalışmanın kapsamı dışında olduğundan; alıkonma mekanizması hakkında az sayıda deney ile faydalı bilgilerin elde edilebildiği yüksek performanslı frontal analiz (*High Performance Frontal Analysis*, HPFA) tekniği ile bazı veriler elde edilmiştir. Bu amaçla, 2 farklı enjeksiyon hacminde (600 ve 1350  $\mu\text{L}$ ) aşırı yükleme deneyleri yürütülmüştür. Kaydedilen dikdörtgen enjeksiyon profilleri (*rectangular profiles*) Şekil 4. 15'te erilmiş olup, enjeksiyon hacmi arttıkça kaydedilen breakthrough eğrilerinin çıkış noktalarının gittikçe sola doğru kaydığı görülmektedir. Bu davranış, Langmuir türü etkileşmelerde görülen tipik bir durum olup (Lee ve Row 2002), etkileşmelerin teorik bir maksimum kapasiteye sahip bir sabit faz üzerinde gerçekleştiğini göstermektedir. Yani, çalışılan proteinlerin PHEMA-HA üzerindeki alıkonma davranışlarının, sınırlı sayıda fonksiyonel grup ile tek tabakalı spesifik etkileşmelere dayanan bir mekanizmaya dayandığı sonucuna varılmıştır.

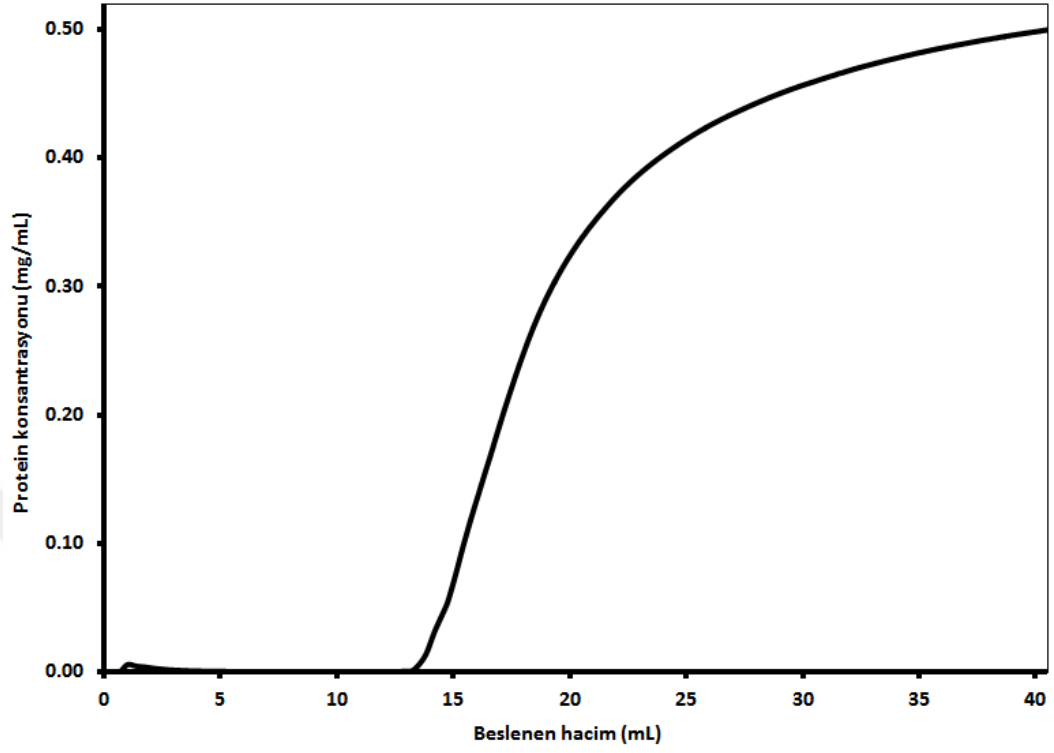


**Şekil 4. 15.** Farklı enjeksiyon hacimlerinde kaydedilen profiller

Hareketli faz: 20 mM fosfat tamponu (pH=7,0); Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: 5,0x120 mm; Deteksiyon: UV 280 nm; protein konsantrasyonu: 10 mg/mL (pH 7; 20 mM fosfat tamponunda); Enjeksiyon hacimler grafik üzerinde gösterilmiştir. Her bir enjeksiyondan sonra kolon en az 30 dak süreyle pH=7 1,0 M NaCl çözeltisi ile temizlenmiştir; Analit: Lys; Sabit faz: PHEMA-HA

