



T.C.
NIĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

KRİYOJEL DESTEK KATISINA KALİKSAREN
İMMOBİLİZASYONU VE PROTEİN İYON-DEĞİŞİM
KROMATOĞRAFİSİNDE SABİT FAZ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

İDRİS GÜVEN

Haziran 2019

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

KRİYOJEL DESTEK KATISINA KALİKSAREN
İMMOBİLİZASYONU VE PROTEİN İYON-DEĞİŞİM
KROMATOGRAFİSİNDE SABİT FAZ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

İDRİS GÜVEN

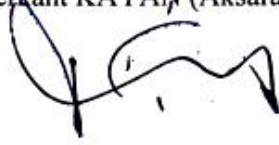
Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Prof. Dr. Orhan GEZİCİ

Haziran 2019

İdris GÜVEN tarafından **Prof. Dr. Orhan GEZİCİ** danışmanlığında hazırlanan “**Kriyojel Destek Katısına Kaliksaren İmmobilizasyonu ve Protein İyon-Değişim Kromatografisinde Sabit Faz Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Ana Bilim Dalı**’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : | Prof. Dr. Berkant KAYAŃ (Aksaray Üniversitesi) |



Üye : | Prof. Dr. Orhan GEZİCİ (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi) |



Üye : | Doç. Dr. Yeliz KONUKLU (Niğde Ömer Halisdemir 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.



İdris GÜVEN



ÖZET

KRİYOJEL DESTEK KATISINA KALIKSAREN İMMOBİLİZASYONU VE PROTEİN İYON-DEĞİŞİM KROMATOĞRAFİSİNDE SABİT FAZ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

GÜVEN, İdris

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Orhan GEZİCİ

Haziran 2019, 76 sayfa

Bu çalışmada; asidik fonksiyonel gruplar içeren bazı kaliks[4]aren türevleri (tetrakarboksilato kaliks[4]aren (CLX-COO), tetrasülfonato kaliks[4]aren (CLX-SO₃) ve tetrafosfonato kaliks[4]aren (CLX-PO₄)) kriyojel esaslı monolitik bir destek katısına (poly(2-hidroksietilmetakrilat)-*co*-glisidilmetakrilat, (PHEMA-GMA)) kimyasal yoldan immobilize edilmiştir. Karakterizasyondan sonra protein iyon-değişim kromatografisi şartlarındaki sabit faz özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Alıkonma özellikleri hem lineer hem de non-lineer kromatografi şartlarında incelenmiş ve bu amaçla çalışmalarda bazı model proteinler kullanılmıştır. Deneysel parametre olarak hareketli fazın pH değeri ve hareketli fazdaki tuz gradyentinin eğimi (β) çalışılmıştır. Aşırı yükleme şartlarında kaydedilen breakthrough eğrilerinden ise her bir sabit fazın Lys'ye karşı sergilediği dinamik adsorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir. P-CLX-COO, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazlarının Lys adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 130 mg/g, 260 mg/g ve 340 mg/g olarak bulunmuştur. Bu çalışma ile kaliksaren ve kriyojel kimyası ilk defa buluşturulmuş ve elde edilen malzemelerin protein iyon-değişim kromatografisindeki sabit faz potansiyelleri ilk defa kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ayırım yöntemleri, breakthrough eğrisi, frontal analiz, hplc, immobilizasyon, iyon-değişimi, kaliksaren, kriyojel, kromatografi, monolitik malzemeler, protein

SUMMARY

CALIXARENE IMMOBILIZATION ON CRYOGEL SOLID SUPPORT AND INVESTIGATING THE USABILITY OF THE PREPARED STATIONARY PHASES IN PROTEIN ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

GÜVEN, İdris

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Orhan Gezici

June 2019, 76 pages

In the present study, some calix[4]arene derivatives (i.e. tetracarboxylate calix[4]arene, CLX-COO, tetrasulfonate calix[4]arene, CLX-SO₃, and tetraphosphonate calix[4]arene, CLX-PO₄) were immobilized onto a monolithic cryogel support (i.e. poly(2-hydroksyethylmethacrilate-*co*-glycidyl methacrylate, P). After characterization, the stationary phase properties were studied in detail. Protein retention behavior was investigated under both linear and nonlinear chromatography conditions, and for this purpose, some model proteins were used. pH of the mobile phase and gradient slope (β) for the salt concentration in the mobile phase were the experimental parameters studied. Dynamic adsorption capacities for the adsorption of Lys on each of the stationary phase was determined from the breakthrough curves recorded under overloading conditions. Lys adsorption capacities were found as 130 mg/g, 260 mg/g, and 340 mg/g, for P-CLX-COO, P-CLX-SO₃, and P-CLX-PO₄, respectively. Hence, calixarene and cryogel chemistries have been connected to each other for the first time through the present work, and the potential of the prepared materials as stationary phase in protein ion-exchange chromatography has been studied in detail for the first time.

Keywords: Breakthrough curves, calixarene, chromatography, cryogel, frontal analysis, hplc, immobilization, ion-exchange, monolithic materials, protein, separation methods

ÖN SÖZ

Günümüzün –belki de– en çok çalışılan supramoleküllerinden olan kaliksareneler, ayırma ve saflaştırma yöntem/tekniklerinde de yaygın bir kullanım alanı bulmuş ve yeni-tip fonksiyonel malzemelerin sentezlenmesinde kilit rol üstlenmiştir. Konik yapılarının alt ve üst bölgelerinin ayrı ayrı fonksiyonlandırılabilmesi ve uygun fonksiyonel gruplar üzerinden destek katılarına başarılı bir şekilde immobilize edilebilmeleri kaliksarenelerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) için alternatif ayırma ortamlarının hazırlanmasında faydalı olmuştur. Farklı tip fonksiyonel grupların kaliksaren yapısına dâhil edilebilmesinin yanı sıra konik yapının boyutunun ayarlanabilmesi ile iyon-değişim, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı, π - π etkileşimleri ve inklüzyon kompleksleşmesi gibi çok farklı etkileşim özelliklerini sergileyebilen kaliksaren esaslı multifonksiyonel HPLC sabit fazlarının hazırlanması mümkün olmuştur. Fonksiyonel kaliksarenlerin granüler özellikteki silika ve polimerik destek katılarına immobilizasyonu çok kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmakla birlikte; kriyojeller gibi makro güzenekli monolitik destek katılarına immobilizasyonu üzerinde yoğunlaşan çalışmaların yok denilecek kadar az olduğu görülmektedir.

Literatürdeki bu boşluktan hareketle; Prof. Dr. Orhan Gezici'nin danışmanlığında 24 ay süreyle yürütülen bir TÜBİTAK projesi (proje no: 115Z236) ile bu konu çok kapsamlı bir incelemeye tabi tutulmuştur. Bu bağlamda, hem sunduğu finansal destekten dolayı TÜBİTAK'a, hem de sunduğu tüm laboratuvar ve kütüphane alt yapısı nedeniyle üniversitemize içtenlikle teşekkür etmek isterim. Bursiyer olarak görev aldığım bu projeden elde edilen veriler, sunduğum bu yüksek lisans tezimin şekillenmesinde de temel teşkil etmiştir. Elde ettiğimiz verilerin bir kısmı etki değeri yüksek bir dergide yayınlanmış ve konuyla ilgili araştırmacılardan olumlu tepkiler almıştır.

Çalışmalar süresince yardımını esirgemeyen, bilgi ve birikimleri ile her türlü desteği veren danışmanım sayın Prof. Dr. Ohan GEZİCİ hocama çok teşekkür eder; sunulan bu çalışmanın konuyla ilgilenen araştırmacılara yeni ufuklar açmasını temenni ederim.

Son olarak; desteklerini esirgemeyen aileme ve Sinem Yıldırım'a şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kaliksarenler	5
2.2 Kaliksarenlerin İmmobilizasyon	6
2.3 Kriyojeller	8
2.4 Protein Kromatografisi	9
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD	11
3.1 Kimyasallar ve Sulu Çözeltiler	11
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	13
3.3 Kaliksaren Türevlerinin Sentezi	14
3.4 Kriyojel Destek Katısının Sentezi	16
3.5 Kaliksaren İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu	16
3.6 Monolitik Sabit Fazların Karakterizasyonu	18
3.6 Kromatografik İşlemler	21
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1 Kaliksaren Türevlerinin Karakterizasyonu	23
4.2 Kaliksaren-İmmobilize Edilmiş Monolitlerin Karakterizasyonu	30
4.2.1 SEM analizleri	30
4.2.2 Gözenek dağılımı analizi için civa porozimetrisi ölçümleri	32
4.2.3 Elemental analiz	33
4.2.4 FTIR spektroskopisi analizleri	33
4.2.5 P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ için izoelektrik nokta tayini	35
4.2.6 P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ için titrimetrik analizler	37

4.3 Kromatografik İşlemler	38
4.3.1 Monolit için su geçirgenliği analizi	38
4.3.2 Akış hızı-teorik tabaka ilişkisi	40
4.3.3 pH, gradyent eğimi ve kapasite faktörleri arasındaki ilişkinin incelenmesi	41
4.3.4 Kromatografik ayırmalar	47
4.3.5 Alıkonma mekanizmasının irdelenmesi.....	52
4.3.6 Veriler için istatistiksel değerlendirmeler	55
4.3.7 Sabit fazlar için dinamik adsorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi	56
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	61
KAYNAKLAR	64
ÖZ GEÇMİŞ	75
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi	12
Tablo 4.2. Hazırlanan sabit fazlardaki asidik fonksiyonel grupların miktarı	38
Tablo 4.3. Literatürdeki kriyojel esaslı monolitik malzemeler için elde edilmiş su geçirgenliği, k_w , değerleri.....	40
Tablo 4.4. İzokratik ve gradyent elüsyon şartlarında kaydedilen veriler için bazı istatistiksel değerlendirmeler.....	56
Tablo 4.5. Çeşitli monolitik kriyojeller kullanılarak Lys için elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri (gözlener kapasiteler)	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kaliks[4]aren için moleküler yapının temsili bir gösterimi (lower rim: fenolik oksijen bölgesi, upper rim: fenolik halkaların para pozisyonu).....	6
Şekil 3.1. p-tert-bütikaliks[4]aren sentezi.....	14
Şekil 3.2. CLX-PO ₄ sentezi için genel bir gösterim	15
Şekil 3.3. CLX-COOH sentezi için genel bir gösterim	15
Şekil 3.4. CLX-SO ₃ sentezi için genel bir gösterim	15
Şekil 3.5. Kaliksaren türevlerinin monolitik destek katısına (P) immobilizasyonundan sonra elde edilen monolitik sabit fazların moleküler yapısı için temsili bir gösterim	17
Şekil 3.6. Kaliksaren immobilizasyonunda kullanılan deney düzeneği	18
Şekil 4.1. CLX-PO ₄ için ¹ H-NMR spektrumu.....	24
Şekil 4.2. CLX-PO ₄ için ¹³ C-NMR spektrumu.....	24
Şekil 4.3. CLX-PO ₄ için ³¹ P-NMR spektrumu.....	25
Şekil 4.4. CLX-PO ₄ için FTIR spektrumu.....	25
Şekil 4.5. CLX-COOH için ¹ H-NMR spektrumu.....	26
Şekil 4.6. CLX-COOH için ¹³ C-NMR spektrumu.....	27
Şekil 4.7. CLX-COOH için FTIR spektrumu.....	27
Şekil 4.8. CLX-SO ₃ için ¹ H-NMR spektrumu.....	29
Şekil 4.9. CLX-SO ₃ için ¹³ C-NMR spektrumu.....	29
Şekil 4.10. CLX-SO ₃ için FTIR spektrumu.....	30
Şekil 4.11. Hazırlanan kaliksaren türevleri için toplu FTIR spektrumları.....	30
Şekil 4.12. P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ için SEM imajları.....	31
Şekil 4.13. Hazırlanan monolitik sabit fazlar için gözenek dağılımı grafikleri.....	32
Şekil 4.14. P, P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ için toplu FTIR spektrumları.....	35
Şekil 4.15. P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ için zeta potansiyeli ölçümleri.....	37
Şekil 4.16. Akış hızı ile basınç düşüşü arasındaki ilişki.....	39
Şekil 4.17. Teorik tabaka sayısı, N, ile akış hızı arasındaki ilişki	41

Şekil 4.18. PHEMA-CLX-COOH üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar	44
Şekil 4.19. PHEMA-CLX-SO ₃ üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar	45
Şekil 4.20. PHEMA-CLX-PO ₄ üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar	46
Şekil 4.21. Gradyent eğiminin kromatografik bantlar üzerine etkisinin grafiksel gösterimi.....	47
Şekil 4.22. P-CLX-COOH sabit fazı üzerinde kaydedilen kromatogram.....	48
Şekil 4.23. P-CLX-SO ₃ üzerinde kaydedilen ve ayırmanın iyileştirilmesine yönelik bazı kromatogramlar	49
Şekil 4.24. P-CLX-SO ₃ üzerinde çeşitli gradyentlerde kaydedilen kromatogramlar	50
Şekil 4.25. P-CLX-PO ₄ üzerinde farklı gradyentlerde kaydedilen ve ayırmanın optimizasyonuna yönelik bazı kromatogramlar	51
Şekil 4.26. P-CLX-PO ₄ ile farklı karışımlardan bazı model proteinlerin ayrılmasına ilişkin kromatogramlar	52
Şekil 4.27. Destek katısı (P), P-CLX-COOH, P-CLX-SO ₃ ve P-CLX-PO ₄ üzerinde Lys için kaydedilen breakthrough yükleme eğrileri.....	59

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
β	Gradyent eğimi (mM/dak)
C	Molar konsantrasyon (mol/L)
ε	Kolonun toplam boş fraksiyonu
k'	Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)
t_G	Gradyent süresi (dak)
t_R	Alıkonma süresi (dak)
t_M	Ölü zaman (dak)
Kısaltmalar	Açıklama
APS	Amonyum persülfat
Chy	α -Kimotripsinojen a
Cyt	Sitokrom c
dak	Dakika
d_w	Suyun Özkütlesi
FTIR	Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HETP	Teorik Tabakaya Eşdeğer Yükseklik
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSA	İnsan Serum Albümini
k_w	Su Geçirgenliği (Darcy Kanunu)
Lys	Lisozim
Mb	Miyogloblin
MBAAm	N,N'-Metilenbisakrilamid
mAU	Miliabsorbans Birimi
N	Teorik Tabaka Sayısı
PHEMA	Poly(hidroksietilmetakrilat)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletan-1,2-diamin
UV-Vis	Morötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

BÖLÜM I

GİRİŞ

Sunduğu verimli ve esnek yönler nedeniyle HPLC, günümüzün en çok başvurulan analiz tekniklerinden biri olmuştur. Diğer kromatografik tekniklerde olduğu gibi, HPLC’de de ayırmada en büyük rolü sabit faz üstlenir. Bu nedenle, sabit fazın ayırma performansını geliştirmeye yönelik çabalar doğrudan ayırma verimine yansıtacaktır. Sabit fazın kimyasal özelliklerindeki küçük değişiklikler dahi bazen ayırmada çok büyük farklılaşmalara yol açabilmektedir. Bu gerçeklik, farklı özelliklere sahip yüzlerce sabit fazın kromatografik performanslarının incelenmesini haklı ve önemli kılmaktadır.

Halkalı oligomerlerden olan kaliksarenler; farklı gruplar ile fonksiyonlandırılabilme ve bir destek katısına immobilize edilebilme esnekliğini sunan bir kimyaya sahip olmaları nedeniyle, HPLC sabit fazlarının tasarlanmasında kaliksarenlerin destek katısına immobilizasyonu çok yoğun çalışılan konulardan biri olmuştur (Arduini vd., 1991; Gezici and Bayrakci, 2015).

Kaliksaren esaslı sabit fazlar çeşitli kromatografik modlarda yaygın bir şekilde kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Uygulamaların gaz kromatografisinden HPLC’ye kadar geniş bir yelpazede seyrettiği görülmektedir (Gezici and Bayrakci, 2015; Mňuk and Feltl, 1995). Bununla birlikte, kaliksaren-esaslı sabit fazların en çok kullanıldığı kromatografi türü HPLC olmuştur. Yapılan çalışmaların genel yapısı hakkında kısa bir literatür bilgisi vermek gerekirse:

Bazı monosüstitüe fenollerin ve bazı aromatik bileşiklerin kromatografik analizlerinde sülfonat grubu içeren bir kaliks[6]aren türevi kullanılmış olup, çalışılan türlerin genel olarak birbirinden ayrılabilirdiği görülmüştür (Lee vd., 1997).

Bir diğer çalışmada ise bazı süstitüte benzoik asitlerin kromatografik ayrılmaları bir kaliks[4]aren türevi immobilize edilmiş bir silika sabit fazı ile gerçekleştirilmiş olup; ayırma mekanizmasında çoklu etkileşimlerin rol aldığı tespit edilmiştir (Mňuk vd., 1996).

p-tert-bütül-kaliks[4]aren bağı bir silika sabit fazı üzerinde bazı disüstitüe benzenlerin, polisiklik aromatik hidrokarbonların ve bazı nükleositlerin kromatografik davranışları incelenmiş ve çalışılan sabit fazın ters-faz davranışının belirgin olduğu görülmüştür. Bu çalışmadaki en önemli bulgulardan bir tanesi, çalışılan sabit fazın aminli türlere karşı daha yüksek seçicilik sergilemiş olmasıdır. Bu seçicilik, kaliksaren yapısındaki fenol gruplarına atfedilmiştir. Sabit fazın etkileşim davranışında π - π , inklüzyon ve yük-transfer etkileşmelerinin rol aldığı düşünülmüştür (Xu vd., 1998).

Kaliksaren-esaslı HPLC sabit fazlarının genel karakterine bakıldığı zaman, türlerin alıkonma özelliklerinin belirlenmesinde tek-tip bir etkileşim mekanizmasından ziyade hidrofobik etkileşimler, polar-polar etkileşimleri, iyonik etkileşmeler ve inklüzyon kompleksleşmesi gibi çok farklı mekanizmaların rol aldıkları görülmüştür (Xiao vd., 2002).

Daha önce de belirtildiği gibi, farklı moleküler büyüklüğe sahip kaliksaren tüvelerinin (ör. Kaliks[4]aren, kaliks[6]aren ve kaliks[8]aren) bir destek katısına immobilize edildikten sonra HPLC’de sabit faz olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Friebe vd., 1995; Gebauer vd., 1998; Li vd., 2004b, 2004a; Xiao vd., 1999; Xu vd., 1998). Kaliksaren-esaslı HPLC sabit fazlarının çok çeşitli kimyasal türlerin analizlerinde kullanıldığı görülmektedir. Bu kapsamda, çalışılan türlerden bazıları şunlar olmuştur: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (Deng vd., 2014; Huai vd., 2004; Śliwka-Kaszyńska vd., 2010; Xiao vd., 1999), bazı aromatik karboksilik asitler (Li vd., 2004b), nükleositler ve nükleobazlar (Gezici vd., 2006b; Li vd., 2004c), bazı vitaminler (Li vd., 2004c, 2004d), bazı steroidler (Liu vd., 2005), alkali metal katyonları (Arena vd., 2002), bazı süstitüe benzenler (Deng vd., 2014), fenoller, aromatik aminler ve benzoik asit türevleri (Hu vd., 2011).

Kaliksaren esaslı HPLC sabit fazları ile yapılan çalışmalara bakıldığında; geniş bir yelpazede çok sayıda kimyasal türün çalışıldığı ve kaliksaren moleküllerinin büyüklüğü ile konik yapının alt ve üst bölgelerine bağlanan fonksiyonel grubun etkisinin de yoğun bir şekilde çalışıldığı görülmektedir. Bu her iki parametrenin ayırma verimliliği ve türlere karşı sergiledikleri seçicilik üzerinde önemli etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Destek katısı olarak ise çoğunlukla granüler yapıdaki silika-esaslı

malzemeler ve polimerik destek katılarının kullanıldığı anlaşılmaktadır (Chamseddin and Jira, 2013; Sokoließ vd., 2000, 2003).

Literatür araştırmasından da görüldüğü üzere, kaliksarenlerin immobilizasyonunda en çok kullanılan destek katıları granüler özellikteki malzemeler olmuştur. Bu şekilde hazırlanan malzemeler başlıca molekül ağırlığı küçük türlerin kromatografik ayırmalarında kullanılmıştır. Diğer taraftan; kaliksaren esaslı sabit fazların proteinler gibi molekül ağırlığı yüksek türlerin ayırma-safılaştırma işlemlerinde kullanımına yönelik çalışmaların görece daha düşük sayıda olduğu söylenebilir. Protein kromatografisinde kullanılacak destek katısının yeterince büyük gözenek yapısına sahip bir morfoloji sunması hem kaliksaren gibi supramoleküllerin immobilizasyonunda hem de proteinlerin sabit fazın gözenekli yapısında etkin bir şekilde transferinde kritik öneme sahiptir.

Ayırma ortamı olarak kriyojeller; sundukları uygun morfoloji ve post-türevleme işlemlerine uygun kimyaları nedeniyle özellikle biyolojik öneme sahip türlerin ayırma-safılaştırma işlemlerinde çok yaygın kullanım alanı bulmuştur (Kumar vd., 2006; Lozinsky vd., 2001; Özkan vd., 2018; Perçin vd., 2015; Singh vd., 2014). Protein ayırma-safılaştırma işlemlerinde kriyojellerin zengin bir literatür sunduğu görülmektedir. Kriyojellerin sabit faz olarak kullanıldığı bazı kromatografik uygulamalara örnek olarak iyon-değişim kromatografisi (Özkan vd., 2018; Perçin vd., 2015; Singh vd., 2014), sterik dışlama kromatografisi (Wang vd., 2014), afinite kromatografisi (Asliyuçe vd., 2016; Kumar vd., 2006; Yılmaz vd., 2009) verilebilir.

Bu uygulamalarda genel olarak kriyojel destek katısı 3-Merkaptopropan sülfonik asit (Perçin vd., 2015), aminoalkil grupları (Singh vd., 2014), iminodiasetik asit (Kumar vd., 2006) ve hümik asit (Özkan vd., 2018) gibi amaca uygun ligandlarla fonksiyonlandırılmıştır.