HP-FA deneylerinden sonra, PHEMA-HA'nın Lys'ye karşı sergilediği gözlenen adsorpsiyon kapasitesini tayin etmek amacıyla klasik frontal analiz deneyleri yürütülmüştür. Bu amaçla, 0,5 mg/mL'lik Lys çözeltisi PHEMA-HA kolonuna 0,5 mL/dak'lık akış hızında beslenmiş ve detektörden kaydedilen breakthrough eğrisi tepe noktasına ulaşıncaya işlem tamamlanmıştır. Ölü hacim ile ilgili düzeltmeler yapıldıktan sonra, PHEMA-HA'nın Lys'ye karşı sergilediği adsorpsiyon kapasitesi hesaplanmıştır.

Şekil 4. 16'da verilen breakthrough eğrisinden PHEMA-HA'nın birim hacmi başına Lys adsorpsiyon kapasitesi 4 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer polyakrilamit esaslı kriyojeller ile elde edilen kapasitelerden (0,76 mg/mL; (Plieva vd. 2004) ve 2,5 mg/mL; (Chen vd. 2008)) daha yüksek olduğu, diğer taraftan 3-merkaptosülfonik asit immobilize edilmiş PHEMA esaslı kriyojelden (8 mg/mL; (Perçin vd. 2015)) daha düşük kapasite sergilediği görülmüştür. Hazırlama kolaylığı ve performans unsurları bir arada değerlendirildiğinde, PHEMA-HA'nın son derece faydalı bir sabit faz olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, besleme aşamasından sonra kolon 1,0 M NaCl çözeltisi ile kolayca rejenere edilebilmiş ve bir sonraki analizde kapasitede herhangi bir kayıp sergilemeksizin kullanılabilmiştir.



**Şekil 4. 16.** PHEMA-HA üzerinde kaydedilen breakthrough eğrisi  
Yükleme çözeltisi: 0,5 mg/mL; Lys (pH=7,0; 20 mM fosfat tamponunda); Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Kolon: PHEMA-HA (5,0x120 mm); Deteksiyon: UV 280 nm; Ölü hacim: 1,5 mL

## BÖLÜM V

### SONUÇ

Protein iyon-değişim kromatografisinde kullanılacak, doğal bir biyomakromolekül olan hümik asidin (HA), HEMA ve MBAAm monomerlerinin eşliğinde kriyojelleşmesi ve böylece PHEMA esaslı monolite immobilize edilmesini konu olan bu çalışmayla, elde edilen malzeme (PHEMA-HA) ve bu malzemenin kullanım alanı bakımından orijinal sonuçlar elde edilmiştir.