Kriyojeller, 0 °C'nin altında elde edilen hidrojel olup (Lozinsky vd., 2001), uygun monomerler kullanılarak hazırlanan kriyojeller, kaliksaren immobilizasyonu için son derece uygun platformlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte literatürde, birkaç çalışma hariç (Güven vd., 2018), kaliksarenlerin kriyojellere immobilizasyonu ve elde edilen malzemelerin protein kromatografisinde sabit faz olarak kullanılabilirliğinin

kapsamlı bir şekilde incelendiği çalışmalara rastlanmamaktadır. Literatürden, kaliksaren esaslı sabit fazların daha çok küçük moleköl ağırlıklı türlerin kromatografik işlemlerinde kullanıldığı (Gezici and Bayrakci, 2015; Ludwig 2000; Sliwka-Kaszynska, 2007), protein kromatografisi alanındaki çalışmaların görece sınırlı düzeyde kaldığı anlaşılmaktadır. Destek katısı olarak kriyojellerin sergilediği çok düşük kütle transfer direnci nedeniyle bu malzemeler yüksek akış hızlarında çalışabilme olanağını da sunmaktadır (Plieva vd., 2004; Yao vd., 2007).

İyon-değişim kromatografisi, proteinleri verimli ve ucuz şekilde saflaştırmak için kullanılan önemli bir yöntemdir. Kullanılan hareketli fazların evre için büyük bir tehdit oluşturmaması ve proteinleri denatüre etmeden saflaştırabilme imkânı sunan bir yöntem olması nedeniyle yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Özkan vd., 2018; Perçin vd., 2015). Protein iyon-değişim kromatografisinde hareketli faz olarak sulu çözeltiler kullanılmakta ve ayırma, proteinlerin izoelektrik noktalarındaki ve yük yoğunluklarındaki farklılaşmalar temelinde gerçekleşmektedir.

Sunulan bu çalışmada; iyon-değiştirici fonksiyonel gruplar içeren bazı kaliks[4]arenlerin monolitik kriyojel destek katısına kimyasal yoldan immobilize edilmesi ve elde edilen malzemelerin protein iyon-değişim kromatografisinde sabit faz olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

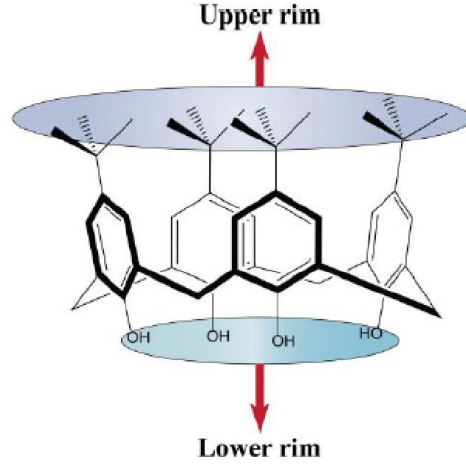
BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Kaliksarenler

Makrosiklik bileşenlerin bir sınıfı olan kaliksarenler, fenolik birimlerin birbirlerine metilen köprüleri ile bağlanmasıyla oluşan halkalı yapılardır. 1872’de Adolph Von Baeyer tarafından keşfedildikten sonra kaliksarenlerin kullanım alanları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olup, kaliksarenlerin bu denli farklı alanlarda kullanılmış olması kaliksaren kimyasının esnekliğine atfedilmektedir (Gezici and Bayrakci, 2015). Bu halkalı yapılar, kuvvetli asitlerin varlığında aldehit ve fenollerin tepkime ürünleri olarak ortaya çıkmıştır. Erken keşiflerine rağmen 1944-1952 yıllarında Zinke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara kadar, moleküler yapıları ile ilgili detaylı bilgiler bulunmamaktaydı (Zinke and Ziegler, 1944). Supramoleküller olarak isimlendirilen grubun bir üyesi olan kaliksarenlerin sentezi için en yaygın örneklerden bir tanesi p-tert-bütilfenol ile formaldehitin tepkimesi sonucu oluşan üründür. Bu ürün için halkalı bir tetrametrik yapı önerilmiştir. 1970’lerin sonlarına doğru Gutsche ve arkadaşlarının çalışmaları fenol-formaldehit ürünleri kimyası üzerine büyük bir etki yarattı (Gutsche vd., 1981).

Günümüzde kaliksarenlerin isimlendirilmesi için kabul görmüş bir sistematik mevcuttur. Örneğin, kaliks[n]aren olarak belirtilen bir yapıda “n” sayısı molekülü meydana getiren (ve birbirlerine metilen, $-CH_2-$, köprüleri ile bağlanmış) fenolik birimlerin sayısını belirtir. Yapıya bağlı fonksiyonel gruplar ayrıca belirtilir. Kaliks[4]aren, kaliks[6]aren ve kaliks[8]aren yapıları yüksek saflıkta ve yüksek verimle sentezlenebilmektedir. Kaliksarenlerin iskelet yapılarındaki en belirgin özellik, metilen köprüleri ile birbirine bağlanmış benzen halkalarının oluşturduğu konik yapıdır. Bu yapının alt ve üst bölgelerine farklı fonksiyonel gruplar bağlayarak yapıya amaca uygun fonksiyonellik kazandırmak mümkündür (Gezici and Bayrakci, 2015).



Şekil 2.1. Kaliks[4]aren için moleküler yapının temsili bir gösterimi (lower rim: fenolik oksijen bölgesi, upper rim: fenolik halkaların para pozisyonu)

Kaliksaren türevlerinin kationik, anyonik ve nötral türlerin ayırt edilmesinde/tanınmasında kullanımını ele alan çok sayıda çalışma mevcuttur (Bayrakci vd., 2009, 2012; Bayrakcı vd., 2009; Gutsche and Nam, 1988; Shinkai, 1993). Farklı türlerle tersinir etkileşmeye girebilmeleri ve sergiledikleri esneklik nedeniyle kaliksarenler adsorpsiyon ve kromatografi gibi uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Sokoließ vd., 2000).

Kaliksaren esaslı malzemelerin kromatografide sabit faz olarak kullanımına dair çalışmaların 1990'lı yıllardan itibaren çalışılmaya başlandığı görülmektedir. Bu çalışmalarda alkali metal iyonlarından amino asit esterlerine, nükleositlerden dipeptitlere kadar çok farklı türlerin kromatografik ayrılması incelenmiştir (Brindle vd., 1996; Friebe vd., 1995; Glennon vd., 1993, 1996). Yani, kaliksarenlerin kromatografide sabit faz olarak kullanımına dair geniş bir literatürün mevcut olduğunu ve bunun kahir ekseriyetinin de HPLC ile ilgili olduğunu söylemek mümkündür. Bu çalışmalarda kaliksarenlerin genellikle silika destek katısına immobilize edilerek kullanıldığı anlaşılmaktadır.

2.2 Kaliksarenlerin İmmobilizasyon

İmmobilizasyon; ligandın (fonksiyonel gruplara sahip molekül ya da makromolekül) uygun koşullar altında mümkün olduğu kadar homojen olarak bir katı yüzeye (silika, polimer, vb.) sabitlendiği işlemlerdir. İmmobilizasyon işlemi ligand ve katı yüzey

arasındaki kimyasal ve fiziksel etkileşimlere dayanır. Fiziksel etkileşimlere dayanan immobilizasyon işlemleri, elde edilen materyallerin zayıf mekanik ve kimyasal dayanımları nedeniyle genelde tercih edilmez. Immobilizasyon işlemlerinin genel bir karakteristiği olarak destek katısı, yüzeyine immobilize edilen ligandın etkisiyle fonksiyonellik kazanırken; immobilize edilen ligand da destek katısının mekanik dayanımından istifade eder. Yani bu işlem hem destek katısı hem de ligand için bir tür “kazan-kazan” işlemidir (Gezici and Bayrakci, 2015).

Bir immobilizasyon işleminde hedef, kimyasal ve mekanik dayanımı yüksek bir malzeme elde etmektir. Ayrıca, bu malzemenin kimyasal türlerle izah edilir bir mekanizma üzerinden etkileşmesi de arzu edilen hedeflerdendir. Tüm istenilen özellikleri barındıran bir malzeme elde etmek zor olmakla beraber, dikkatli bir şekilde tasarlanmış ve deneysel şartları uygun bir şekilde belirlenmiş bir immobilizasyon işleminde hedeflenen malzemeyi büyük oranda elde etmek mümkündür. Bu noktada; ligandın ve destek katısının kimyası ile izlenen immobilizasyon yönteminin türünün de immobilizasyon işleminin veriminde etkili olduğunu belirtmek gerekir (Gezici and Bayrakci, 2015).

Literatürde, kaliksarenlerin immobilizasyonuna dair çok sayıda metot bulunmaktadır: Amid-bağı oluşumu (Akoz vd., 2012; Deng vd., 2014; Gezici vd., 2006b; Huai vd., 2004; Tabakci, 2008; Xiao vd., 2002), epoksit-aktivasyon metodu (Hu vd., 2011; Li vd., 2004b; Sayin vd., 2010; Sayin and Yilmaz, 2011; Xu vd., 1998), nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonları (Bhatti vd., 2013; Jain vd., 2004; Liu vd., 2005), imin-bağı oluşumu (de Gaetano vd., 2009), click reaksiyonları (Lakouraj vd., 2014), diazonyum metodu (Qureshi vd., 2013) ve SiCl_4 aktivasyon metodu (Thompson vd., 2011) bunlardan bazılarıdır.

Ayırma işlemlerinde destek katısının rolü bazen göz ardı edilmesine rağmen aslında ligand ve destek katısı hemen hemen aynı öneme sahiptir. Destek katısının mekanik ve kimyasal dayanımının yanı sıra, morfolojisi de ayırma işlemlerinde kritik öneme sahiptir. Yüksek mekanik dayanımı, parçacık boyutunun ayarlanabilmesi, süspansiyonlarından kolayca ayrılabilmesi ve yüzey fonksiyonlandırma işlemlerine uyumu gibi nedenlerden dolayı ayırma işlemlerinde (özellikle kromatografide) en çok kullanılan destek katısı silika ve türevleri olmuştur. Diğer taraftan, silikanın zayıf

kimyasal dayanımı, bu destek katısıyla yapılacak işlemlerin pH 3–8 aralığı ile sınırlı kalmasını gerektirmektedir (Gezici vd., 2006b; Gezici and Bayrakci, 2015). Bu durum, protein kromatografisi gibi bazen çok yüksek ve çok düşük pH değerlerindeki sulu çözeltilerin kullanımının gerekli olduğu aplikasyonlar için bir kısıtlama olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür kısıtlamalar daha yüksek kimyasal dayanıma sahip polimerik malzemeler kullanılarak aşılabilmektedir.

Kaliksarenlerin immobilizasyonunda son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılan bir diğer destek katısı grubu da manyetik nanopartiküller olmuştur. Bu kategoride en çok çalışılan manyetik nanopartiküller süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin olduğunu söylemek mümkündür (Gezici and Bayrakci, 2015; Sayin and Yilmaz, 2011).

Genel bir durum olarak; hangi destek katısı kullanılırsa kullanılsın, kaliksaren immobilizasyonundan önce destek katısının yüzeyi önce bir aktivasyon işlemine tabi tutulmakta ve ardından kaliksaren immobilizasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu konu ile ilgili kapsamlı bilgiyi literatürde bulmak mümkündür (Gezici and Bayrakci, 2015). Buraya kadar verilen bilgilerden de anlaşılacağı üzere, kaliksaren immobilizasyonunda monolitik kriyojellerin destek katısı olarak kullanıldığı çalışmaların neredeyse hiç bulunmadığı anlaşılmaktadır (Guven vd., 2018).

2.3 Kriyojeller

Makrogözenekli bir yapıya sahip olan kriyojeller, 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarda elde edilen hidrojenlerdir. Kriyojeller, adsorpsiyon ve kromatografi gibi ayırma-saflaştırma işlemlerinde ayırma ortamı (ve/veya destek katısı) olarak yaygın kullanım alanı bulmuştur. Çalışmamızın ana iskeletini meydana getiren kromatografi perspektifinden baktığımızda iyon-değişim kromatografisi (Özkan vd., 2018; Perçin vd., 2015; Singh vd., 2014) ve afinite kromatografisi (Asliyuca vd., 2016; Kumar vd., 2006; Yilmaz vd., 2009) uygulamalarının öne çıktığını söyleyebiliriz.

Bu kapsamdaki çalışmalarda, kriyojellerin uygun bir yüzey modifikasyon işlemine tabi tutulduğu ve böylece hem kapasite hem de seçicilikte önemli düzeyde farklılaşma elde edildiği görülmektedir. Kriyojel destek katılarına immobilize edilen bazı ligandları şu şekilde sıralamak mümkündür: 3-Merkaptopropan sülfonik asit (Perçin vd., 2015),

hümik asit (Özkan vd., 2018), dietilaminoetanol (Singh vd., 2014), iminodiasetik asit (Kumar vd., 2006) ve protein G (Asliyuca vd., 2016).

Yukarıda da belirtildiği gibi, kriyojellerin yüzey modifikasyonu ve hazırlanan malzemelerin kullanımı ile ilgili çalışmaların kapsamı çok geniş olmakla beraber; sunduğumuz bu çalışmaya kadar kaliksarenlerin kriyojellere immobilizasyonunu inceleyen bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir. Bu konunun son derece ilginç ve (özellikle protein kromatografisi çerçevesinde) incelenmeye değer bir alan sunduğu düşünülmüştür.

2.4 Protein Kromatografisi

Protein iyon-değişim kromatografisi, iyonik fonksiyonel gruplar içeren bir sabit fazın genel olarak yük/yarıçap oranına (ve de izoelektrik noktasına) bağlı olarak farklı proteinler ile farklı düzeyde tersinir etkileşme sergilemesine dayanan bir kromatografi türüdür. Nispeten ucuz bir teknik olan iyon değişim kromatografisi, küçük ve orta büyüklükteki proteinlerin ayırma-saflaştırma işlemlerinde başvurulan tekniklerden biridir. Ayrıca, virüsler, immunoglobulin ve plasmid DNA'sı gibi büyük yapıların ayrılmasında da kullanılmaktadır (Konak vd., 2014).

Protein iyon-değişim kromatografisinde türlerin ayrılması “izokratik elüsyon” veya hareketli fazın iyon şiddetinin dereceli olarak arttırıldığı “gradyent elüsyon” ile gerçekleştirilebilmektedir. Bunula birlikte, gradyent elüsyonun protein iyon-değişim kromatografisinde çok yaygın kullanıldığı bilinmektedir. Hareketli faz olarak NaCl gibi tuzlar içeren belirli pH değerlerinde hazırlanmış tampon çözeltiler kullanılır. Ortam pH değerine bağlı olarak, hareketli fazdaki tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte proteinlerin kolon boyunca elüsyonu gerçekleşir (Güven vd., 2018; Özkan vd., 2018; Perçin vd., 2015). Esas itibarıyla, protein iyon-değişim kromatografisinde protein elüsyonuna birçok parametre etki etmektedir. Proteinlerin izoelektrik noktası, boyutu, sabit fazın morfolojisi ve taşıdığı fonksiyonel grupların türü, kapasitesi, hareketli fazın fizikokimyasal özellikleri (tamponun konsantrasyonu, pH değeri, iyon şiddeti, vd.), hareketli fazın akış hızı ve sıcaklık bunlardan bazılarıdır (Konak vd., 2014).

Bu kromatografi türünde sentetik ve doğal sabit fazlar kullanılabilir. Sabit faz, üzerinde bulunan fonksiyonel grubun iyonlaşma karakterine göre isimlendirilir: Örneğin, sabit fazın taşıdığı grup anyonik ise kation değiştirici sabit faz; kationik ise anyon değiştirici sabit faz olarak isimlendirilir. Anyonik ve kationik sabit fazlar kendi içlerinde zayıf ve kuvvetli olarak ikiye ayrılabilir. Zayıf değiştiriciler pH değişimlerine çok duyarlı ve üzerindeki fonksiyonel grupların güçlerinde belirgin bir değişim gösteren sabit fazlardır. Kuvvetli değiştiriciler ise geniş pH aralıklarında, yüzey yükünü ve kapasitesini büyük oranda koruyabilmektedir (Konak vd., 2014).



BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Kimyasallar ve Sulu Çözeltiler

Çalışmalarda, Doç. Dr. Mevlüt Bayrakçı (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi) tarafından (litaretüre belirtilen yöntemlere göre) sentezlenen kaliksarenler kullanılmıştır.

Deneysel süreçte kullanılan kimyasallar Tablo 3.1.'de liste halinde verilmiştir. Deneysel aşamalarda ticari olarak temin edilebilen model proteinler kullanılmıştır. Sulu çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanılmış ve çözeltiler analizden önce 0,45 µm'lik filtrelerden süzümüştür. Protein çözeltileri de taze olarak hazırlanmış ve kullanılmadan önce 0,20 µm'lik şırınga ucu filtrelerden (selüloz asetat; Sartorius™) süzümüştür. Tüm kimyasallar başka bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan temin edildiği şekliyle kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi

#	Kimyasal	Kaynak	Kullanım amacı
1	p-tert-bütil fenol	Merck	Kaliksaren sentezi
2	Formaldehit	Merck	Kaliksaren sentezi
3	Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma	pH ayarlama, kaliksaren sentezi
4	Hidroklorik asit (HCl)	Merck	pH ayarlama
5	2-Hidroksietil metakrilat (C ₆ H ₁₀ O ₃ ; HEMA)	Sigma	Monolitik destek katısının sentezi; Monomer
6	Glisidil metakrilat (GMA)	Sigma	Monolitik destek katısının sentezi; Monomer
7	N,N'-Metilenbisakrilamid (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ ; MBAAm)	Sigma	Monolitik destek katısının sentezi; Çapraz bağlayıcı
8	Amonyum persülfat [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ ; APS]	Sigma	Monolitik destek katısının sentezi; Radikal başlatıcı
9	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (C ₆ H ₁₆ N ₂ ; TEMED)	Sigma	Monolitik destek katısının sentezi; Katalizör
10	Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma	Monolitik destek katısının saflaştırılması
11	Potasyum monohidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	Sigma	Tampon çözelti hazırlama
12	Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma	Tampon çözelti hazırlama
13	Lizozim (Lys)	Sigma	Model protein
14	α -Kimotripsinojen (Chy)	Sigma	Model protein
15	Sitokrom c (Cyt)	Sigma	Model protein
16	İnsan serum albümini (HSA)	Sigma	Model protein
17	Miyoglobin (Mb)	Sigma	Model protein
18	Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA)	Merck	Kompleksimetrik titrasyonlarda titrant olarak
19	Eriochrome Black T (ECBT)	Merck	Kompleksimetrik titrasyonlarda indikatör

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

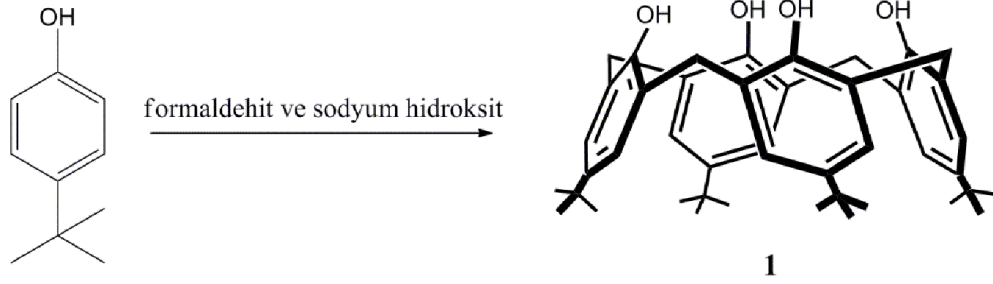
Sentezlenen malzemelerin sentezi, karakterizasyonu ve kromatografik işlemlerin yürütülmesi aşamalarında aşağıda belirtilen cihaz ve ekipmanlar kullanılmıştır:

- Elemental analiz: Sentezlenen kryojelin içindeki C, N, H ve S elementlerinin yüzdeleri, LECO™ marka ve CHNS-932 model cihaz ile tayin edilmiştir.
- FTIR spektroskopisi: Bruker™ Vertex model FTIR cihazı ile yapılan analizlerde, ATR-FTIR tekniği kullanılmış ve spektrumlar 4 cm^{-1} 'lik çözünürlükle kaydedilmiştir.
- Cıva porozimetresi: Poremaster™ 60 cihazı kullanılarak düşük basınçta gerçekleştirilmiş ve gözeneklerin boyutları yorumlanmıştır.
- SEM: Zeiss™ Evo Basic model SEM cihazı kullanılarak kaydedilmiş olup, görüntüler alınmadan önce numuneler altın ile kaplanmıştır ($1,32 \times 10^{-2}$ Pa vakum altında).
- pH metre: Mettler-Toledo™ Seven-Easy marka/model kombine pH ölçüm sistemi kullanılmıştır.
- Derin dondurucu: Uğur™ marka derin dondurucu buzdolabı kullanılmış ve buzdolabının iç sıcaklığı, haricî bir elektronik termometre (Isolab™) ile sürekli olarak takip edilmiştir.
- HPLC: Agilent™ 1260 model 4'lü pompa, degazör, otomatik enjeksiyon sistemi, numune soğutucu, kolon fırını, 6'lı valf sistemi ve UV-VIS detektörden oluşan bir HPLC cihazı kullanılmıştır. Sinyaller Chemstation® yazılımı ile kaydedilip işlenmiştir. Agilent™ 1200 model HPLC cihazı ise monolitik kriyojellerin in-situ yüzey modifikasyonlarını gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır.
- Orbital çalkalayıcı: Heidolph™ marka orbital çalkalayıcı protein numunelerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Su banyosu: Mikrotest™ marka su banyosu monolitik kolonlara immobilizasyon işlemleri sırasında sıcaklık kontrolü için kullanılmıştır.
- Ultrasonik banyo: Isolab® marka ultrasonik banyo çözeltilerin banyoda bekletilmesi için kullanılmıştır.

- Ultra saf su cihazları: Tüm işlemler sırasında Milipore™ ve Human™ marka cihazlardan elde edilen ultra saf su (18,2 MΩ.cm) kullanılmıştır. Vakumlu süzme işlemleri Milipore® marka vakum pompası ile gerçekleştirilmiştir.

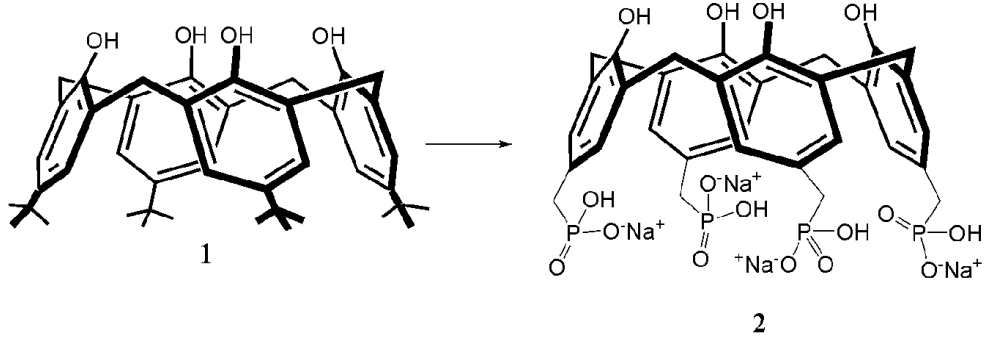
3.3 Kaliksaren Türevlerinin Sentezi

Çalışılan kaliksaren türevleri Doç. Dr. Mevlüt BAYRAKCI (Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü) tarafından sentezlenmiştir. Sentez aşamalarında öncelikle, başlangıç maddesi olan p-tert-bütilkaliks[4]aren, CLX, literatürdeki bilinen yöntemle göre (Gutsche, 1998) sentezlendi (Şekil 3.1). p-tert-bütilfenol ile formaldehit arasında bazik ortamda gerçekleşen reaksiyondan (1) numaralı çıkış maddesi elde edilmiştir. CLX-PO₄, CLX-SO₃ ve CLX-COOH türevleri ise literatürde bilinen yöntemlere göre sentezlenmiştir.



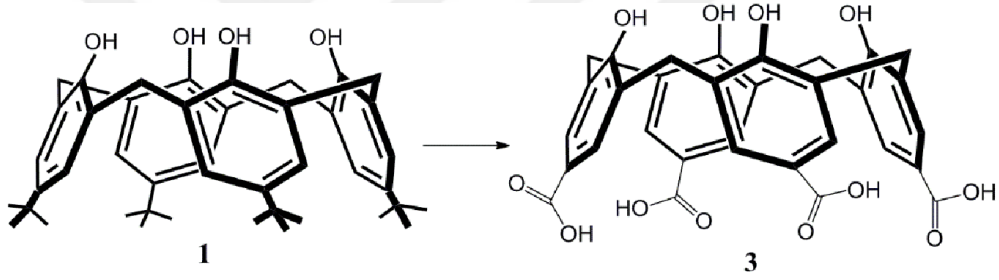
Şekil 3.1. p-tert-bütilkaliks[4]aren sentezi

Çıkış maddesi olan (1) numaralı bileşik, Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilen türevlerin sentezinde kullanılmıştır. Şekil 3.2'de verilen CLX-PO₄'ün sentezi yine literatürde mevcut olan sentez yolu takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Bayrakçı vd., 2011). CLX-PO₄ (2)'ün yapısı sırası ile ¹H-, ¹³C- ve ³¹P-NMR spektrumları alınarak aydınlatıldı.



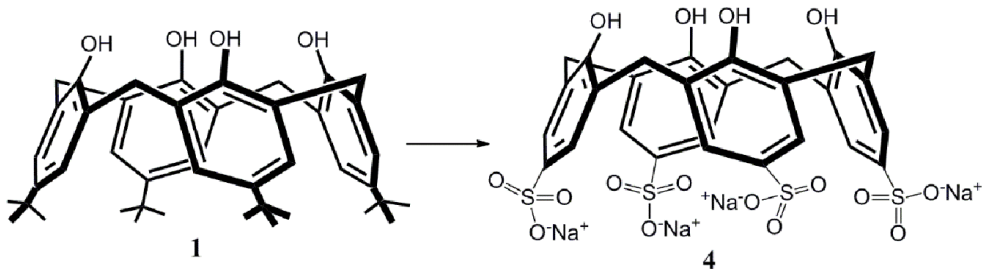
Şekil 3.2. CLX-PO₄ sentezi için genel bir gösterim

Yapısı Şekil 3.3’te verilen p-karboksi kaliks[4]aren (3) (CLX-COOH) bileşiğinin sentezi literatüre uygun olarak gerçekleştirilmiş (Pasquale vd., 2012) ve bileşiğin yapısı ¹H- ve ¹³C-NMR spektrumları alınarak aydınlatılmıştır. FTIR spektroskopisi ile de karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. CLX-COOH sentezi için genel bir gösterim

Son olarak; suda çözünebilen tetrasülfonatokaliks[4]aren bileşiği (4) (CLX-SO₃; Şekil 3.4) literatüre uygun olarak sentezlenmiş ve bileşiğin yapısı ¹H- ve ¹³C-NMR spektrumları ve FTIR ile aydınlatılmıştır.



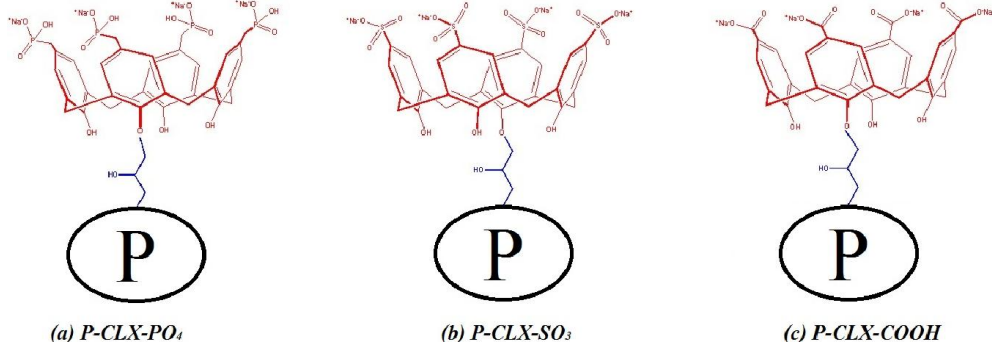
Şekil 3.4. CLX-SO₃ sentezi için genel bir gösterim

3.4 Kriyojel Destek Katısının Sentezi

Kaliksarenlerin immobilize edileceği monolitik destek katısını hazırlamak için monomer olarak HEMA ve GMA kullanılmış ve literatürde bilinen yöntem izlenmiştir (Perçin vd., 2015; Uygun vd., 2013). Bu amaçla; 1,6 mL HEMA (2-hidroksietilmetakrilat) 0,1 mL GMA (glisidilmetakrilat) 5 mL gazı giderilmiş saf suda çözüldü ve diğer 10 mL saf su içeren bir kaptaki da çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 0,28 g MBAAm (N,N'-metilen-bis(akrilamid)) çözüldü. Her iki çözelti birbirine eklendikten sonra 10 dak süreyle bir buz banyosunda karıştırıldı. Bu karışıma radikal başlatıcı 0,02 g APS (amonyum persülfat) ve ardından son olarak 25 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin; katalizör) ilave edildi. Kısa bir süre karıştırılan bu çözelti hızlı bir şekilde buz banyosunda bekletilen yerli yapım boş polimerik kolonlara (5,0×120 mm) alındı. Kolonlar, -20 °C'de 24 saat süreyle bekletildi ve bu sürenin sonunda oda sıcaklığına alınarak 2 saat kadar bekletildi. Uygun çözücülerle (su+alkol karışımı) yıkanan kolon kaliksaren immobilizasyonu için ıslak bir şekilde muhafaza edildi. Aynı yoldan (ve aynı karışım kullanılarak) hazırlanmış diğer kolonlar karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere saklandı. Hazırlanan monolitler, uzun süre bekletilmeden kaliksaren immobilizasyonu işleminde kullanıldı.

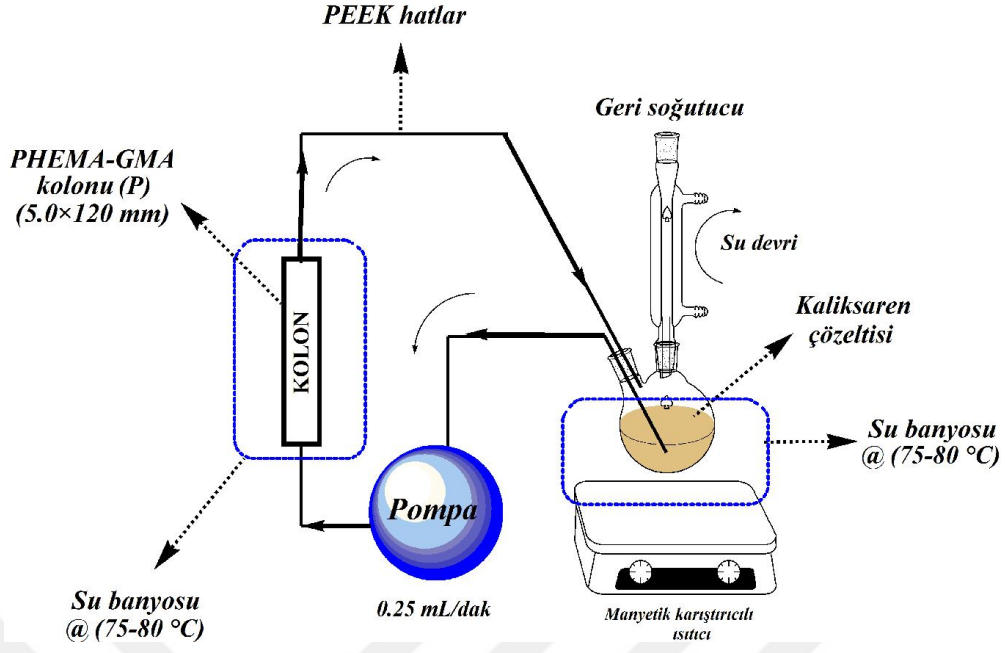
3.5 Kaliksaren İmmobilizasyonu ve Karakterizasyon

İmmobilizasyon işleminde izlenen yöntem, kaliksarenlerin bazik ortamda konik yapının alt kısmında yer alan fenolat grupları üzerinden kriyojel destek katısındaki epoksit grupları ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. Baz katalizli bu reaksiyonda, epoksit halkasının açılmasıyla kaliksarenlerdeki fenolik oksijen ile kriyojeldeki epoksit karbonu arasında kovalent bağ oluşumu temeline göre immobilizasyonun gerçekleştiği öngörülmüştür (Güven vd., 2018). Kaliksaren türevlerinin destek katısına, P, immobilizasyonundan elde edilen materyaller Şekil 3.5'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Kaliksaren türevlerinin monolitik destek katısına (P) immobilizasyonundan sonra elde edilen monolitik sabit fazların moleküler yapısı için temsili bir gösterim

Hazırlanan destek katısının fonksiyonlandırılması için izlenen immobilizasyon işlemi sulu ortamda baz katalizli bir reaksiyona göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için yaklaşık olarak 5×10^{-3} M 40 mL kaliksaren çözeltisinin pH'sı (0,1 M NaOH çözeltisi ile) pH 11-12'ye ayarlanmıştır. Yapıdaki fenolik -OH gruplarının dissosyasyonun tamamlanması için, çözelti 75-80 °C sıcaklıkta yaklaşık 1,0 saat kadar karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, $5,0 \times 120$ mm'lik (iç çap ve uzunluk) kolonda sentezlenmiş olan monolit üzerinden 0,25 mL/dak'lık akış hızında 75-80 °C'de 24 saat süreyle geçirilmiştir. İşlem sonunda kolon, su ve $1,0 \times 10^{-3}$ M NaOH çözeltisi ve ardından tekrar bol miktarda su ile yıkandı. Daha sonra kolondan, yaklaşık 4 saatlik süre boyunca 0,50 mL/dak'lık akış hızında ultra-saf su geçirilerek kolonun şartlandırılması tamamlanmıştır. Kullanılan deney düzeneği Şekil3.6'da temsili olarak gösterilmiştir (Güven vd., 2018).



Şekil 3.6. Kaliksaren immobilizasyonunda kullanılan deney düzeneği

3.6 Monolitik Sabit Fazların Karakterizasyonu

Hazırlanan monolitik kriyojellerin karakterizasyonunu 3 alt başlık altında sınıflandırmak mümkündür:

a) Morfoloji ve yüzey yük özelliklerinin analizi (ör. SEM analizleri, civa porozimetrisi ile gözenek dağılımı analizi, izoelektrik nokta tayini ve titrimetrik analizler)

Sentezlenen monolitler için en uygun morfolojiye sahip yapıyı elde edebilmek amacıyla farklı monomer, çapraz bağlayıcı ve katalizör oranlarında bir seri sentez gerçekleştirilmiş ve elde edilen yapılar SEM tekniği ile analiz edilmiştir. Böylece, proteinlerin monolit gözenekli yapısında taşınımı için en uygun yapıya karşılık gelen monomer ve diğer bileşenlerin oranları tespit edilmiştir. Civa porozimetrisi analizleri ile kaliksaren immobilize edilmiş monolitlerin gözenek dağılımı analizleri gerçekleştirilmiş ve böylece morfoloji hakkında daha kapsamlı veriler elde edilmiştir.

İzoelektrik nokta analizleri ile hazırlanan sabit fazların yüzey yük özellikleri incelenmiş ve kaliksaren immobilizasyon işlemi ile ilişkilendirilmiştir. Kaliksarenlerdeki asidik fonksiyonel gruplar (sülfoksit, fosfonat ve karboksilat) nedeniyle destek katısı P'ye

kaliksaren immobilizasyonu ile elde edilen sabit fazların asidik bölgeye tekabül eden izoelektrik noktaları sergilemesi beklenmiştir. İşlemlerde, kaliksaren immobilize edilmiş monolitlerin yaklaşık 0,5 mg/mL'lik sulu süspansiyonları hazırlanmış ve ayarlı 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri ile cihaz üzerinde otomatik olarak titre edilmiştir. İşlemler 25 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Titrimetrik analizler ile de kaliksaren immobilizasyonunun verimi değerlendirilmiş ve her bir monolitik sabit fazdaki asidik fonksiyonel grup sayısı tayin edilmiştir. P-CLX-COOH ve P-CLXPO₄ için pH titrasyonları; P-CLX-SO₃ için ise EDTA titrasyonları temelinde bir yöntem geliştirilmiştir (Güven vd., 2018). pH titrasyonları için bir yaklaşım olarak, protonlanmış P-CLX-COOH ve PCLX-PO₄ sabit fazları, ayarlı ~0,01 M NaOH çözeltisi ile pH=7'ye titre edilmiş ve sonuçlar pH=7'ye titre edilebilen asidite olarak rapor edilmiştir. Titrasyon işlemleri, (iyon şiddetini sabitlemek amacıyla) 30 mL ~0,033 M NaCl çözeltisinde yürütülmüş ve bu çözeltiliye yaklaşık olarak 4 mg kurutulmuş (ve toz haline getirilmiş) sabit faz ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım, dengeye gelmesi için oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, ayarlı NaOH çözeltisi ile (20 µL'lik ilavelerle) pH=7'ye titre edilmiştir. Sülfonik asit gruplarının kuvvetli asidik karakteri nedeniyle fonksiyonel grup sayısının pH titrasyonları temelinde belirlenmesinde karşılaşılan güçlükler nedeniyle kompleksimetrik titrasyonlar temelinde yeni bir yaklaşımın uygulanabilirliği test edilmiştir. Bunun için sodyum formundaki P-CLX-SO₃ katısı gece boyunca 0,1 M Ca²⁺ çözeltisi ile etkileştirilerek Ca²⁺ formuna dönüştürülmüş ve ardından bol miktarda ultra-saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra aynı katı 0,1 M NaCl çözeltisinde gece boyunca karıştırılmış ve böylece katıdaki Ca²⁺ iyonlarının sulu faza geçmesi sağlanmıştır. Sulu fazdaki Ca²⁺ iyonlarının miktarını belirlemek amacıyla ayarlı EDTA çözeltisi (~0,005 M) ile Eriochrome Black-T indikatörü varlığında itrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (pH=10'da). Dönüm noktasının belirlenmesini kolaylaştırmak amacıyla titrant çözeltisine düşük miktarda Mg²⁺ iyonu ilavesi yapılmıştır. Renk dönüşümü gerçekleştikten sonra harcanan titrant miktarından yola çıkarak çözeltildeki Ca²⁺ konsantrasyonu tespit edilmiş ve elektronötralite nedeniyle Ca²⁺ iyonu miktarının iki katı sülfonat gruplarının sayısı olarak alınmıştır (elektronötralite nedeniyle 2 SO₃⁻ grubu 1 tane Ca²⁺ iyonunu bağlar). Elde edilen veriler monolitin gramı başına SO₃ grubu sayısı cinsinden rapor edilmiştir (Güven vd., 2018).

Bu işlemlerden olumlu sonuçlar elde edildikten sonra ileri düzeyde karakterizasyon işlemleri (elemental analiz ve FTIR) uygulanmıştır.

b) Moleküler düzeydeki yapısal analizler (ör. Elemental analiz ve FTIR spektroskopisi)

Elementel analiz ile monolitlerin yapısındaki C, H, N ve S elementlerinin yüzde içerikleri analiz edilmiş ve kaliksaren immobilizasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

FTIR analizleri ile monolitik destek katısına kaliksaren immobilizasyonu, spektrumlardaki farklılaşmalardan yola çıkılarak teyit edilmiştir.

c) Kromatografik şartlarda kolon performansının analizi (ör. Basınç düşüşü ve teorik tabaka analizi)

Basınç düşüşü analizlerinden kolonun su geçirgenliği, k_w , Darcy kanununa göre hesaplanmıştır. Bu amaçla farklı akış hızlarında (0,15–5,00 mL/dak) kolon basınç düşüşü, $\Delta P = P_2 - P_1$, tespit edilmiş ve grafik yöntemi ile de k_w aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır.

Darcy kanunu, bir akışkanın gözenekli bir yapıdan akışını aşağıdaki formüle göre açıklar. Bu formülden yola çıkarak kromatografik kolonun su geçirgenliği, k_w , deneysel verilerden hesaplanabilir (Perçin vd., 2015; Yao vd., 2006):

$$k_w = \frac{Q \eta L}{\Delta P A} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte; Q: Doğrusal akış hızı (m^3/s); η : Suyun vizkozitesi ($1,003 \times 10^{-3}$ Pa s); L: Kolonun uzunluğu (0,110 m); A: Monolit kesitinin alanı ($1,96 \times 10^{-5}$ m^2); P_2 : HPLC sistemine kolon bağlıken ölçülen basınç; P_1 : HPLC sistemine kolon bağlı değilken ölçülen basınç.

Q– ΔP grafiğinin lineer uyumundan k_w hesaplanabilmektedir. İşlemler, 25 °C sıcaklıkta 5,0×120 mm ebadındaki kolon ile gerçekleştirilmiştir. Kriyojel esaslı sabit fazlarda gözlenen özelliklerden bir tanesi, teorik tabaka sayısının akış hızından bir dereceye

kadar bağımsız olmasıdır. Bu çalışmada sentezlenen monolitik sabit fazın bu özelliğini test etmek amacıyla 0,15–1,00 mL/dak akış hızlarında teorik tabaka sayısı pik yarı yüksekliğindeki verilere dayanan aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (Perçin vd., 2015; van Deemter vd., 1995):

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (3.2)$$

Burada; t_R , alıkonma zamanını, $w_{0.5}$, pik yarı yüksekliğindeki pik genişliğini ve N ise teorik tabaka sayısını göstermektedir.

İşlemlerde analit olarak Chy kullanılmış ve hareketli faz olarak 1,0 M NaCl (20 mM fosfat tamponunda; pH=7,0) çözeltisi kullanılmıştır. Deneyler, 25 °C’de 5,0×120 mm ebadındaki kolon ile gerçekleştirilmiştir.

3.6 Kromatografik İşlemler

Kromatografik işlemler hem lineer hem de lineer olmayan şartlarda yürütülmüştür. Lineer şartlarda yürütülen işlemlerde hareketli faz bileşimi ve pH etkisinin model proteinlerin çalışılan her üç sabit faz üzerinde sergiledikleri kapasite faktörleri üzerine etkisi incelenmiştir. Deneylerde pH ve gradyent eğiminin (β) etkisi pH=5,0-7,0 ve β =33,3-200 mM/dak şartlarında çalışılmıştır. Tek bileşenli protein numuneleri ile yürütülen bu çalışmalarda protein konsantrasyonu 1,0-2,0 mg/mL düzeyinde tutulmuştur. Kapasite faktörleri üzerine deneysel parametrelerin etkisi kapsamlı bir şekilde incelendikten sonra model proteinlerin çalışılan sabit fazlar üzerinde kromatografik olarak ayrılabilirleri şartlar irdelenmiştir. Bu amaçla tek bileşenli protein numuneler kullanılarak yürütülen yukarıda belirttiğimiz çalışmaların ışığında karışımlar kullanılarak bir dizi analiz yürütülmüş ve proteinlerin karışımlarından ayrılabilirliği şartlar belirlenmiştir. Numune konsantrasyonları 1,0 mg/mL veya daha düşük düzeylerde tutulmuştur. Lineer olmayan şartlarda yürütülen deneylerde ise her üç sabit fazın Lys’ye karşı pH=7,0’da sergiledikleri dinamik adsorpsiyon kapasitesi incelenmiştir. Bu amaçla frontal analiz tekniği kullanılmış ve HPLC cihazından

kaydedilen breakthrough eğrisinden yola çıkarak adsorpsiyon kapasitesi bilinen yönteme (Guiochon vd., 1994) göre hesaplanmıştır.

Çalışmalar süresince protein örnekleri, ilgili pH değerine karşılık gelen 20 mM'lık fosfat tamponlarında hazırlanmıştır. Hareketli faz olarak 20 mM fosfat tamponu (A) ve 20 mM fosfat tamponunda hazırlanmış 1,0 M NaCl (hareketli faz modifiyeri, B) çözeltileri kullanılmıştır. Lineer şartlarda yürütülen gradyent elüsyonlarda kolon önce A ile şartlandırılmış ve daha sonra gradyent eğimine bağlı olarak B'nin hareketli fazdaki oranı dereceli olarak cihaz üzerinde otomatik olarak arttırılmıştır. Böylece, iyon-değişim mekanizmasına göre tutulan proteinlerin elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Lineer olmayan kromatografi şartlarında da kolon, Lys yüklemesinden önce aynı pH değerindeki 20 mM'lık tampon çözelti (eng. running buffer) ile dengeye getirilmiştir.