Elemental analiz, FTIR spektroskopisi, yüzey yük özellikleri gibi yöntem ve tekniklerle elde edilen veriler, HA'nın kriyojel matrisine (45 mgHA/gPHEMA-HA'lık bir verimle) başarılı bir şekilde immobilize edildiğini, immobilizasyon işleminden sonra kriyojelin kimyasal özelliklerinin yanı sıra morfolojisinde de önemli değişiklikler meydana geldiği görülmüştür. En belirgin değişiklikler hiç kuşkusuz yüzey yük özelliklerinde gerçekleşmiş olup, PHEMA'nın 6,2 olan  $pH_{pzc}$  değeri HA immobilizasyonundan sonra 2,4'e inmiştir. Bu durum, HA kanalıyla yüzeye immobilize olan ve asidik karaktere sahip  $-COOH$  gruplarıyla ilişkilendirilmiştir. FTIR spektrumlarında açığa çıkan yeni bantlar, yapıya HA makromoleküllerinin katıldığını göstermiştir. PHEMA-HA'nın, metakrilat esaslı kriyojellerde olduğu gibi esneklik ve süpermakrogözenekli yapı gibi tipik özellikler sergilediği görülmüştür. Bu husus, SEM ve cıva porozimetresi teknikleriyle gözlenmiştir. Buna göre, PHEMA-HA'nın genel olarak 30  $\mu m$ 'den daha büyük gözeneklere sahip olduğu ve gözeneklerin büyük bir kısmının 100  $\mu m$  dolaylarında olduğu tespit edilmiştir. Su tutma kapasitesinden ise, PHEMA-HA için 0,88'lik bir boş fraksiyon oranı bulunmuş ve buna göre elde edilen malzemenin %88'e yakın bir kısmının boşluklardan meydana geldiği anlaşılmıştır. HA'nın kriyojel yapısına kimyasal bağ oluşumu temelinde katıldığı ile ilgili en önemli bulgu,  $pH=11$ 'de yürütülen çözünürlük testleri olmuştur. Bu testlerden, 72 saat süreyle PHEMA-HA'dan ayrılan HA miktarının ancak %5 dolaylarında olduğu görülmüş ve bu nedenle PHEMA-HA'nın çalışılan deneysel şartlarda yüksek hidrolitik stabilite sergilediği sonucuna varılmıştır. Karakterizasyon işlemlerinden PHEMA-HA'nın protein kromatografisi için uygun fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır.

Hazırlanan PHEMA-HA kolonun için yürütülen kromatografik işlemler, teorik tabaka yüksekliğinin çalışılan aralıkta akış hızından bağımsız bir özellik sergilediğini göstermiştir. Bu nedenle, protein kromatografisi için kütle transfer direncine yol açabilecek bir unsur tespit edilmemiştir. Kolon performansı ile ilgili bir diğer önemli veri ise Darcy kanunu temelinde yürütülen su geçirgenliği deneylerinden elde edilmiştir. PHEMA-HA için  $k_w$  değeri  $1,12 \times 10^{-11} \text{ m}^2$  olarak hesaplanmış olup, literatürdeki verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. En önemli performans verilerinden biri de onlarca kromatografik analizden sonra kolonun performansında herhangi bir düşüşün gözlenmemiş olmasıdır. Protein örnekleri ile yürütülen tekrar analizleri, elde edilen piklerin alıkonma sürelerindeki bağıl standart sapma düzeyinin %0,35'i geçmediğini göstermiştir. Bu durum, PHEMA-HA'nın tekrar tekrar kullanılabilirliğini ve de proteinlerle tersinir bir şekilde etkileştiğini göstermiştir.

Protein iyon-değişim kromatografisi şartlarında yürütülen analizler, hareketli fazın iyon şiddetine bağlı olarak proteinlerin alıkonma sürelerinde belirgin farklılaşmaların meydana geldiğini ortaya koymuştur. Hareketli fazda uygulanan tuz gradyentinin eğimi arttıkça Chy, Cyt ve Lys'nin kolondan daha hızlı bir şekilde elue olduğu ve dolayısıyla kapasite faktörlerinin düştüğü gözlenmiştir. pH=5,0; 6,0 ve 7,0'da yürütülen gradyent elüsyon deneylerinden, pik simetrisi bakımından en uygun pH değerinin 7,0 olduğu görülmüştür. Bu temelden hareketle pH=7,0'da Chy, Cyt ve Lys içeren bir karışımla bazı analizler yürütülmüş, fakat bu analizlerde Chy ile Cyt'yi birbirinde ayırmak mümkün olmamıştır. Diğer taraftan, HSA, Chy ve Lys içeren karışımla yapılan analizlerde ise her bir protein base-line ayrılma ile verilen sırada birbirinden ayrılmıştır. İzoelektrik noktası 4,7 dolaylarında olan HSA'nın hareketli fazda hiç tuz gradyenti uygulanmadan elue olduğu, Chy ve Lys'nin ise uygun bir tuz gradyenti ile birbirinden kolayca ayrılabilirdiği tespit edilmiştir. Aynı şartlarda PHEMA ile yürütülen kontrol analizinde, HSA, Chy ve Lys birlikte elue olmuş ve dolayısıyla birbirinden ayrılamamıştır. Bu durum HA immobilizasyon işlemi ile PHEMA'nın hem kapasite hem de seçicilik özelliklerinde meydana gelen önemli farklılaşmalarla ilişkilendirilmiştir.