BÖLÜM IV

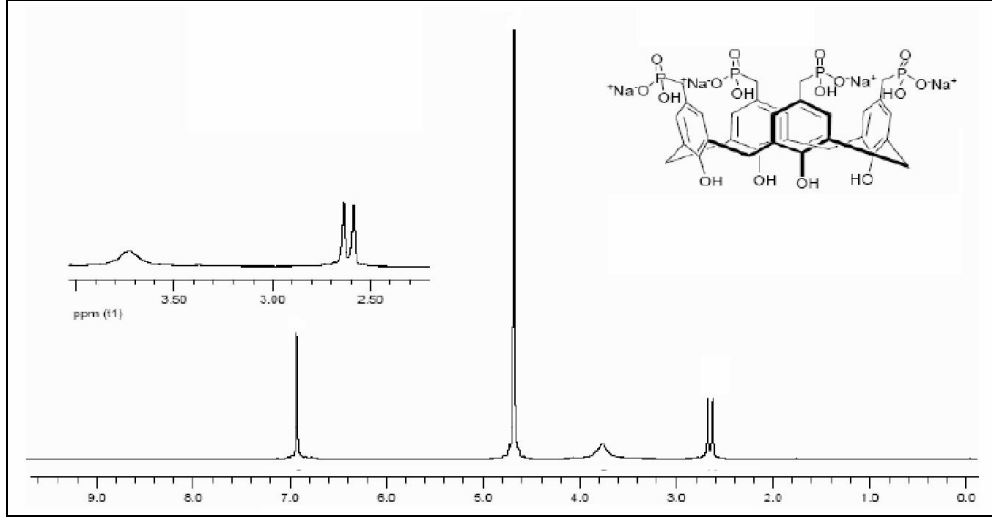
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kaliksaren Türevlerinin Karakterizasyonu

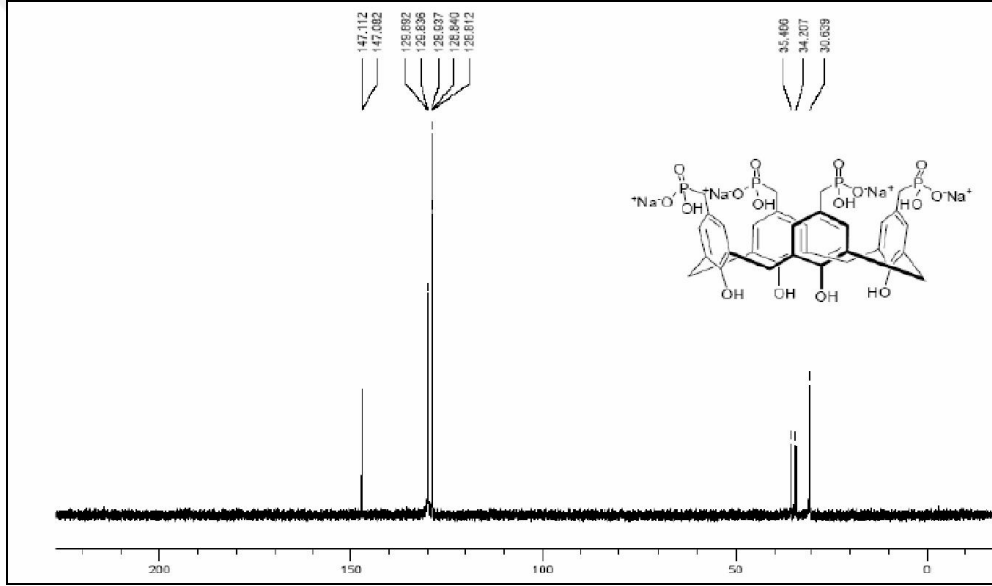
p-tetrafosfonatokaliks[4]aren; (CLX-PO₄):

CLX-PO₄ için NMR sonuçları Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3’da verilmiş olup, yapının başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmüştür.

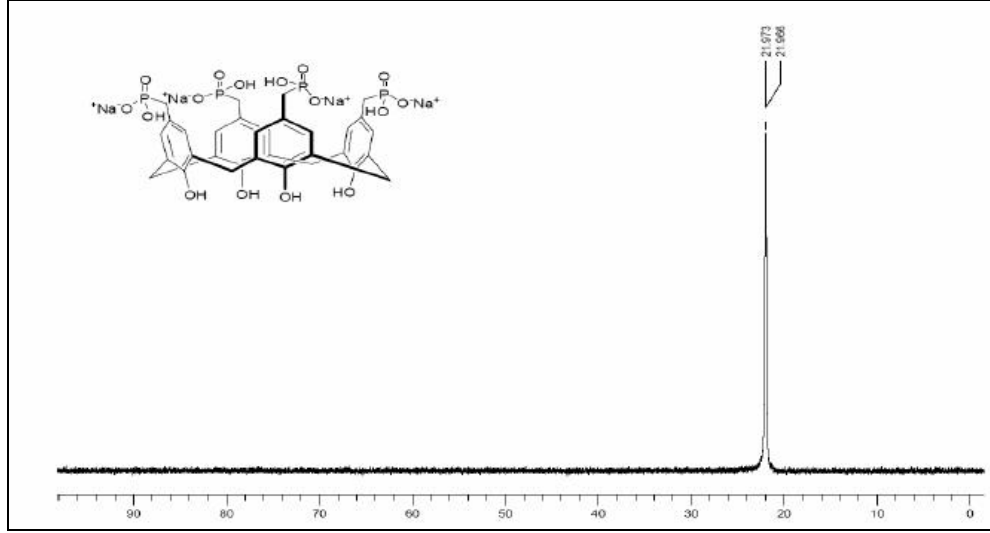
CLX-PO₄’ün ¹H-NMR spektrumunda bileşiğin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.1). Başlangıç maddesi olarak kullanılan p-tert-bütikaliks[4]aren (CLX; (1) nolu bileşik; Şekil 3.1) kloroform gibi organik çözücülerde çözünmesine rağmen, polar fosfonat grupları ile modifiye edilmiş bileşik (2)’nin (CLX-PO₄) suda çözündüğü görülmüş ve bu nedenle NMR dataları da deuterium oksitte (D₂O) alınmıştır. Bileşiğin başarılı bir şekilde sentezlendiğine dair bu önemli bulgunun yanı sıra, bazı NMR verileriyle de sentezin başarısı teyit edilmiştir. Nitekim bileşik (2)’nin NMR verilerinden tersiyer bütül yapılarının 0,9 ile 1,2 civarında pik vermesi gerekirken bu grupların kaliksaren iskeletinden koptuğu ve yerlerine fosfonat gruplarının geldiği net olarak görülmektedir. Yine bileşik (2) için alınan ³¹P-NMR spektrumundan yapıda bulunan fosfor atomuna ait ve 21 ppm civarında ortaya çıkan sinyal net olarak görülmektedir (Şekil 4.3). CLX-PO₄ için kaydedilen FTIR spektrumunda (Şekil 4.4) aromatik yapılara ilişkin bant 1593 cm⁻¹ dolaylarında görülmektedir. Ayrıca 1050 cm⁻¹ dolaylarındaki P-O titreşim bandı da belirgin bir şekilde açığa çıkmıştır. 2320 cm⁻¹ dolaylarındaki P-H titreşim bandı da spektrumda mevcuttur. 1300 cm⁻¹’deki P=O bandı da CLX-PO₄ yapısını doğrulamıştır.



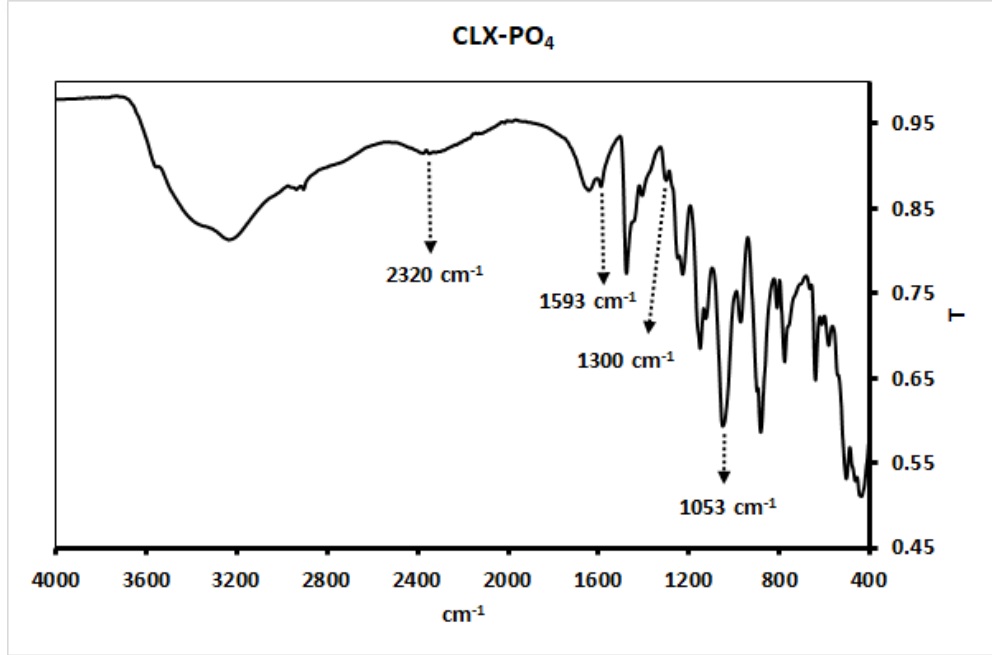
Şekil 4.1. CLX-PO₄ için ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.2. CLX-PO₄ için ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.3. CLX-PO₄ için ³¹P-NMR spektrumu

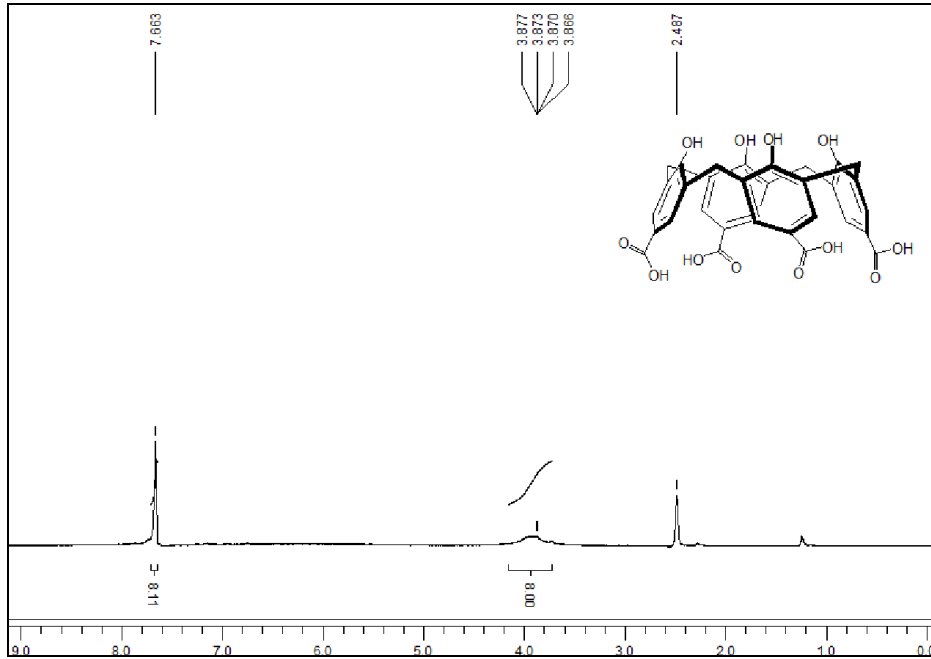


Şekil 4.4. CLX-PO₄ için FTIR spektrumu

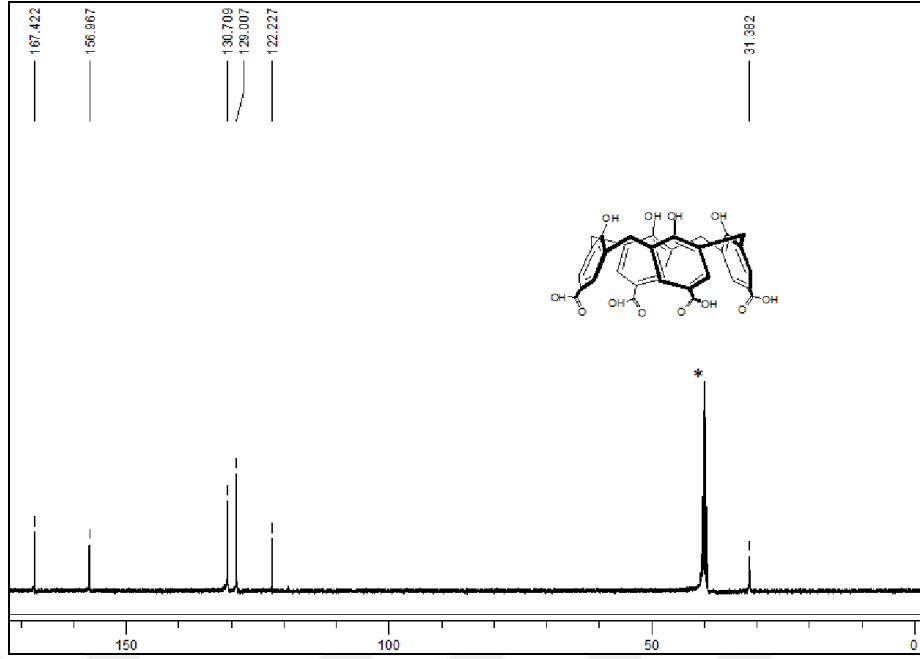
p-tetrakarboksilatokaliks[4]aren; (CLX-COOH):

CLX-COOH'ın $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 4.5) bileşiğin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. CLX-COOH'ın spektrumunda, bileşik (1)'in (Şekil 3.1) yapısında mevcut olan tersiyer bütül gruplarına ait herhangi bir pik görülmemektedir. İki fenil halkasını birbirine bağlayan fenil köprülerine ait singlet pik 3.8 ppm civarında çıkarken sekiz adet aromatik hidrojene ait pik ise yine singlet olarak 7.6 ppm civarında görülmektedir. $^1\text{H-NMR}$ verilerine ek olarak alınan $^{13}\text{C-NMR}$ verilerinde karboksilik asit grubuna ait karbonil piki 167 ppm civarında kendini göstermiş olup yapının tam olarak aydınlatılmasını sağlamıştır. Çünkü daha önce 160 ppm üstünde hiçbir pik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.6).

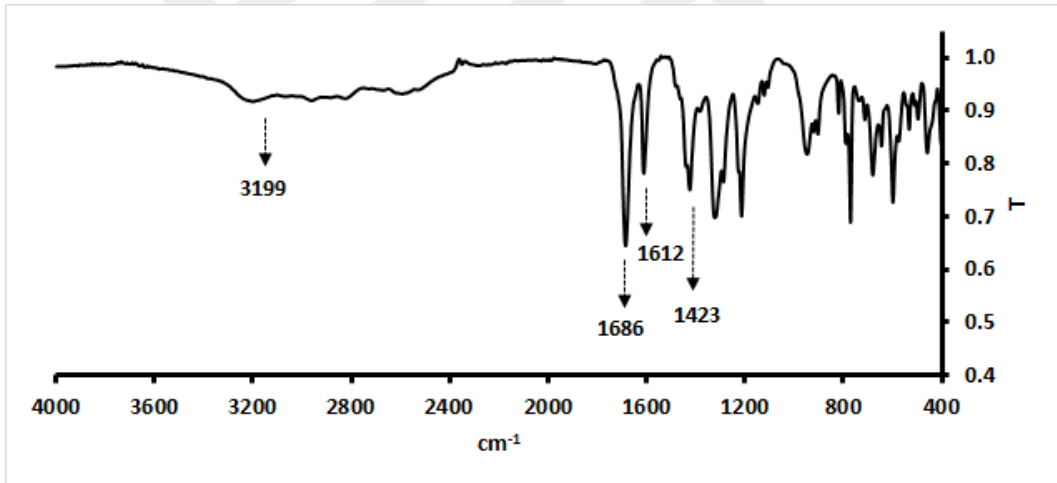
FTIR spektroskopisi de CLX-COOH'ın yapısını doğrulamıştır (Şekil 4.7). 1686 cm^{-1} dolaylarındaki bant karbonil gruplarından kaynaklanan titreşimleri göstermekte ve ayrıca 1612 cm^{-1} 'deki bant da aromatik yapılarla ilişkili titreşimlerle ilişkilendirilebilir. Buna ilaveten, 3199 cm^{-1} 'deki geniş bant da kaliksaren yapısındaki hidroksil gruplarına atfedilmiştir. 900 cm^{-1} 'in altında gözlenen bazı bantları da aromatik yapılarla ilişkilendirmek mümkündür.



Şekil 4.5. CLX-COOH için $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 4.6. CLX-COOH için ^{13}C -NMR spektrumu



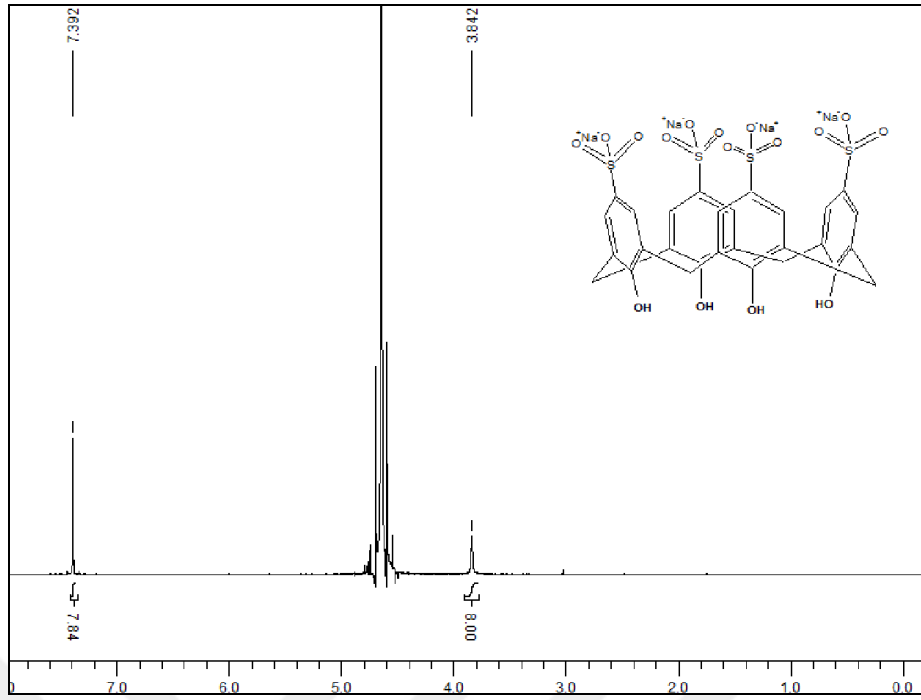
Şekil 4.7. CLX-COOH için FTIR spektrumu

p-tetrasülfonatokaliks[4]aren; (CLX-SO₃):

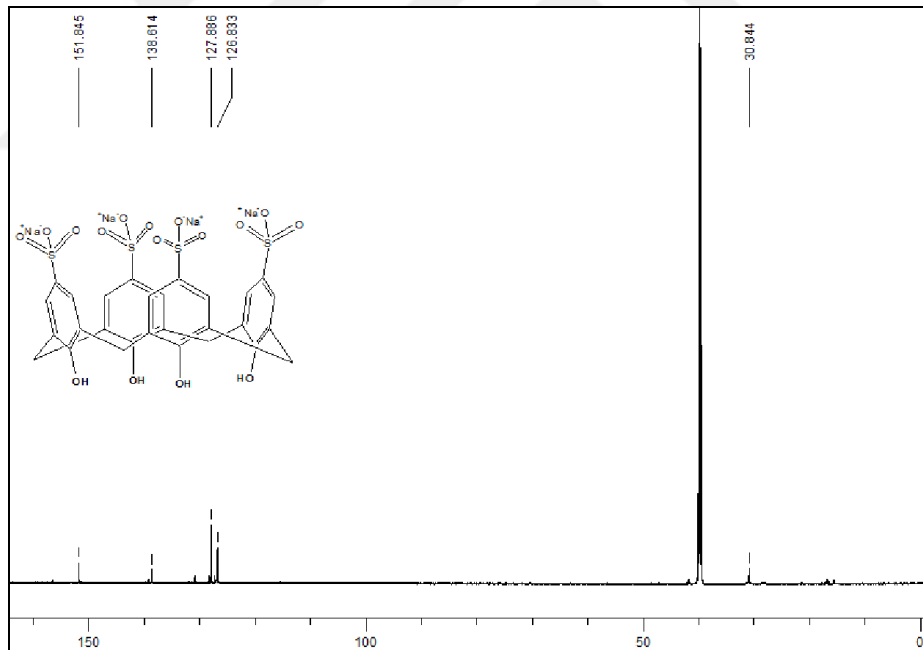
Çıkış maddesi olan p-tert-bütilkaliks[4]aren (CLX; (1) nolu bileşik; Şekil 3.1) kloroform gibi organik bir çözücüde çözünmesine rağmen CLX-SO₃'ün ¹H-NMR spektrumu suda alınmış olup bileşiğin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği bu basit çözünürlük deneyinden bile açıkça görülmektedir. Yani, CLX-SO₃'ün suda çözünebilmesi, yapıya sülfonat gruplarının bağlandığını göstermiştir. ¹H-NMR verilerinden, simetrik bir molekül olan CLX-SO₃'nin metilen köprülerine ait sekiz proton için sinyal yaklaşık olarak 3,84 ppm civarında net olarak görülmektedir. Yine aromatik protonlara ait singlet pik yaklaşık olarak 7,3 ppm civarında ortaya çıkmıştır (Şekil 4.8). ¹H-NMR verilerine ek olarak alınan ¹³C-NMR verilerinden de molekülün saf olarak elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.9). Ayrıca; çalışılan tüm kaliksaren türevlerinin koni konformasyonunda olduğu ¹³C-NMR'larda 31 ppm civarında çıkan singlet pikten doğrulanmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.6 ve Şekil 4.9).

CLX-SO₃ için kaydedilen FTIR spektrumunda (Şekil 4.10), sülfonat grubuna ait titreşim bantları 1372 ve 1150 cm⁻¹ dolaylarında net bir şekilde görünmektedir. Ayrıca, aromatik titreşimler de 1597, 897, 811, 784, and 736 cm⁻¹'de görünmektedir. 3149 cm⁻¹'de ise fenolik OH gruplarıyla ilişkili olduğu düşünülen geniş bant da açığa çıkmıştır. Karşılaştırma yapmak bakımından, sentezlenen kaliksaren türevleri için toplu FTIR spektrumları Şekil 4.11'de sunulmuştur.

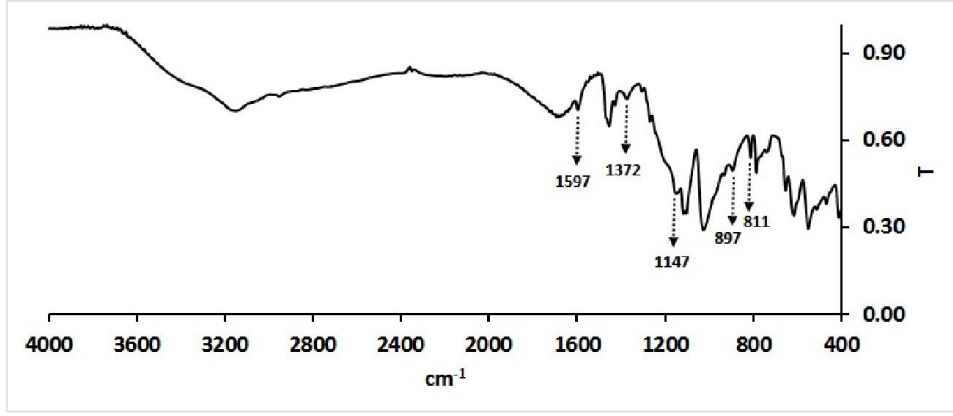
Sonuç olarak; monolitik destek katısına (P) immobilize edilen kaliksaren türevlerinin tamamı NMR spektroskopisi ve FTIR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.



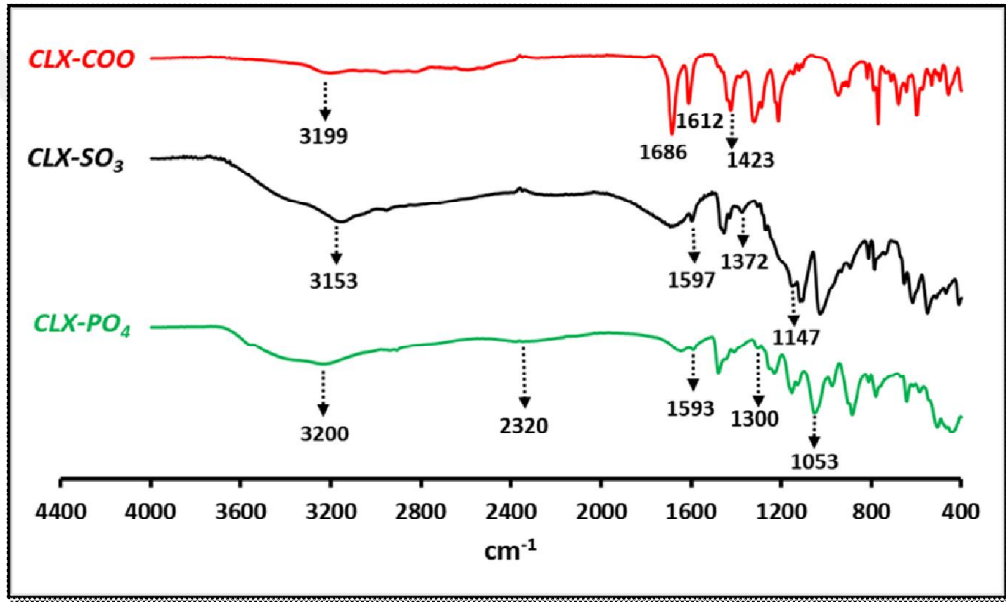
Şekil 4.8. CLX-SO₃ için ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.9. CLX-SO₃ için ¹³C-NMR spektrumu



Şekil 4.10. CLX-SO₃ için FTIR spektrumu



Şekil 4.11. Hazırlanan kaliksaren türevleri için toplu FTIR spektrumları

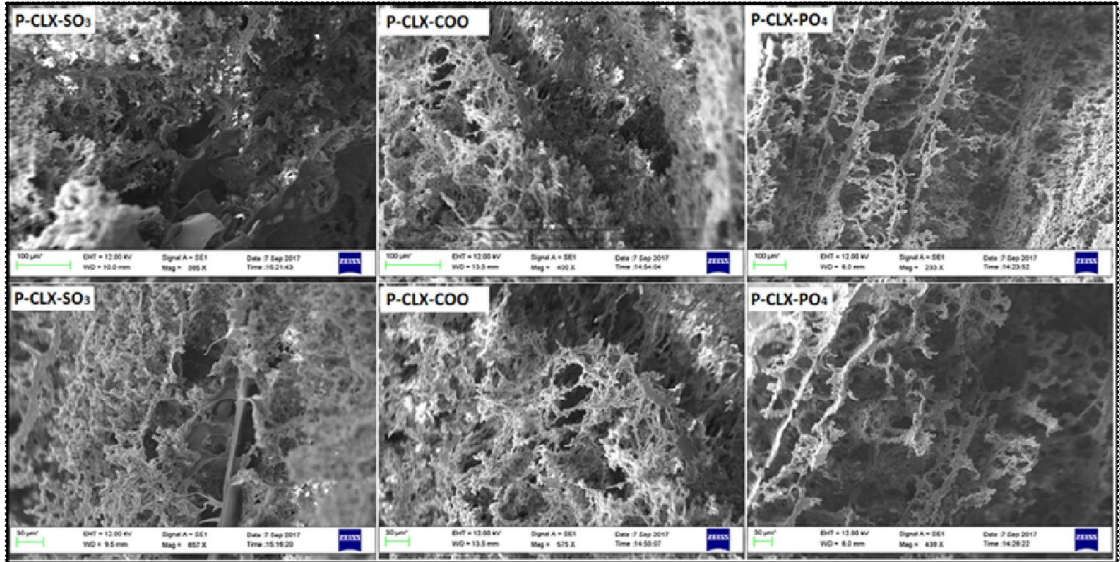
4.2 Kaliksaren-İmmobilize Edilmiş Monolitlerin Karakterizasyonu

4.2.1 SEM analizleri

Kriyojel esaslı monolitik sabit fazın kimyasal özelliklerinin yanı sıra morfolojisi de büyük öneme sahiptir. Bu husus özellikle proteinlerin sabit fazın gözenekli yapısı içerisine nüfuz edebilmesi bakımından önemlidir. Kriyojel esaslı monolitik malzemelerin morfolojisi, kullanılan monomer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı yüzdesi, radikal başlatıcı oranı ve katalizör oranı ayarlanarak değiştirilebilmektedir. Meydana gelen değişimler aynı zamanda monolitik malzemelerin mekanik dayanımını

da etkileyebilmektedir. Bu amaçla; yukarıda belirtilen parametrelerin oranlarının değişik kombinasyonlarda kullanılmasıyla bir dizi sentez gerçekleştirildi ve en uygun deneysel şartlar belirlendi (HEMA: 1,6 mL; GMA: 0,1 mL; MBAAm: 0,28 g; APS: 0,02 g ve TEMED: 25 µL). Bu deneysel şartların, daha önce literatürdeki bazı çalışmalarda da kullanıldığı görülmüştür (Perçin vd., 2015).

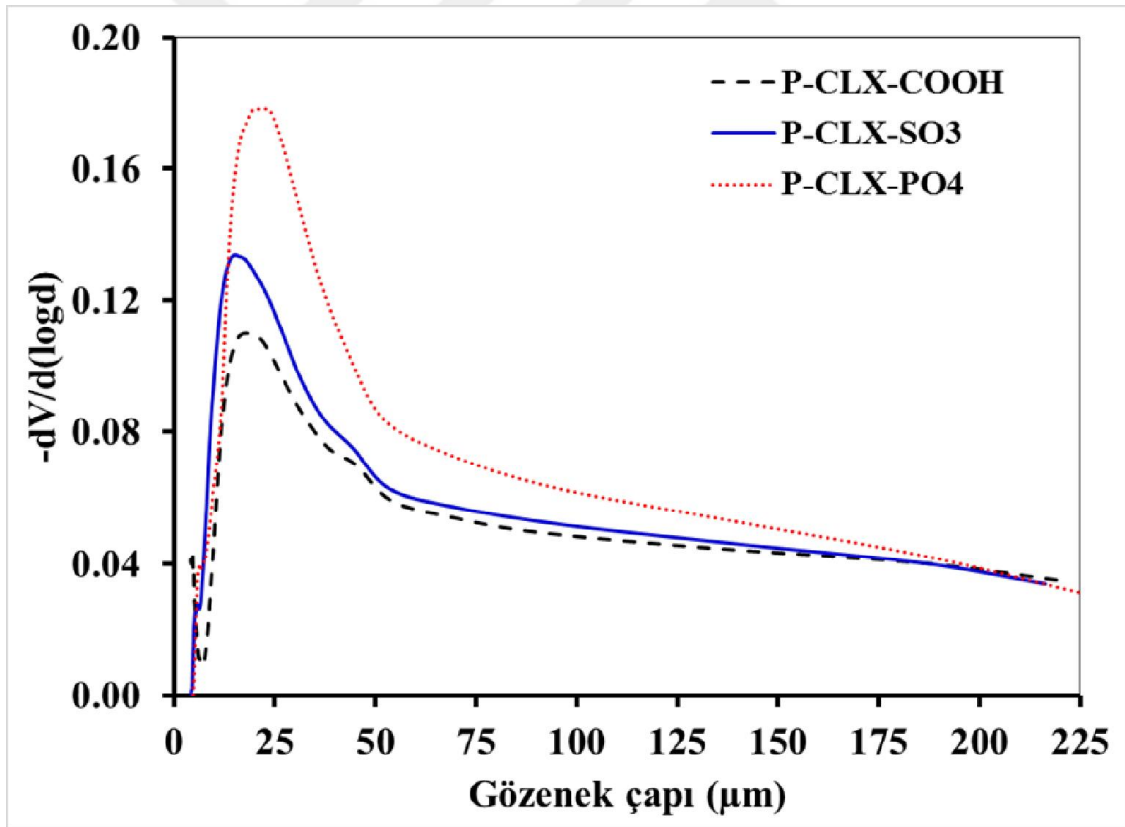
Belirlenen deneysel şartlarda hazırlanan monolitik destek katısına incelenen kaliksaren türevleri immobilize edildi ve elde edilen malzemelerin (P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄) SEM imajları analiz edildi (Şekil 4.12). Sentezlenen her bir sabit fazın yüksek gözeneklilik ve ince duvarlarla birbirine muntazam bir şekilde bağlanmış sürekli gözenekler gibi tipik kriyojel özelliklerini sergiledikleri görülmüştür. Gözeneklerin büyüklükleri incelendiğinde, genel anlamda 20-100 µm aralığında değiştiği görülebilir. Bu büyüklükte gözeneklere sahip monolitik malzemeler, protein gibi büyük moleküllerin yapı içerisinde kolayca transfer olabileceği bir özellik sergilemesi bakımından avantaj sağlamaktadır. Kaliksaren immobilizasyon işleminden sonra monolitin yapısal bütünlüğünü koruduğu da gözlenmiştir. Ayrıca, sentezlenen kriyojellerin sergilediği süpermakro-poröz yapı, kromatografik şartlarda düşük geri basınç sergileme gibi avantajları da sunmaktadır.



Şekil 4.12. P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için SEM imajları

4.2.2 Gözenek dağılımı analizi için civa porozimetrisi ölçümleri

Kaliksaren immobilizasyonu ile elde edilen her üç sabit faz için gözenek dağılımı civa porozimetrisi ile belirlenmiş ve kaydedilen veriler Şekil 4.13'de grafik halinde toplu olarak verilmiştir. Sabit fazların üçünün de süpermakro-gözenekli bir morfolojiye sahip oldukları grafikten açık bir şekilde görülmektedir. Gözeneklerin büyük bir kısmının 10-100 μm aralığında bir büyüklüğe sahip olduğu şekilden görülebilmektedir. Böylece; SEM analizlerinden elde edilen verilerle uyumlu olarak, hazırlanan sabit fazların süpermakro-gözenekli bir morfolojiye sahip oldukları civa porozimetrisi ile de teyit edilmiş ve gözeneklerin 10-100 μm gibi bir aralıkta sürekli bir yapı arz ettiği anlaşılmıştır. Çalışılan monolitik sabit fazların morfolojileri ile ilgili yürütülen bu analizlerden, her bir monoltin protein kromatografisi için uygun yapı sergilediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.13. Hazırlanan monolitik sabit fazlar için gözenek dağılımı grafikleri

4.2.3 Elemental analiz

Destek katısı P ve kaliksaren immobilize edilmiş sabit fazlar için kaydedilen elemental analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablodaki verilerden, her bir katı materyal için yoğun bir karbon iskeletin olduğu anlaşılmaktadır. Polimerleşme işleminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış MBAAm’den kaynaklanan azot elementi de beklenen düzeylerde çıkmıştır. Diğer taraftan, P-CLX-SO₃ için kükürt elementi tespit edilememiştir. Bununla birlikte, ilerleyen bölümlerde de görüleceği üzere sülfonat grubunun varlığı hem FTIR hem de titrimetrik analizlerle teyit edilmiştir. Kaliksaren immobilizasyonundan sonra karbon elementinin düzeyindeki düşüşün kaliksaren immobilizasyonu ile ilintili olduğu düşünülmüştür. Kaliksaren moleküllerindeki karbon yüzdesinin, destek katısı için elementel analizden bulunan %51,83 değerinden daha düşük (veya yakın) olması nedeniyle bu tarz bir düşüşün gözlemlendiği düşünülmüştür. Sonuç olarak, elementel analiz sonuçlarından, kriyojel yapısında gözlenen tipik elementel dağılımlar teyit edilmiş oldu.

Tablo 4.1. Destek katısı P ve hazırlanan sabit fazlar için elementel analiz sonuçları

Sabit faz	C (%)	H (%)	N (%)
P	51,83	7,52	2,39
P-CLX-SO ₃	50,50	7,26	2,39
P-CLX-COOH	50,63	7,42	2,36
P-CLX-PO ₄	51,57	7,35	2,32

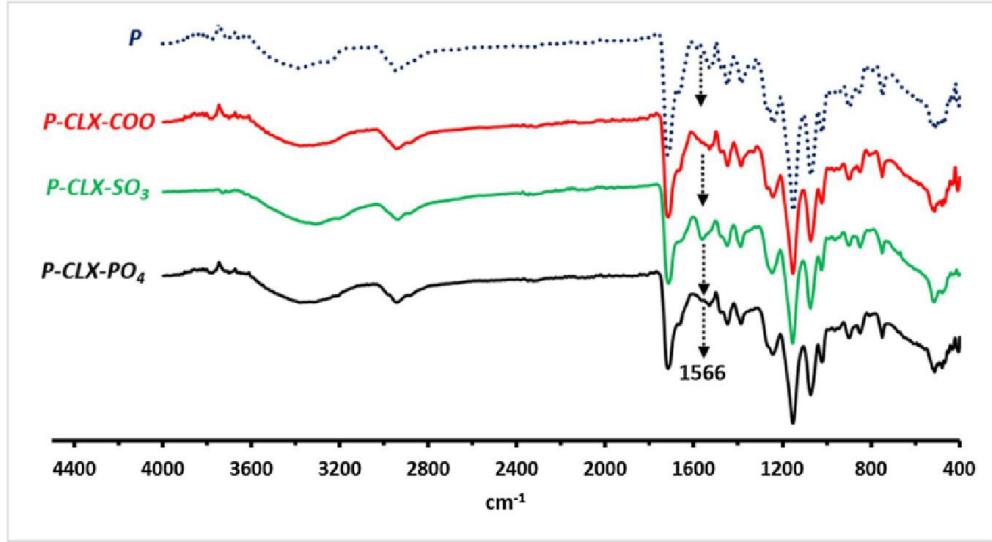
4.2.4 FTIR spektroskopisi analizleri

Kriyojel esaslı destek katısına (P) kaliksaren immobilizasyonundan sonra moleküler düzeyde meydana gelen değişimleri değerlendirebilmek amacıyla FTIR spektroskopisi analizleri yürütülmüştür.

Destek katısının FTIR spektrumunda (Şekil 4.14), temel bantlardan karbonil grupları ile ilişkili bant (1718 cm⁻¹) ve amit yapılarıyla ilişkili bant (1666 cm⁻¹) belirgin bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, C–O titreşim bantlarını 1300-1000 cm⁻¹ aralığında görmek mümkündür. O–H ve N–H gerilme titreşim bantları 3370 cm⁻¹ dolaylarında geniş bir

bant olarak açık bir şekilde tespit edilmiştir. Aynı bölgede 2940 ve 2880 cm^{-1} 'lerde ortaya çıkan alifatik C–H titreşim bantları da spektrumda tespit edilen diğer belli başlı bantlardandır. Sonuç olarak, bilinen bir metot üzerinden sentezlenen destek katısı, P, için moleküler yapı FTIR analizlerinden doğrulanmıştır.

Destek katısı P ve hazırlanan sabit fazlar (P-CLX-SO₃, P-CLX-PO₄ ve P-CLX-COOH) için kaydedilen spektrumlar Şekil 4.14'de verilmiştir. Kaliksaren türevlerine ait bazı spesifik bantların destek katısından kaynaklanan bazı şiddetli bantların altında kalması nedeniyle FTIR spektroskopisi kaliksaren immobilizasyon işlemine dair sınırlı düzeyde bilgi sunmuştur. Bununla birlikte, spektrumlarda immobilizasyon işleminden sonra bazı farklılaşmaların meydana geldiği ve bunların kaliksaren moleküllerindeki titreşim bantlarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Örneğin; her üç kaliksaren türevinin destek katısına immobilize olduğuna dair en önemli bulgu, 1566 cm^{-1} dolaylarında (1595-1539 cm^{-1} aralığında) gözlenen ve tetra-süstitüe aren yapılarıyla ilişkilendirilebilen bandın immobilizasyon işleminden sonra ortaya çıkmasıdır. Süstitüe aren yapısıyla ilişkilendirilen bu bant, saf haldeki kaliksaren türevlerinin FTIR spektrumlarında 1597-1612 cm^{-1} dolaylarında net bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.11). İmmobilizasyondan önce bu bandın destek katısı P'nin spektrumunda bulunmaması kaliksaren immobilizasyonu için önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Kaliksaren moleküllerindeki fonksiyonel grupların aromatik halkalara kovalent bağlarla bağlı olması nedeniyle (bkz. NMR spektroskopisi sonuçlarına) immobilizasyon işleminden sonra destek katısının yüzey asidik özelliklerinde bir artışın meydana gelmesini beklemek makul bir yaklaşımdır. Bu nedenle, kaliksarenlerin destek katısına immobilizasyonunu desteklemek amacıyla, hazırlanan sabit fazların yüzey yük özelliklerinin incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.14. P, P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için toplu FTIR spektrumları

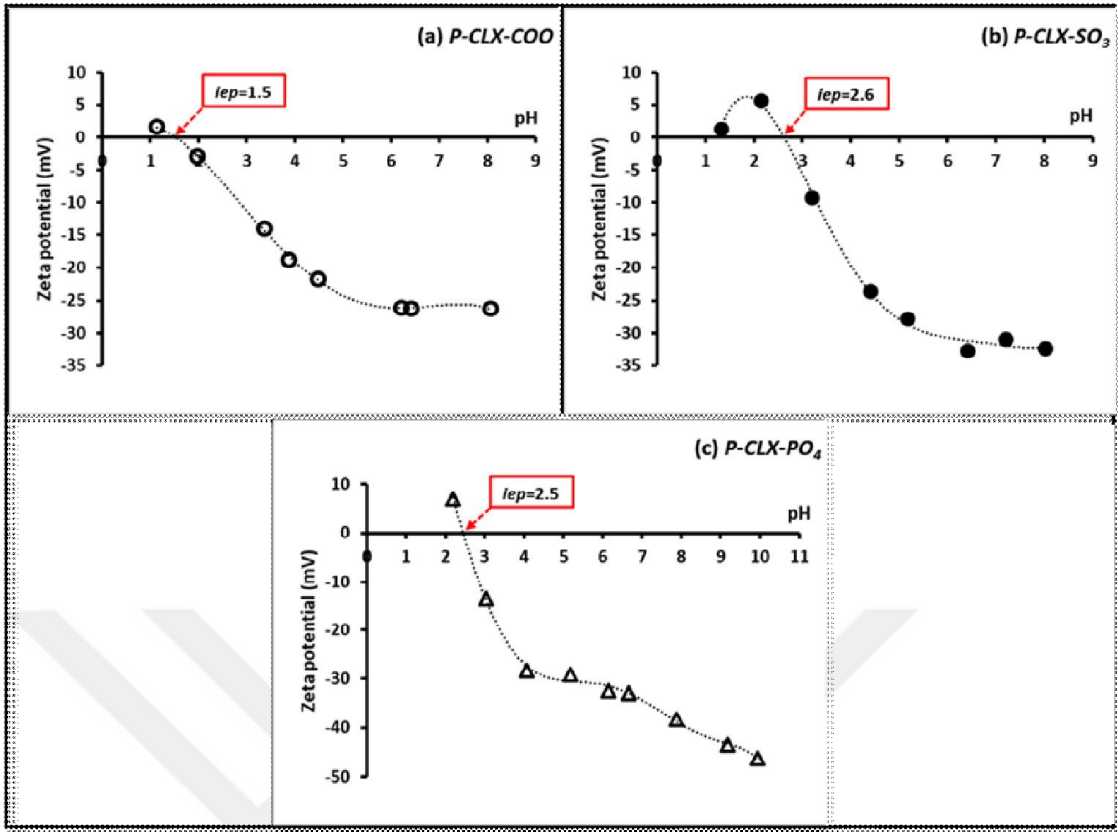
4.2.5 P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için izoelektrik nokta tayini

Sabit fazların iyonik/iyonlaşabilen türlerle etkileşmesini belirleyen en önemli özelliklerden bir tanesi de sabit fazın çalışılan şartlarda yüzeyinde taşıdığı yükür. pH'nın bir fonksiyonu olarak değerlendirilen bu özellik, genellikle izoelektrik noktası (iep: isoelectric point) temelinde analiz edilir. İzoelektrik noktası, sabit fazın, net bir elektriksel yük taşımadığı pH değeri olarak ifade edilebilir. Bu nedenle, izoelektrik noktanın belirlenmesi ile iyonik türlerin sabit faz ile (pH'ya bağlı olarak) etkileşme düzeyleri hakkında ön değerlendirmeler yapmak ve deneysel şartları buna göre belirlemek mümkündür. Bu tarz bir yaklaşım, proteinlerin iyon değiştirici sabit fazlar üzerindeki alıkonma davranışlarının daha makul bir şekilde incelenmesini de mümkün kılmaktadır.