PHEMA-HA ile yürütülen Frontal analiz (FA) ve Yüksek Performanslı Frontal Analiz (HP-FA) deneyleri ile kolonun protein adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon mekanizması değerlendirilmiştir. FA deneylerinden elde edilen breakthrough

eğrilerinden, PHEMA-HA'nın Lys'ye karşı pH=7,0'daki gözlenen adsorpsiyon kapasitesinin 4 mg/mL dolaylarında olduğu görülmüştür. Farklı enjeksiyon hacimlerinde (600 ve 1350 µL) yürütülen HP-FA analizlerinden elde edilen sonuçlar, protein adsorpsiyon mekanizması hakkında kaba değerlendirme yapmayı mümkün kılmıştır: Enjeksiyon hacmi arttıkça alıkonma süresinin düştüğü görüldüğünden, Lys adsorpsiyonunun Langmuir tipi tutulmalara uygun bir davranış sergilediği (Lee ve Row 2002) sonucuna varılmıştır.

Elde edilen tüm veriler, bu çalışma ile ilk defa sunulan PHEMA-HA'nın protein iyon-değişim kromatografisi için uygun sabit faz özellikleri sergilediği ve sergilediği davranışların bilinen teoriler ışığında yorumlanabildiğini göstermiştir. Karmaşık sentez aşamaları olmaksızın, doğal bir makromolekülün HEMA varlığında kriyojelleşmesiyle elde edilen bu verimli ve ucuz malzemenin, başta proteinler olmak üzere, birçok türün ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Kromatografik işlemler süresince sadece sulu tuz çözeltilerinin kullanılması, proteinleri denatüre etmeden saflaştırmayı mümkün kılmasının yanı sıra, çevreyle dost yaklaşımlar sunması bakımından da önemli görülmüştür. Sonuç olarak; PHEMA-HA'nın protein iyon-değişim kromatografisi için verimli bir sabit faz olduğu ve farklı çalışmalarla sabit faz özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B., "Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent", *J. Chromatogr. A* 986, 275–290, 2003.

Arvidsson, P., Plieva, F.M., Savina, I.N., Lozinsky, V.I., Fexby, S., Bülow, L., Yu. Galaev, I. and Mattiasson, B., "Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns", *J. Chromatogr. A* 977, 27–38, 2002.

Ayyildiz, H.F., "Evaluation of new silica-based humic acid stationary phase for the separation of tocopherols in cold-pressed oils by normal-phase high-performance liquid chromatography", *J. Sep. Sci.* 38, 813–820, 2015.

Baker, H. and Khalili, F., "Analysis of the removal of lead(II) from aqueous solutions by adsorption onto insolubilized humic acid: Temperature and pH dependence", *Anal. Chim. Acta.* 516, 179–186, 2004.

Bayrakci, M., Gezici, O., Bas, S.Z., Ozmen, M. and Maltas, E., "Novel humic acid-bonded magnetite nanoparticles for protein immobilization", *Mater. Sci. Eng. C.* 42, 546–552, 2014.

Benčina, M., Podgornik, A. and Štrancar, A., "Characterization of methacrylate monoliths for purification of DNA molecules", *J. Sep. Sci.* 27, 801–810, 2004.

Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A. and Denizli, A., "Antibody purification using porous metal-chelated monolithic columns", *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 395–404, 2006.

Bigalke, M., Weyer, S. and Wilcke, W., "Copper isotope fractionation during complexation with insolubilized humic acid", *Environ. Sci. Technol.* 44, 5496–5502, 2010.

Bulman, R.A., Szabó, G., Clayton, R.F. and Clayton, C.R., "Investigations of the uptake of transuranic radionuclides by humic and fulvic acids chemically immobilized on silica

gel and their competitive release by complexing agents", *Waste Manag.* 17, 191–199, 1998.

Carvalho, B.M.A., Da Silva, S.L., Da Silva, L.H.M., Minim, V.P.R., Da Silva, M.C.H., Carvalho, L.M. and Minim, L.A., "Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications", *Sep. Purif. Rev.* 43, 241–262, 2014.