P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için yürütülen analizlerden elde edilen deneysel veriler Şekil 4.15'de grafiğe geçirilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere, yüzeyinde asidik fonksiyonel grup taşıyan kaliksarenlerin destek katısına immobilize edilmesiyle izoelektrik noktaları (beklendiği üzere) düşük çıkmıştır (P-CLX-COOH için ~1,5 ve P-CLX-SO₃ için ~2,6 ve P-CLX-PO₄ için ~2,5). Bu durum, her üç sabit fazın da asidik karakterde yüzeye sahip olduklarını göstermiş olup, çalışılan kaliksaren türevlerinin monolitik destek katısına (P) başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. Yapısında epoksit grubu içeren destek katısı P'nin, asit-bazlarla

reaksiyona girebilme (epoksit grubunun asidik/bazik ortamda açılması) özelliğinden dolayı P için iep ölçümleri yürütülmemiştir. Diğer taraftan, kısa bir süre önce yürüttüğümüz bir diğer çalışmada (Özkan vd., 2018), GMA monomeri kullanılmadan hazırlanan poli(2-hidroksietil metakrilat, PHEMA) esaslı monolit için izoelektrik noktası 6,2 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, metakrilat esaslı destek katısı P'ye fosfonat, sülfonat ve karboksilat grupları içeren kaliksarenlerin immobilize edilmesiyle yüzeyin asidik karakterinde meydana gelen değişimi göstermesi bakımından önemlidir.

Sonuç olarak; kaliksaren immobilizasyonundan sonra monolitlerin yüzeylerinin asitliğinde belirgin bir artış meydana gelmiş ve çalışılan pH değerlerinde ($\text{pH} \geq 5$) hazırlanan sabit fazların negatif yüklerle yüklenmiş olacağı belirlenmiştir. Bu nedenle; Chy, Cyt ve Lys gibi iep değeri yüksek proteinlerle elektrostatik etkileşimler üzerinden etkileşebileceği ve bu proteinleri iyon-değişim mekanizmasına göre bağlayabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan, her iki sabit fazın düşük iep'ye sahip HSA ve Mb'ye karşı düşük kapasite sergileyeceği öngörülmüştür. Nitekim sonraki bölümlerde sunacağımız kromatografik veriler bunu doğrulamıştır. Tüm bu değerlendirmelerden, kaliksarenlerin monolitik destek katısına başarılı bir şekilde immobilize edildiği anlaşılmıştır.



Şekil 4.15. P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için zeta potansiyeli ölçümleri

4.2.6 P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için titrimetrik analizler

P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazları için yüzeydeki fonksiyonel grup sayısını belirlemek amacıyla sabit fazın türüne bağlı olarak pH titrasyonları veya kompleksimetrik titrasyonlar yürütülmüştür. Geniş bir pH aralığında anyonik formda bulunan sülfonat grubunun sayısını belirlemek için pH titrasyonlarında karşılaşılan güçlükler nedeniyle, P-CLX-SO₃ sabit fazının yüzeyindeki sülfonat grubunun sayısı EDTA titrasyonları ile belirlenmiştir. P-CLX-COOH ve P-CLX-PO₄ sabit fazları için fonksiyonel grup sayısı pH=7'ye kadar titre edilebilen asidite cinsinden değerlendirilmiştir.

P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazları için hesaplanan fonksiyonel grup sayıları/pH=7'ye titre edilebilen asidite değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Buradan elde edilen veriler, karakterizasyon amacıyla yürütülen diğer analizler ile uyumlu olarak, kaliksaren immobilizasyonu ile destek katısının yüzeyinin asidik bir karakter kazandığını teyit etmiştir. P-CLX-SO₃ için bulunan sülfonat grubu sayısının, literatürde

kriyojel esaslı destek katısına 3-merkaptopropan sülfonik asit immobilizasyonundan elde edilmiş sülfonik asit grubu sayısına yakın olduğu görülmüştür (0,53 mmol/g) (Perçin vd., 2015).

Sonuç olarak; genel anlamda, yüzeye immobilize edilmiş fonksiyonel grup sayısının beklenen düzeylerde olduğu ve daha da önemlisi, kaliksaren moleküllerinin destek katısı P'ye başarılı bir şekilde immobilize edildiği titrimetrik yöntemlerle teyit edilmiştir.

Tablo 4.2. Hazırlanan sabit fazlardaki asidik fonksiyonel grupların miktarı

Sabit faz →	P-CLX-SO ₃	P-CLX-PO ₄	P-CLX-COOH
İmmobilize edilmiş kaliksaren türevi ve molar kütlesi (g/mol)	CLX-SO ₃ (832,67 g/mol)	CLX-PO ₄ (832,33 g/mol)	CLX-COOH (600,53 g/mol)
Fonksiyonel grup sayısı (mmol/g)	0.60 mmol/g	0,20 mmol/g ^a	0,35 mmol/g ^a
Titrasyon türü	Kompleksimetri	Asidimetri	Asidimetri

^a Kaliksaren türevlerinin kompleks yapısı ve asidik özelliğe sahip fonksiyonel grupların çeşitliliği nedeniyle bu türler için asidik fonksiyonel grup sayısı pH=7'ye kadar titre edilen asidite cinsinden rapor edilmiştir.

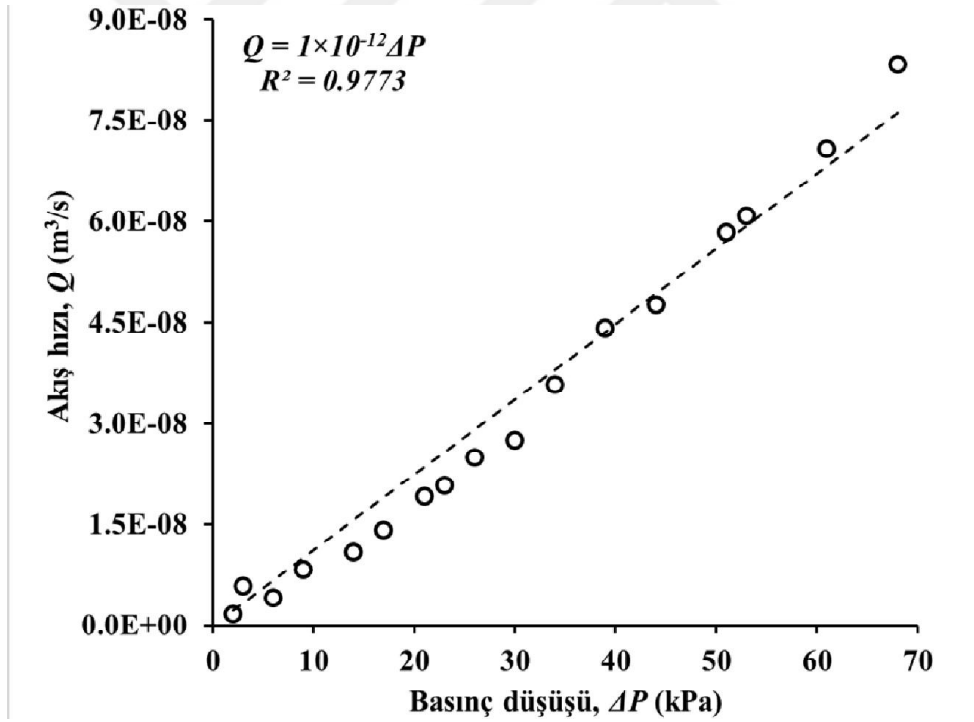
4.3 Kromatografik İşlemler

4.3.1 Monolit için su geçirgenliği analizi

Sabit fazın su geçirgenliği, kromatografik işlem süresince kolonun sergileyeceği geri basıncın düzeyi ile ilişkilidir. Bu nedenle; yüksek su geçirgenliği sergileyen bir sabit fazın, sulu hareketli fazların kullanıldığı şartlarda genellikle düşük bir geri basınç sergilemesi beklenir.

Bu kapsamda yürüttüğümüz analizlerden elde edilen verilerden (Şekil 4.16), monolitik kriyojel için k_w değeri $6,13 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ (veya 6,13 d; d=darcy) olarak hesaplanmıştır. Bazı kriyojeller için literatürdeki değerler Tablo 4.3'te listelenmiştir. Sunulan değerlerle karşılaştırıldığında, çalışmamızda kullandığımız kriyojel desteğinin literatürdeki

kriyojellerle uyumlu bir davranış sergilediğini söylemek mümkündür. Ayrıca, verilen çalışmalardaki kriyojellerin bir kısmına göre yaklaşık 10 kat daha yüksek su geçirgenliği sergilediği görülmektedir. Hesaplanan değer, kriyojel esaslı monolitik malzemenin yüksek akış hızlarında dahi çok düşük düzeyde geri basınç sergilediğini göstermektedir. Bu özellik, kromatografik sistemlerin kullanım ömrü bakımından avantajlıdır. Bu çalışmada kullandığımız destek katısının yüksek düzeyde gözenekli bir yapıya sahip olduğu, çok iyi bir su geçirgenliği sergilediği ve kromatografik şartlarda ise kütle transfer direncinin çok düşük düzeyde olacağı sonucuna varılmıştır. Monolitik destek katısına (P) kaliksaren immobilizasyonu, kriyojel morfolojisini bozucu bir etkiye sahip olmadığından, aynı sonuçları P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ için de genellemek mümkündür. Nitekim yukarıda sunulan SEM ve civa porozimetrisi analizlerinden, immobilizasyon işleminin monolitin yapısı üzerinde bozucu bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.16. Akış hızı ile basınç düşüşü arasındaki ilişki

Akış: 0,15-5,00 mL/dak aralığında değiştirilmiştir; Sıcaklık: 25 °C; Kolon: 5,0×120 mm; ΔP=P₂– P₁ (P₂: Kolon+sistem basıncı; P₁: Sistem basıncı). Ölçümler HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3. Literatürdeki kriyojel esaslı monolitik malzemeler için elde edilmiş su geçirgenliği, k_w , değerleri

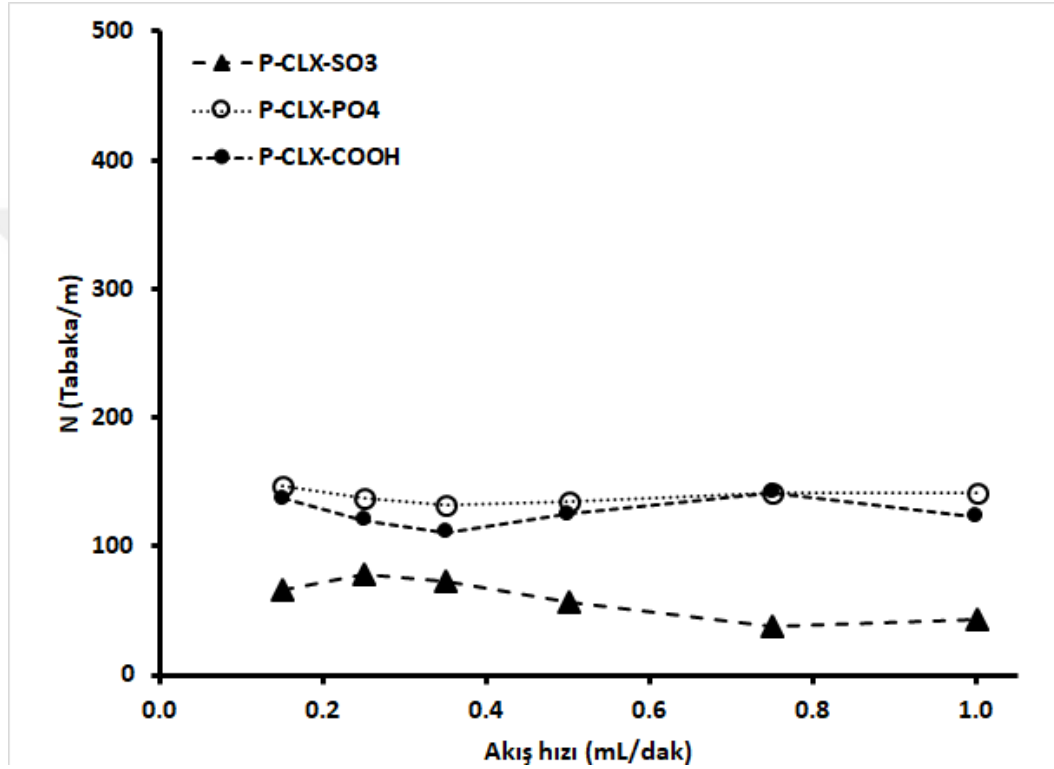
Kriyojel türü	Hesaplanan k_w değeri (m^2)	Referans
Magnetit nanopartikül içerikli kriyojel	$8,27 \times 10^{-13}$	(Yao vd., 2006)
Akrilamid esaslı	$4,29 \times 10^{-10}$	(Yun vd., 2012)
Polimer içerikli kompozit kriyojeller	$0,748 \times 10^{-13} - 1,59 \times 10^{-13}$	(Wang and Sun 2013)
Akrilamid esaslı	$4,71 \times 10^{-13}$	(Carvalho vd., 2014)
Metakrilat esaslı	$2,66 \times 10^{-13}$	(Perçin vd., 2015)
Metakrilat esaslı (Bu çalışma)	$6,13 \times 10^{-12}$	(Güven vd., 2018)

4.3.2 Akış hızı-teorik tabaka ilişkisi

Granüler sabit fazlarla doldurulmuş kolonlarda teorik tabaka yüksekliği birkaç yüzden birkaç bin gibi yüksek değerlere kadar çıkabildiğinden, en yüksek teorik tabaka değerine karşılık gelen akış hızının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Diğer taraftan, süpermakroporöz yapıda bir gözenek dağılımı sergileyen monolitik kriyojeller kullanılarak hazırlanmış kolonlarda, büyük gözenekli yapının bir sonucu olarak teorik tabaka sayısı yukarıda belirtilen tip kolonlardaki değerlere göre çok daha düşük çıkmaktadır. Bu nedenle, monolitik kriyojellerden hazırlanmış kolonların performansını değerlendirirken akış hızı ve teorik tabaka arasındaki ilişki daha çok kütle transferine karşı sabit fazın çok az direnç sergilediğini göstermek amacıyla yürütülmektedir (Perçin vd., 2015).

Bu kapsamda yürüttüğümüz deneylerde, analit olarak Chy kullanılmış ve adsorpsiyonun etkisini minimize etmek amacıyla hareketli faz olarak %100 NaCl çözeltisi kullanılmıştır (1,0 M NaCl; 20 mM fosfat tamponunda pH=7). 0,15–1,00 mL/dak aralığında değişen farklı akış hızlarında kaydedilen piklerden teorik tabaka sayıları hesaplanmıştır. P-CLX-COOH, PCLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ ve sabit fazları üzerinde (5,0×120 mm'lik kolonlar) kaydedilen verilerden hesaplanan değerler Şekil 4.17'te

grafiksel olarak verilmiştir. Şekil incelendiğinde, teorik tabaka sayısının, çalışılan her iki sabit faz için de akış hızından neredeyse bağımsız olduğunu görmek mümkündür. Bu nedenle, kolonlarda kütle transfer direncinin düşük olduğu ve madde taşınımının difüzyondan ziyade konveksiyon ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuç, kriyojel esaslı kolonlarda sıklıkla karşılaşılan bir durumu göstermektedir (Plieva vd., 2004).



Şekil 4.17. Teorik tabaka sayısı, N, ile akış hızı arasındaki ilişki

4.3.3 pH, gradyent eğimi ve kapasite faktörleri arasındaki ilişkinin incelenmesi

Kromatografide, sabit faz ile analit arasındaki etkileşme düzeylerinin ve alıkonma özelliklerinin bir göstergesi olarak en çok kullanılan niceliklerden biri kapasite faktörüdür (k'). Kapasite faktörü, türlerin birbirinden ayrılabilceği deneysel şartların öngörülmesi noktasında da önemli bilgiler sunmaktadır. Bu amaçla pH ve hareketli faz bileşimi gibi deneysel değişkenlere bağlı olarak kapasite faktöründeki değişimler incelenir ve buna göre ayırma şartları araştırılır.

Hazırlanan sabit fazların model proteinlerle etkileşme özellikleri yoğun bir şekilde incelenmiştir. Bu noktada, öncelikle kapasite faktörleri ile pH ve gradyent eğimi arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmalarda, pH aralığı olarak 5,0–7,0 ve gradyent eğimi (β) aralığı olarak da 33,3–200 mM/dak çalışılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de grafiksel olarak verilmiştir.

Çalışılan her bir model protein için her üç sabit faz üzerinde elde edilen kapasite faktörlerine bakıldığında, proteinlerin izoelektrik noktaları ile uyumlu bir durumun sergilendiği görülebilmektedir. iep sıralaması Lys>Cyt>Chy [Lys (iep~11), Cyt (iep~10), Chy (iep~9)] olduğundan, iyon-değişim kromatografisi şartlarında proteinlerin Chy-Cyt-Lys sırasında kolondan elue olması beklenen bir sonuçtur. Bu durum, proteinlerdeki pozitif yük yoğunluğunun izoelektrik noktalarına ve pH’ya bağlı olarak Lys>Cyt>Chy sırasında azalmasıyla ilişkilendirilmiştir.

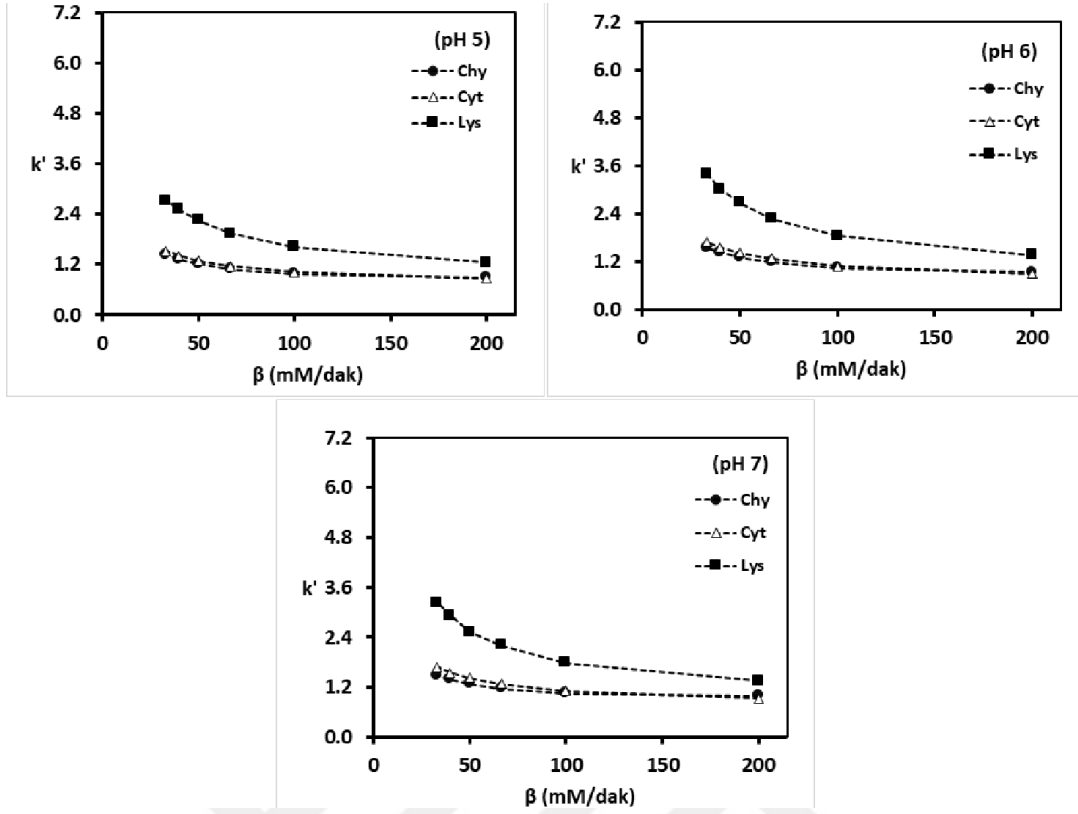
Yapılan deneylerden elde edilen en önemli bulgulardan bir tanesi de, incelenen tüm sabit fazlar üzerinde, pH arttıkça (pH 5–7 aralığında) kapasite faktörlerinin genel anlamda artmış olmasıdır. Katyon değiştirici sabit fazların çalışılan model proteinlere karşı sergilediği tipik durumun aksine (pH düştükçe, katyon değiştirici sabit fazlar üzerinde Chy, Cyt ve Lys’nin alıkonma faktörleri genellikle artar; çünkü proteinler üzerindeki pozitif yük yoğunluğu artar) pH artışı ile kapasite faktörlerinin artmış olması, proteinlerin sabit fazlarla etkileşmesinde başka etkilerin de rol aldığını düşündürmüştür. Bu husus ilerleyen bölümlerde kapsamlı bir şekilde tartışılacaktır. Diğer taraftan, her üç model proteinin her üç sabit faz üzerinde de ancak NaCl etkisiyle yürüdüğü tespit edilmiş olduğundan, iyon-değişim mekanizmasının proteinlerin alıkonmasında önemli bir rol aldığını söylemek mümkündür.

Hazırlanan monolitik sabit fazlar üzerinde elde edilen veriler birbiriyle kıyaslandığında, genel olarak tüm pH değerlerinde en yüksek kapasite faktörlerinin P-CLX-PO₄ ile kaydedildiği görülmüştür. Çalışılan proteinlerin kapasite faktörlerinin Lys>Cyt>Chy sırasında azaldığı ve sabit fazların kapasite faktörleri temelindeki verimliliklerinin de P-CLX-PO₄>P-CLX-SO₃>P-CLX-COOH sırasında azaldığını söylemek mümkündür. En düşük performansın P-CLX-COOH tarafından sergilenmiş olması, zayıf katyon değiştirici özelliği ile ilişkilendirilmiştir. Daha kuvvetli katyon değiştirici gruplar içeren diğer iki sabit faz üzerinde proteinlerin daha yüksek düzeyde alıkonma sergiledikleri

görülmüştür. Ayrıca; P-CLX-COOH sabit fazında zayıf asidik karakterleri nedeniyle –COOH gruplarından bir kısmının çalışılan pH değerlerinde iyonlaşmamış olabileceği düşünülmektedir. Bu da, bu sabit fazın proteinlerle daha düşük kapasiteli bir etkileşmeye girmesinin altında yatan bir diğer neden olarak değerlendirilebilir. Çalışılan şartlarda, iyonlaşan her bir –COOH grubunun bir sonraki –COOH grubunun iyonlaşmasını baskılayacağı gerçeği de göz önünde bulundurulduğunda, P-CLX-COOH sabit fazı üzerinde kaydedilen kapasite faktörlerinin neden diğer sabit fazlara göre daha düşük olduğu daha net bir şekilde anlaşılabilir. Bu anlamda, çalışılan sabit fazların sergilediği davranışlar, destek katısına immobilize edilmiş kaliksaren türevlerinin fizikokimyasal özellikleri ile uyumlu bir durum sergilemiştir.

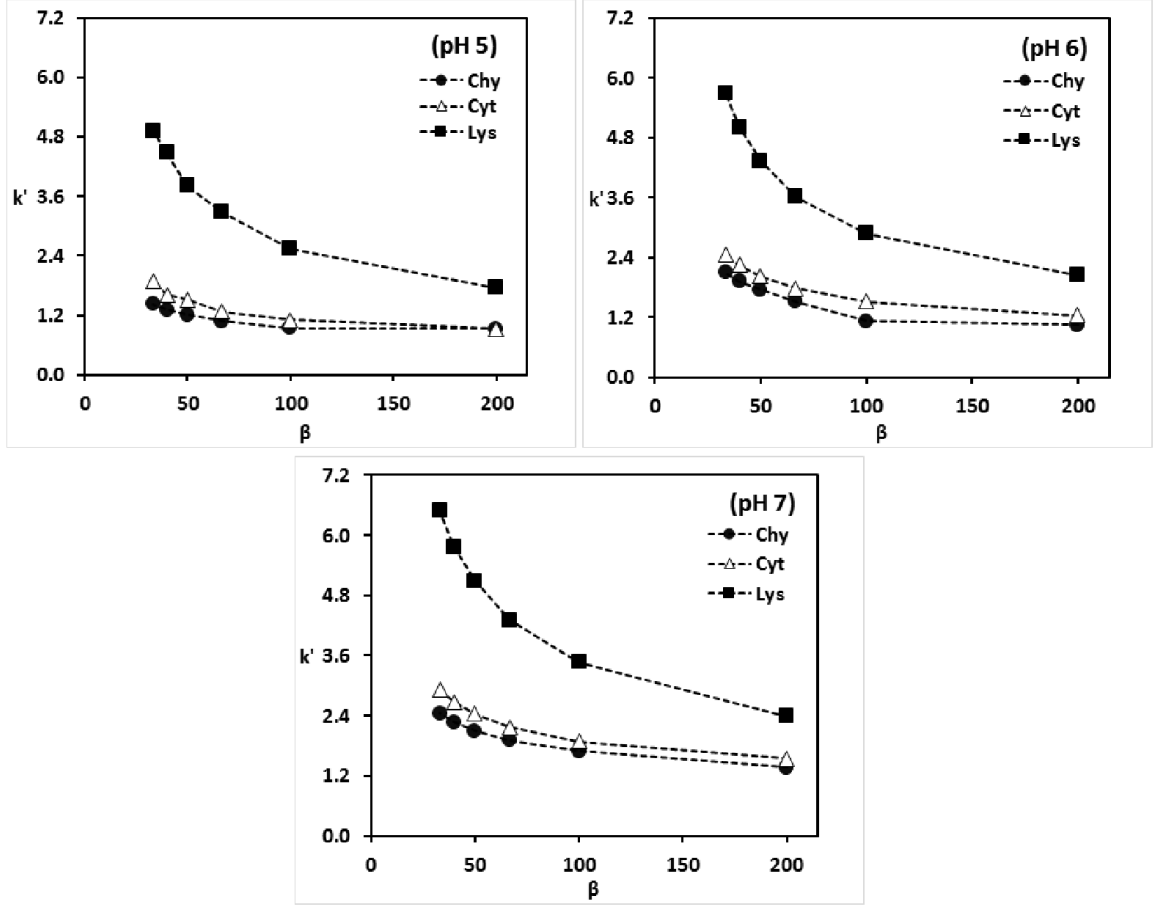
Gradyent eğiminin alıkonma davranışları üzerindeki etkisi de belirgin bir şekilde grafiklerden görülebilmektedir. Gradyent eğiminin artmasıyla (yani hareketli fazdaki tuz konsantrasyonunda birim zamanda gerçekleştirilen artış, β) çalışılan tüm proteinlerin sabit fazlar üzerinde daha hızlı bir şekilde elue olduğu tespit edilmiştir. Yani, hareketli fazdaki tuz konsantrasyonu gradyent elüsyonla kademeli bir şekilde artırılarak proteinlerin sergiledikleri alıkonma davranışları kolayca kontrol edilebilmiştir. Bu durum, Şekil 4.21’de verilen kromatogramlardan da açık bir şekilde görülebilmektedir. Diğer model proteinler ve sabit fazlar üzerinde de benzer kromatogramlar elde edilmiştir.

Yukarıda kısaca belirtildiği gibi; çalışmalarımızda elde ettiğimiz diğer önemli bir bulgu ise; pH 5,0–7,0 aralığında, Chy, Cyt ve Lys’nin hareketli fazda sadece fosfat tamponu varken (yani hareketli faza henüz NaCl verilmemişken) çalışılan sabit fazlar üzerinde elue olmadığının tespit edilmiş olmasıdır. Bu durum, NaCl’nin, protein-alıkonma davranışları ve elüsyon üzerindeki etkisini belirgin bir şekilde göstermiş ve bu nedenle alıkonma mekanizması başlıca iyon-değişimine atfedilmiştir. Ayrıca; iep değerleri Chy, Cyt ve Lys’ye göre daha düşük olan Mb (Miyogloblin) ve HSA’nın (serum albümin) [Lys (iep~11), Cyt (iep~10), Chy (iep~9), Mb (iep~7) ve HSA (iep~5)] hareketli fazda hiç tuz olmadan bile kolayca yürüyebildiği tespit edilmiştir.



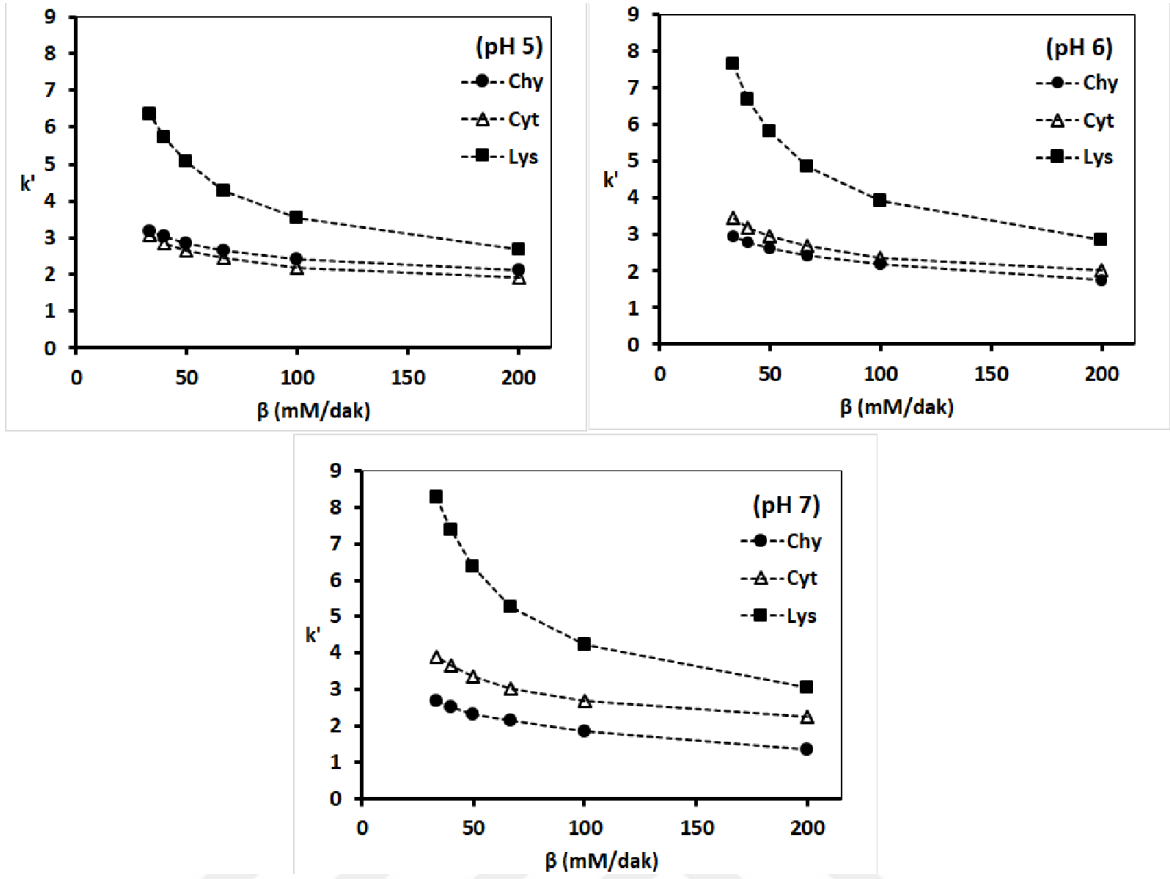
Şekil 4.18. PHEMA-CLX-COOH üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar

Deneysel şartlar: Kolon: 5,0×120 mm; Sıcaklık: 25 °C; Akış: 0,50 mL/dak; Hareketli faz: Çeşitli oranlarda fosfat tamponu (20 mM; pH 5,0; 6,0 ve 7,0) ve NaCl çözeltisi (1,0 M; 20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Protein konsantrasyonları: 1 mg/mL (20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Enjeksiyon hacmi: 10 μ L.



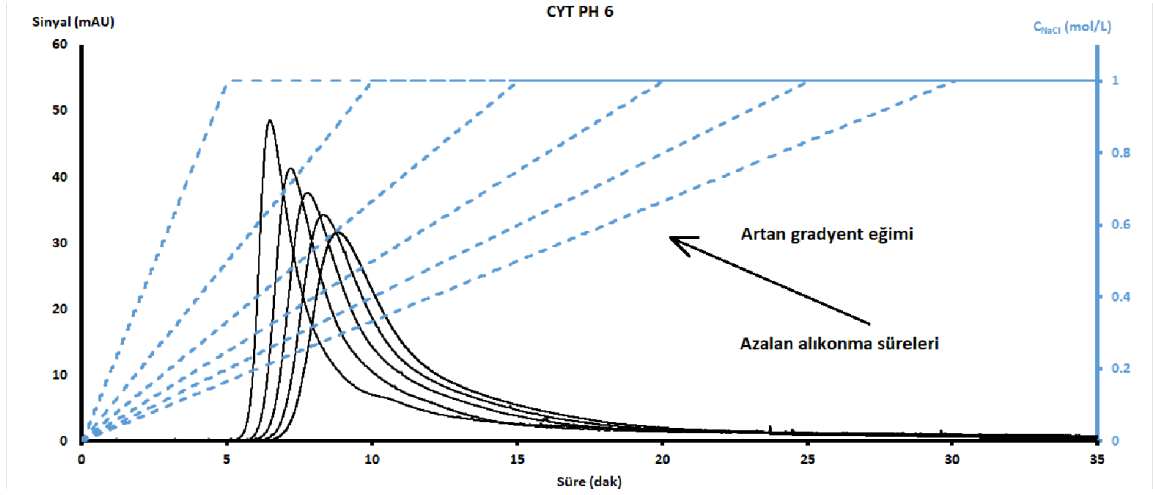
Şekil 4.19. PHEMA-CLX-SO₃ üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar

Deneysel şartlar: Kolon: 5,0×120 mm; Sıcaklık: 25 °C; Akış: 0,50 mL/dak; Hareketli faz: Çeşitli oranlarda fosfat tamponu (20 mM; pH 5,0; 6,0 ve 7,0) ve NaCl çözeltisi (1,0 M; 20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Protein konsantrasyonları: 1 mg/mL (20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Enjeksiyon hacmi: 10 μ L.



Şekil 4.20. PHEMA-CLX-PO₄ üzerinde, gradyent eğimi (β) ve pH'ya bağlı olarak model proteinlerin kapasite faktörlerindeki (k') farklılaşmalar

Deneysel şartlar: Kolon: 5,0×120 mm; Sıcaklık: 25 °C; Akış: 0,50 mL/dak; Hareketli faz: Çeşitli oranlarda fosfat tamponu (20 mM; pH 5,0; 6,0 ve 7,0) ve NaCl çözeltisi (1,0 M; 20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Protein konsantrasyonları: 1 mg/mL (20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Enjeksiyon hacmi: 10 μ L.



Şekil 4.21. Gradyent eğiminin kromatografik bantlar üzerine etkisinin grafiksel gösterimi

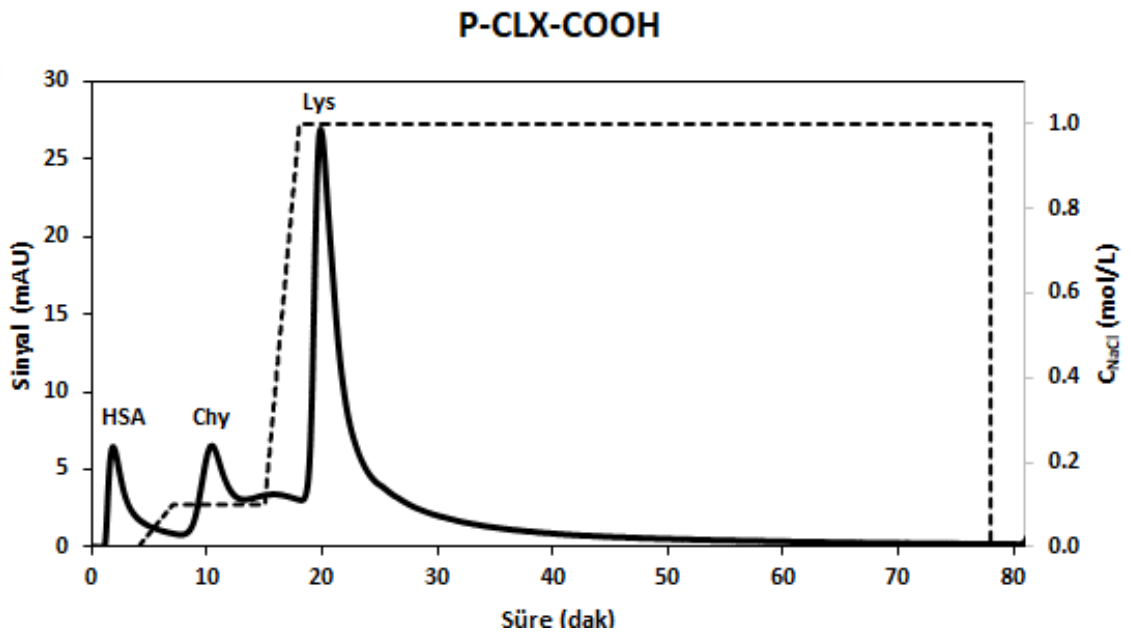
Deneysel şartlar: Kolon: 5,0×120 mm; Sıcaklık: 25 °C; Akış: 0,50 mL/dak; Hareketli faz: Çeşitli oranlarda fosfat tamponu (20 mM; pH 5,0; 6,0 ve 7,0) ve NaCl çözeltisi (1,0 M; 20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Protein konsantrasyonu: 1 mg/mL (20 mM fosfat tamponunda, pH 5,0; 6,0 ve 7,0); Enjeksiyon hacmi: 10 µL; Deteksiyon: 410 nm.

4.3.4 Kromatografik ayırmalar

Deneysel süreçte, 3 farklı kaliksaren türevinin (CLX-COOH, CLX-SO₃ ve CLX-PO₄) kriyojel esaslı destek katısına immobilize edilmesiyle elde edilen sabit fazların protein ayırma işlemlerindeki verimliliği de incelenmiştir. Bu amaçla, farklı pH ve gradyent eğimlerinde yürütülen bir dizi analiz neticesinde kromatografik ayırma optimize edilmiş ve sabit fazların performansı birbiriyle karşılaştırılmıştır.

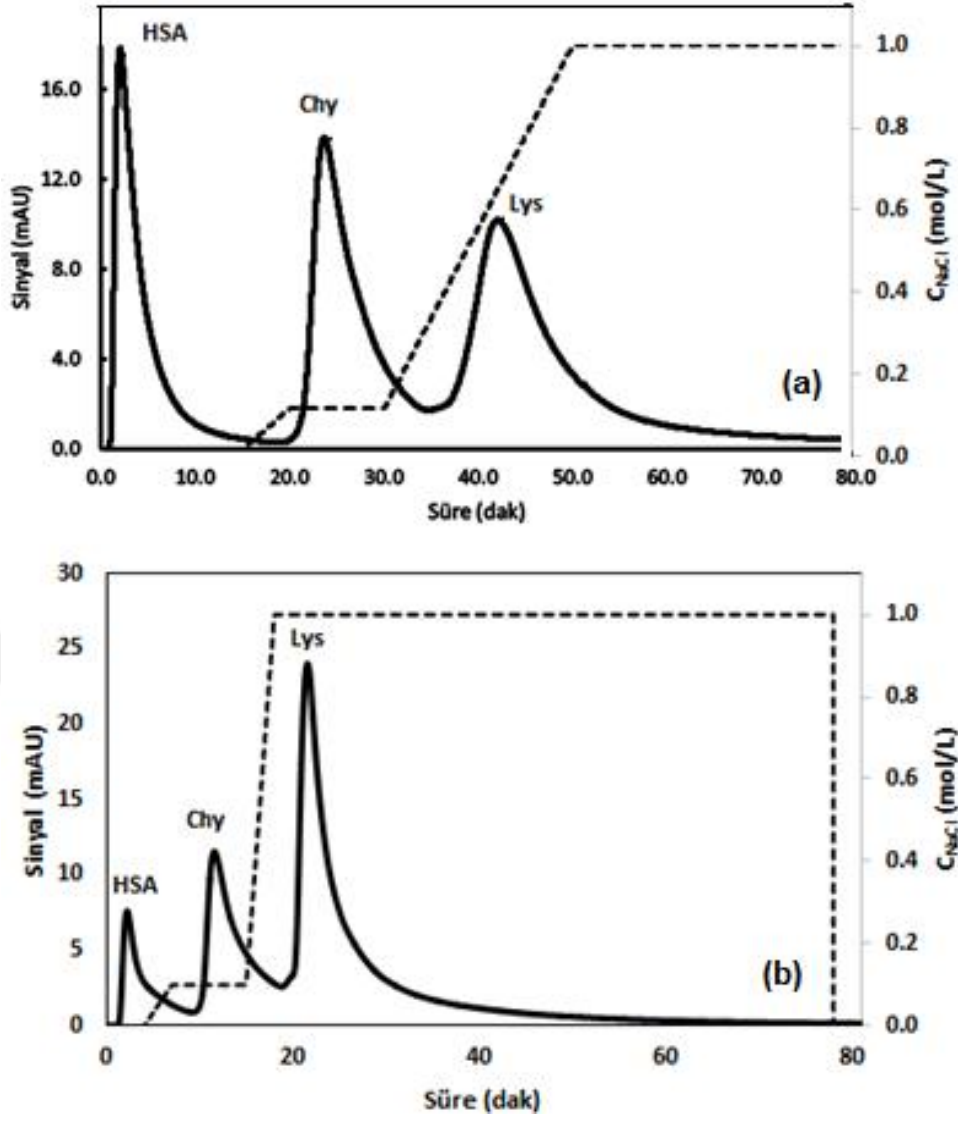
İncelenen her üç sabit faz üzerinde en iyi ayırma verimi P-CLX-PO₄ sabit fazı üzerinde elde edilmiştir. İncelenen diğer iki sabit faz üzerinde (P-CLX-SO₃ ve P-CLX-COOH), farklı deneysel şartlarda, Chy ve Cyt proteinlerini birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24). P-CLX-SO₃ ve P-CLX-COOH ile yapılan deneylerde Chy ve Cyt birlikte elue olduğundan, Cyt'nin yer aldığı kromatogramları göstermeye gerek duyulmamıştır. Diğer taraftan, P-CLX-PO₄ sabit fazı üzerinde Chy, Cyt ve Lys proteinleri birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabilmiştir (Şekil 4.25). Grafikten de görüldüğü üzere, uygulanan tuz gradyentinde yapılan küçük değişikliklerin dahi ayırma verimi üzerine önemli etkilere yol açtığı da tespit edilmiştir.

Son olarak; HSA, Chy, Cyt ve Lys içeren karışımdaki her bir bileşen P-CLX-PO₄ üzerinde, pH=7,5'te başarılı bir şekilde ayrılabilmiş ve benzer ayırmalar Mb, Chy, Cyt ve Lys içeren karışım ile de elde edilmiştir (Şekil 4.26). (Not: Diğer taraftan Chy ve Cyt proteinleri P-CLX-SO₃ ve P-CLX-COOH sabit fazları üzerinde pH=7,5'te de birbirinden ayıramamıştır). Daha önce de belirtildiği üzere; HSA ve Mb'nin diğer model proteinlerden önce elue olmaları, proteinlerin sahip oldukları iep ve dolayısıyla ilgili pH değerlerindeki yük yoğunlukları ile uyumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Tüm proteinlerin iep değerleri ile uyumlu bir elüsyon sırası sergilemiş olduklarını da tekrar belirtmek gerekir.



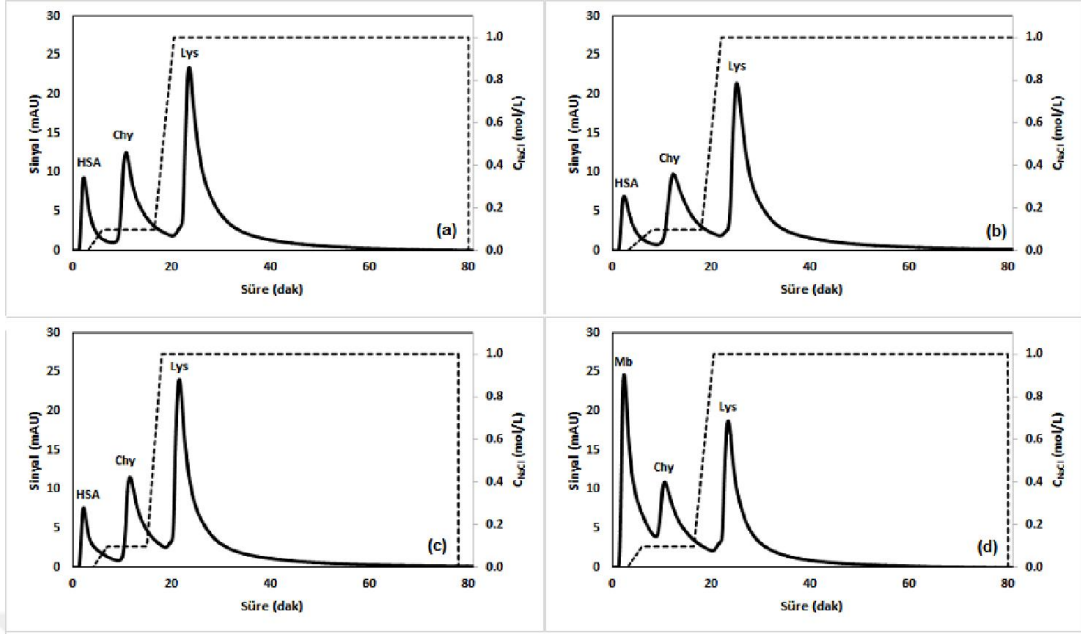
Şekil 4.22. P-CLX-COOH sabit fazı üzerinde kaydedilen kromatogram

Deneysel şartlar: Hareketli faz pH'sı=7,0; Akış hızı=0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon fırını=25 °C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Protein konsantrasyonu: HSA: 0,5 mg/mL; Chy: 1,0 mg/mL; Lys: 1,0 mg/mL (fosfat tamponunda; pH 7,0).