Celebi, O. and Erten, H.N., "Sorption of phenol and radioactive cesium onto surfactant modified insolubilized humic acid", *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 284, 669–675, 2010.

Chen, J., Jo, S. and Park, K., "Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery", *Carbohydr. Polym.* 28, 69–76, 1995.

Chen, F., Yao, K.J., Shen, S. and Yun, J., "Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid", *Chem. Eng. Sci.* 63, 71–77, 2008.

Courtois, J., Byström, E. and Irgum, K., "Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation", *Polymer (Guildf)*. 47, 2603–2611, 2006.

van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J. and Klinkenberg, A., "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography", *Chem. Eng. Sci.* 50, 3869–3882, 1995.

Gezici, O., Kara, H., Ersöz, M. and Abali, Y., "The sorption behavior of a nickel-insolubilized humic acid system in a column arrangement" *J. Colloid Interface Sci.* 292, 381–391, 2005.

Gezici, O., Küçükosmanoğlu, M. and Ayar, A., "The adsorption behavior of crystal violet in functionalized sporopollenin-mediated column arrangements", *J. Colloid Interface Sci.* 304, 307–316, 2006.

Gezici, O., Kara, H., Ayar, A. and Topkafa, M., "Sorption behavior of Cu(II) ions on insolubilized humic acid under acidic conditions: An application of Scatchard plot analysis in evaluating the pH dependence of specific and nonspecific bindings", *Sep. Purif. Technol.* 55, 132–139, 2007a.

Gezici, O., Kara, H., Yanik, S., Ayyildiz, H.F. and Kucukkolbasi, S., "Investigating sorption characteristics of copper ions onto insolubilized humic acid by using a continuously monitored solid phase extraction technique", *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 298, 129–138, 2007b.

Gezici, O. and Kara, H., "Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and HILIC behavior", *Talanta* 85, 1472–1482, 2011a.

Gezici, O. and Kara, H., "Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and LEC behavior", *Talanta* 85, 2405–2410, 2011b.

Gezici, O., Guven, I., Özcan, F., Ertul, S. and Bayrakci, M., "Humic-makeup approach for simultaneous functionalization of polyacrylonitrile nanofibers during electrospinning process, and dye adsorption study", *Soft Mater.* In press, 2016.

Guczi, J., Angelova, A., Bulman, R.A. and Szabo, G., "Investigation of the interactions of 110mAg+ and 125I- with humic acid chemically immobilized on silica gel", *React. Polym.* 17, 61–68, 1992.

Hanora, A., Plieva, F.M., Hedström, M., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B., "Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B", *J. Biotechnol.* 118, 421–433, 2005.

Josic, D., Buchacher, A. and Jungbauer, A., "Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion", *J. Chromatogr. B* 752, 191–205, 2001.

Jungbauer, A. and Hahn, R., "Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology", *J. Sep. Sci.* 27, 767–778, 2004.

Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum, 2000.

Klavins, M. and Eglte, L., "Immobilisation of humic substances", *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 203, 47–54, 2002.

Koopal, L.K., Yang, Y., Minnaard, A.J., Theunissen, P.L.M. and Van Riemsdijk, W.H., "Chemical immobilisation of humic acid on silica", *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 141, 385–395, 1998.

Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B., "Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel", *J. Immunol. Methods*. 283, 185–194, 2003.

Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P.K. and Mattiasson, B., "Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line", *J. Chromatogr. A*. 1103, 35–42, 2006.

Kumar, A. and Srivastava, A., "Cell separation using cryogel-based affinity chromatography", *Nat. Protoc.* 5, 1737–1747, 2010.

Lee, J.-W. and Row, K.H., "Comparison of Frontal Analysis and Elution-Curve Method for Determining Adsorption Isotherms", *Chinese J. Chem. Eng.* 10, 720–722, 2002.

Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H. and Mattiasson, B., "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest", *Trends in Biotechnol.* 21, 445–451, 2003.

Mayes, A.G. and Mosbach, K., "Molecularly imprinted polymers: Useful materials for analytical chemistry?", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, 1997.

Perçin, I., Khalaf, R., Brand, B., Morbidelli, M. and Gezici, O., "Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel", *J. Chromatogr. A*. 1386, 13–21, 2015.

Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B., "Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles", *J. Chromatogr. A*. 1, 129–137, 2004.

Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S. and Galaev, I.Y., "Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels", *Soft Matter*. 1, 303–309, 2005.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B., "Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications", *J. Sep. Sci.* 30, 1657–1671, 2007.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W. and Mattiasson, B., "Cryogel applications in

microbiology", *Trends in Microbiology* 16, 543–551, 2008.

Podgornik, A., Barut, M., Strancar, A., Josic, D. and Koloini, T., "Construction of large-volume monolithic columns" *Anal. Chem.* 72, 5693–5699, 2000.

Sargin, İ., Arslan, G. and Erzenin, M., "Interactions of bovine serum albumin with humic acid – Cu ( II ) aggregates in poly ( hydroxyethylmethacrylate ) cryogel column", *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 63, 101–106, 2016.

Seki, H. and Suzuki, A., "Adsorption of Heavy-Metal Ions Onto Insolubilized Humic Acid", *J. Colloid Interf. Sci.* 171, 490–494, 1995.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. and Crouch, S.R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, **Brooks/Cole**, USA, 2014.

Stevenson, F.J., *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, **John Wiley & Sons**, USA, 1994.

Svec, F. and Frechet, J.M.J., " Molded Rigid Monolithic Porous Polymers: An Inexpensive, Efficient, and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications ", *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 34–48, 1999.

Szabo, G., Prosser, S.L. and Bulman, R.A., "Prediction of the adsorption coefficient (Koc) for soil by a chemically immobilized humic acid column using RP-HPLC", *Chemosphere* 21, 729–739, 1990.

Tipping, E., *Cation Binding by Humic Substances*, **Cambridge University Press**, West Nyack, NY, USA, 2002.

Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersoz, A. and Denizli, A., "Poly(ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography", *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 6507–6513, 2004.

Wang, C. and Sun, Y., "Double sequential modifications of composite cryogel beds for enhanced ion-exchange capacity of protein", *J. Chromatogr. A.* 1307, 73–79, 2013.

Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K. and Yao, S.J., "Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds", *Biochem.*

*Eng. J.* 42, 237–242, 2008.

Wulff, G., "Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies", *Angew. Chemie Int. Ed. English* 34, 1812–1832, 1995.

Xie, S., Svec, F. and Fréchet, J.M.J., "Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: Poly(2-vinyl-4;4 dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths", *Biotechnol. Bioeng.* 62, 30–35, 1999.

Yao, K., Yun, J., Shen, S., Wang, L., He, X. and Yu, X., "Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography", *J. Chromatogr. A* 1109, 103–110, 2006.

Ye, L. and Mosbach, K., "Polymers recognizing biomolecules based on a combination of molecular imprinting and proximity scintillation: A new sensor concept", *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2901–2902, 2001.

Yun, J., Tu, C., Lin, D.Q., Xu, L., Guo, Y., Shen, S., Zhang, S., Yao, K., Guan, Y.X. and Yao, S.J., "Microchannel liquid-flow focusing and cryo-polymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation", *J. Chromatogr. A.* 1247, 81–88, 2012.

Yun, J.X., Xu, L.H., Lin, D.-Q., Yao, K.J. and Yao, S.-J., Fabrication and Characterization of Cryogel Beads and Composite Monoliths. In: Kumar, A. (ed.) Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications. *CRC Press, Taylor & Francis Group*, Boca Raton, USA, 2016.

## ÖZ GEÇMİŞ

Ahmet Eren ÖZKAN, 01.06.1980 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk orta ve lise öğretimini Ankara'da tamamladı. 1997 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Haziran 2003'te mezun oldu. 2004-2007 yılları arasında Samur Halıları A.Ş.'de mühendis olarak çalıştı. 2007 yılından beri Kara Kuvvetleri Komutanlığında sivil mühendis olarak çalışmaktadır. 2014 yılında Niğde Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli ve 1 çocuk babasıdır.