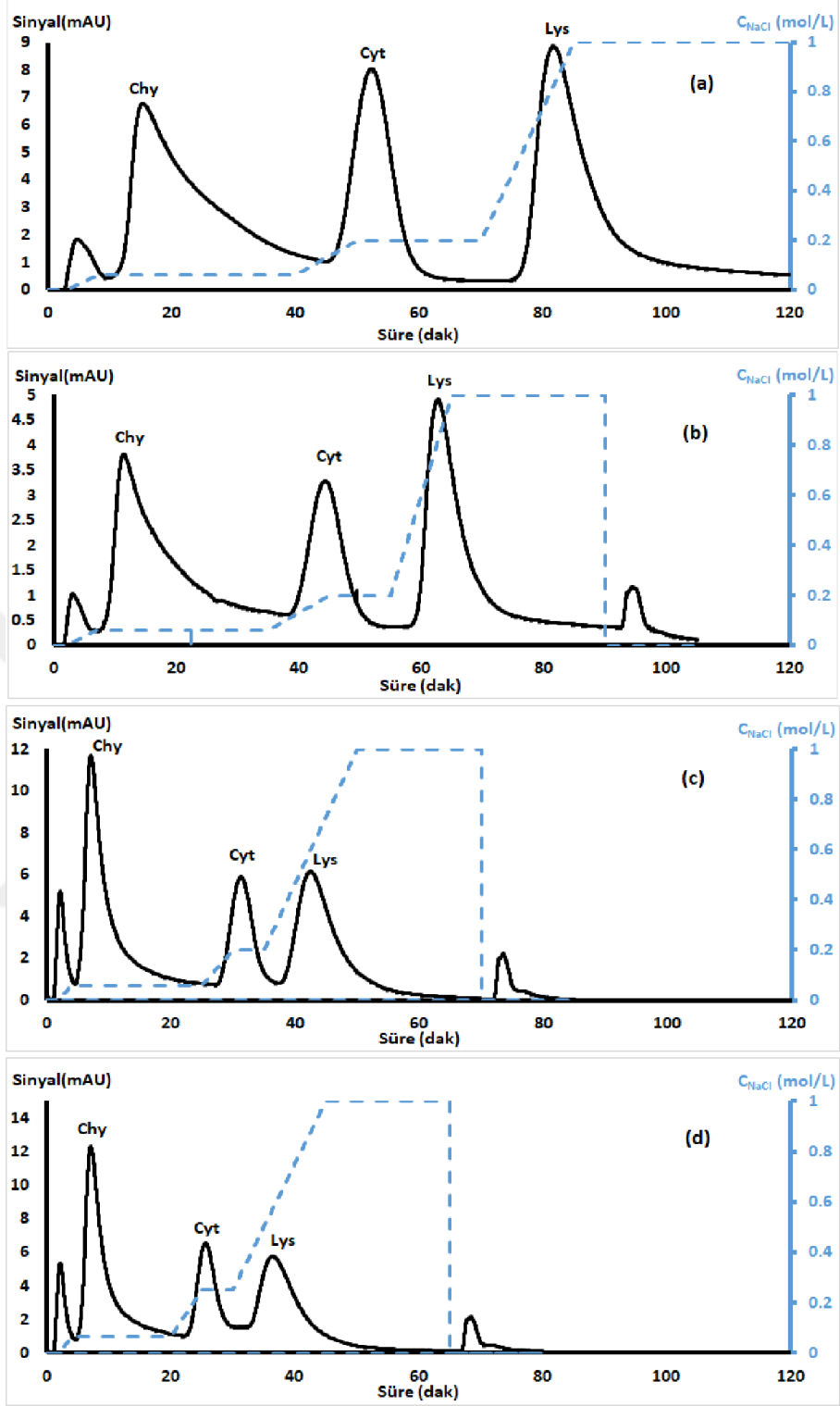
Şekil 4.23. P-CLX-SO₃ üzerinde kaydedilen ve ayırmanın iyileştirilmesine yönelik bazı kromatogramlar

Deneysel şartlar: Hareketli faz pH'sı=7,0; Akış hızı=0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon fırını=25 °C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Protein konsantrasyonu: HSA: 0,5 mg/mL; Chy: 1,0 mg/mL; Lys: 1,0 mg/mL (fosfat tamponunda; pH 7,0).



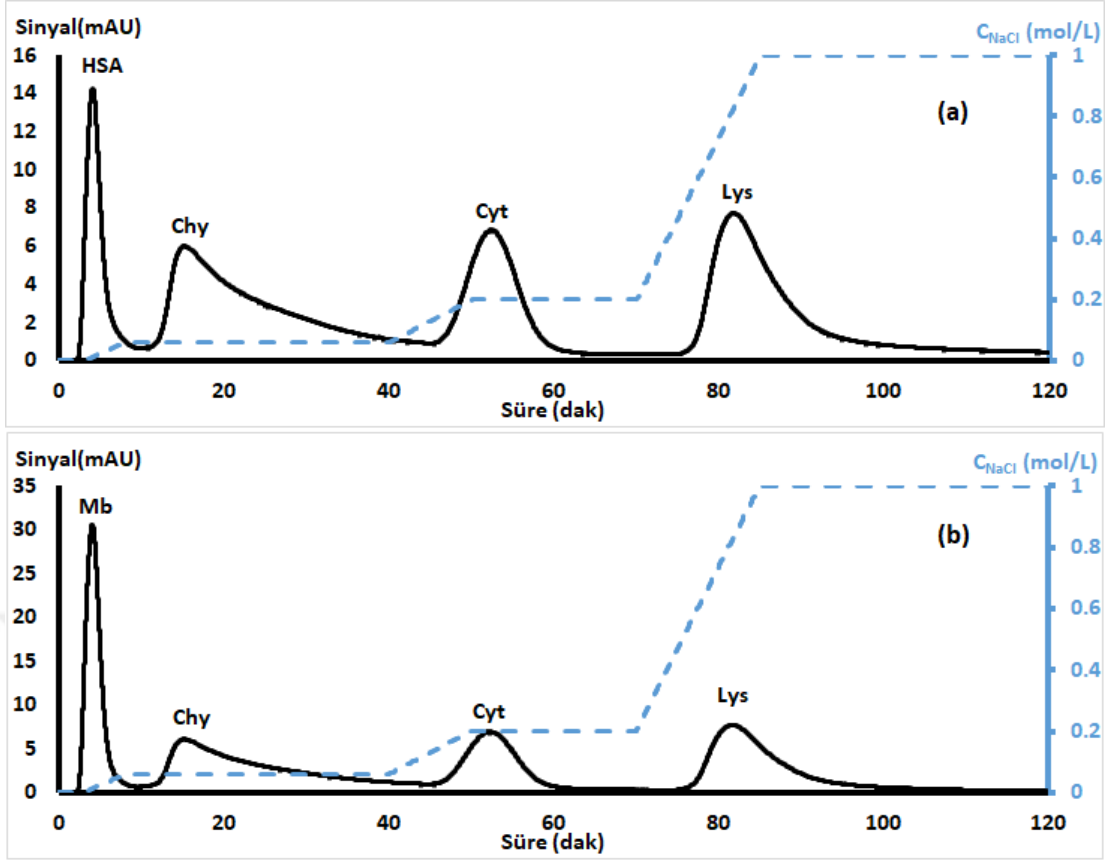
Şekil 4.24. P-CLX-SO₃ üzerinde çeşitli gradyentlerde kaydedilen kromatogramlar

Deneysel şartlar: Hareketli faz pH'sı=7,0; Akış hızı=0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon fırını=25 °C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Protein konsantrasyonu: HSA: 0,5 mg/mL; Mb: 1,0 mg/mL; Chy: 1,0 mg/mL; Lys: 1,0 mg/mL (fosfat tamponunda; pH 7,0).



Şekil 4.25. P-CLX-PO₄ üzerinde farklı gradyentlerde kaydedilen ve ayırmanın optimizasyonuna yönelik bazı kromatogramlar

Deneysel şartlar: Hareketli faz pH'sı=7,5; Akış hızı=0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon fırını=25 °C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Protein konsantrasyonu: Chy: 0,3 mg/mL; Cyt: 0,3 mg/mL; Lys: 0,3 mg/mL (fosfat tamponunda; pH 7,5).



Şekil 4.26. P-CLX-PO₄ ile farklı karışımlardan bazı model proteinlerin ayrılmasına ilişkin kromatogramlar

Deneysel şartlar: Hareketli faz pH'sı=7,5; Akış hızı=0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon fırını=25 °C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL; Protein konsantrasyonu: HSA: 0,3 mg/mL; Mb: 0,3 mg/mL; Chy: 0,3 mg/mL; Cyt: 0,3 mg/mL; Lys: 0,3 mg/mL (fosfat tamponunda; pH 7,5).

4.3.5 Alıkonma mekanizmasının irdelenmesi

Literatürde, kaliksaren-protein etkileşimlerinin çözelti ortamında kapsamlı bir şekilde çalışıldığı görülmektedir (McGovern vd., 2012, 2014; Memmi vd., 2001; Oshima vd., 2002). Diğer taraftan, kaliksaren esaslı sabit fazların protein kromatografisinde uygulanabilirlikleri ile ilgili literatürde önemli bir eksikliğin bulunduğu anlaşılmaktadır.

Molekül ağırlığı düşük türlerin kaliksarenler ile etkileşmelerinde bazen inclusion complexation adı verilen ve ilgili türün kaliksaren molekülünün boşluğuna bağlanmasını temel alan bir mekanizma esas alınmaktadır (Gezici and Bayrakci, 2015). Protein gibi molekül ağırlığı yüksek türlerin kaliksarenler ile etkileşmesini bu

mekanizma temelinde açıklamak tamamen doğru olmamakla beraber (Ludwig 2005), proteinlerin yan zincirlerinin kaliksaren boşluğu ile etkileştiğine dair literatürde bazı bulguların olduğunu belirtmek gerekir (McGovern vd., 2012). Nitekim çalıştığımız kaliksaren türevlerinden biri olan p-sulfonatokaliks[4]aren, CLX-SO₃, molekülünün çözelti ortamında Cyt'nin bir yan zinciri ile inklüzyon kompleksleşmesi üzerinden etkileştiğine dair bazı veriler literatürde mevcuttur (McGovern vd., 2012). Ayrıca, aynı çalışmada, adı geçen kaliksaren türevinin Cyt ile iki veya daha fazla bağlanma noktası üzerinden etkileştiği de tespit edilmiştir. Yani inklüzyon kompleksleşmesi ile bir lizin zincirinin etkileşmesinin yanı sıra başka lizin zincirlerinin de kaliksaren bağlanmasında rol alabildiği görülmüştür. Bu nedenle, kaliksaren-protein etkileşmelerinin basit bir mekanizmadan ziyade, daha karmaşık bir mekanizma üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu tarz etkileşmelerin P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazları üzerinde protein etkileşmelerinde de rol alabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte; deneysel verilerden, her üç sabit fazın Lys, Cyt ve Chy ile daha baskın olan iyon-değişim mekanizması üzerinden etkileştiği sonucuna varılmıştır.

pH denemelerinden elde edilen sonuçlar, pH=5,0–7,0 aralığında, hareketli fazın pH'sı arttıkça tüm proteinlerin her üç sabit faz üzerinde sergiledikleri kapasite faktörlerinin arttığı görülmüştür. Diğer taraftan, katyon değişim kromatografisi şartlarında, çalışılan proteinlerin pH düşüşü ile kapasite faktörlerinin artması beklenmekteydi (pH düşüşü ile çalışılan proteinlerin pozitif yük yoğunluklarının artması nedeniyle). Her üç sabit faz üzerinde proteinlerin sergilediği bu davranışın, sabit faza bağlanan proteinlerden kaynaklanan ve çözelti ortamında sabit faza bağlanmamış proteinlerin itilmesine yol açan bir tür perdeleme etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Nitekim literatürde, tetrazol gruplarıyla modifiye edilmiş silika esaslı sabit faz üzerinde de Cyt'nin pH etkisi ile benzer bir alıkonma davranışı sergilediği rapor edilmiştir (Lei vd., 2008). Esas itibarıyla, hareketli faz pH'sının hem protein hem de sabit fazların konformasyonu ve yük yoğunlukları üzerinde etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle pH'nın kromatografik şartlarda 4 ana etkiye neden olabileceği söylenebilir:

- Bağlanan proteinlerden kaynaklanan ve düşük pH değerlerinde daha belirgin hale gelen perdeleme etkisi,

- Yüksek pH değerlerinde proteinlerin sabit fazla hidrofobik etkileşme düzeyinin artması,
- pH'nın özellikle proteinlerin ve sabit fazın konformasyonunu değiştirmesi
- Sabit faz üzerindeki yük yoğunluğunun pH ile değişmesi

Sondan başlamak gerekirse; çalışılan sabit fazlardan özellikle P-CLX-SO₃'ün kuvvetli katyon değiştirici özelliği nedeniyle çalışılan pH değerlerinin tamamında yüzeydeki sülfonat grupları tamamen iyonlaşmış halde bulunacağından pH'nın bu sabit faz için yüzeydeki yük yoğunluğu üzerine herhangi bir etkisi söz konusu değildir. Benzer bir durum, çalışılan pH aralığında, P-CLX-PO₄ için de söz konusudur. Diğer taraftan, P-CLX-COOH sabit fazının zayıf katyon değiştirici özelliği nedeniyle düşük pH değerlerinde sabit fazın yüzeyindeki negatif yük yoğunluğunun azalması ve dolayısıyla pozitif yüklü model proteinlerle etkileşme düzeyinin azalması beklenir. Nitekim sonuçlar bunu doğrular niteliktedir. Ayrıca, her üç sabit faz üzerinde P-CLX-COOH'ın tüm proteinler için daha düşük bir kapasite sergilemiş olmasının altında bu etkinin de rolünün olduğu düşünülmektedir.

pH'nın etkisiyle proteinlerin konformasyonlarında, özellikle hidrojen bağının etkisiyle, farklılaşmalar meydana gelebilir ve bu da proteinlerin sabit faz ile etkileşme düzeyini değiştirebilir. Diğer taraftan, çalışılan şatlarda, iyonik şiddetin hidrofobik etkileşmeleri önceleyecek kadar yüksek düzeyde olmaması nedeniyle bu etkinin de önemli düzeyde olmadığı düşünülmüştür. Nitekim iyonik şiddetin yüksek düzeyde olduğu hidrofobik etkileşim kromatografisi şartlarında (2 M (NH₄)₂SO₄ kullanarak) P-CLX-SO₃ ile yürüttüğümüz bazı analizlerde proteinlerin çok düşük düzeylerde etkileştiği ve dolayısıyla hidrofobik etkileşim düzeyinin beklendiği kadar da yüksek olmadığı görülmüştür. Burada, kaliksarenlerdeki dört fenil grubunun neden olacağı hidrofobik etkileşmelerin kaliksarenlerdeki iyonik-iyonlaşabilen fonksiyonel gruplar tarafından modüle edilmiş olabileceği düşünülmüştür (Güven vd., 2018).

Yukarıdaki olası etkiler de göz önünde bulundurulduğunda, pH düşüşü ile çalışılan proteinlerin alıkonma faktörlerindeki düşüşün altındaki temel faktörün sabit faza bağlanan proteinlerin oluşturduğu bir tür perdeleme etkisinin olduğu sonucuna

varılmıştır. Bu etkiyi, protein konformasyonlarında pH değişimiyle meydana gelen değişimlerin de desteklediği düşünülmektedir. Yani, pozitif yüklü proteinin destek katısına immobilize olmuş negatif yüklü kaliksaren molekülü ile oluşturduğu güçlü elektrostatik etkileşimin diğer proteinlerin aynı kaliksaren bölgesi ile etkileşme düzeyini azalttığı düşünülmüştür. Ayrıca; çalışılan şartlarda katyonik formda bulunan model proteinlerin, pH düştükçe, destek katısına immobilize olmuş birden fazla kaliksaren ile de etkileşebileceği düşünülmektedir. Literatürde kaliksaren-protein etkileşimlerinin çok noktali etkileşmeler üzerinden gerçekleştiğine dair veriler bulunmakta ve bizim çıkarsamalarımızla paralellik arz etmektedir. Bu kapsamda yapılan bazı çalışmalarda (Ludwig 2005; Oshima vd., 2002), çözelti ortamında bir Cyt molekülünün 20 kadar karboksilatokaliks[6]aren molekülünü bağlayabildiği görülmüştür. Sonuç olarak; incelenen model proteinlerin P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazları ile başlıca iyon-değişim mekanizması üzerinden etkileştiği ve etkileşmelerde çok noktali bağlanmaların rol almış olabileceği düşünülmektedir.

4.3.6 Veriler için istatistiksel değerlendirmeler

Verilerin tekrarlanabilirliği, alıkonma süreleri (ve pik alanları) temelinde değerlendirilmiştir. Böylece, hem analitik verilerin güvenilirlikleri hem de hazırlanan yeni sabit fazların tekrar tekrar kullanılabilimleri incelenmiş oldu. Tekrarlanabilirlik, gün-içi ve günlerarası olmak üzere iki set halinde, alıkonma süresi en yüksek olan (ve dolayısıyla ikincil etkileşmelerin etkisinin ve deneysel hataların etkisinin daha belirgin olarak görülebileceği) Lys kullanılarak incelenmiştir. Hem izokratik hem de gradyent şartlarda, P-CLX-SO₃ üzerinde elde edilen verilerin istatistik değerlendirmesinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te sunulmuştur. İzokratik elüsyon şu deneysel şartlarda gerçekleştirilmiştir: Hareketli faz (50:50, v/v, Solvent-A: Fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0) + Solvent-B: 1,0 M NaCl çözeltisi (20 mM fosfat tamponunda, pH 7,0)); Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon: 5,0x120 mm. Gradyent elüsyon ise şu deneysel şartlarda yürütülmüştür: Hareketli faz (Solvent-A: Fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0) + Solvent-B: 1,0 M NaCl çözeltisi (20 mM fosfat tamponunda, pH 7,0)); Gradyent eğimi: 66,67 mM/dak; Sıcaklık: 25 °C; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon: 5,0x120 mm. Çalışılan diğer sabit fazlar için de standart sapma düzeylerinin P-CLX-SO₃ için elde edilenlere yakın olduğu yürütülen benzer analizlerden görülmüştür. Tablo 4.4'ten görüldüğü üzere, izokratik şartlarda

veriler çok iyi düzeyde bir tekrarlanabilirlikle elde edilebilmektedir. Ayrıca, gradyent şartlarda da verilerin makul düzeyde bir tekrarlanabilirlik sergilediği anlaşılmaktadır. Gradyent şartlarda tekrarlanabilirliğin bir miktar düştüğü görülmekte ve bu durum, gradyentin etkisiyle sabit fazda meydana gelebilecek olası değişimlerle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak; çalışılan sabit fazların tekrar tekrar kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.4. İzokratik ve gradyent elüsyon şartlarında kaydedilen veriler için bazı istatistiksel değerlendirmeler

	Gün-içi	Günler-arası
	Standart sapma (%)	Standart sapma (%)
İzokratik elüsyon şartlarında	0,4	0,9
Gradyent elüsyon şartlarında	3,2	4,1

4.3.7 Sabit fazlar için dinamik adsorpsiyon kapasitesinin belirlenmesi

Kromatografi, bazen lineer ve lineer olmayan kromatografi olarak sınıflandırılır. Lineer kromatografide, analit konsantrasyonu, sabit fazın doygunluk kapasitesinin oldukça altındadır ve bu nedenle, lineer kromatografik şartlarda alıkonma süresi analit konsantrasyonundan etkilenmez. Diğer taraftan, lineer olmayan kromatografide (eng. nonlinear chromatography), analit konsantrasyonu sabit fazın toplam kapasitesinden daha fazladır ve bu nedenle alıkonma süreleri artık konsantrasyondan bağımsız olamaz. Lineer kromatografi daha çok analitik amaçlarla kullanılırken, lineer olmayan kromatografi preparatif amaçlarla kullanılmaktadır. Her iki kromatografik şartta sabit fazın türlere karşı sergilediği davranışlar, ilgili sabit fazın karakteri hakkında önemli bilgiler sunar (Guiochon vd., 1994).

Lineer olmayan kromatografik şartlarda yürütülen analizler, sabit fazın adsorpsiyon kapasitesi ve adsorpsiyon davranışlarının aydınlatılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem “frontal analiz” olup, bazen “breakthrough tekniği” olarak da isimlendirilir (Gezici and Ayar, 2009). Bu yöntemde, analit çözeltisi

sabit fazın yer aldığı bir kolona sürekli bir şekilde beslenir. Kolonun çıkışında yer alan detektörden sürekli olarak kaydedilen sinyaller zamana karşı grafiğe dönüştürülür ve böylece “S” şeklinde eğriler elde edilir. Elde edilen bu eğriler üzerinde yürütülen uygun grafiksel ve matematiksel işlemlerle, çalışılan şartlarda sabit fazın sergilediği adsorpsiyon kapasitesi belirlenebilir. Farklı konsantrasyonlarda yürütülen analizlerden elde edilen verilerden de adsorpsiyon izotermi çizilebilir (Guiochon vd., 1994). Protein adsorpsiyon kapasitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Gezici vd., 2006a):

$$q = \frac{C_0 V}{V_m} \left(\frac{A_u}{A_u + A_d} \right) \quad (4.1)$$

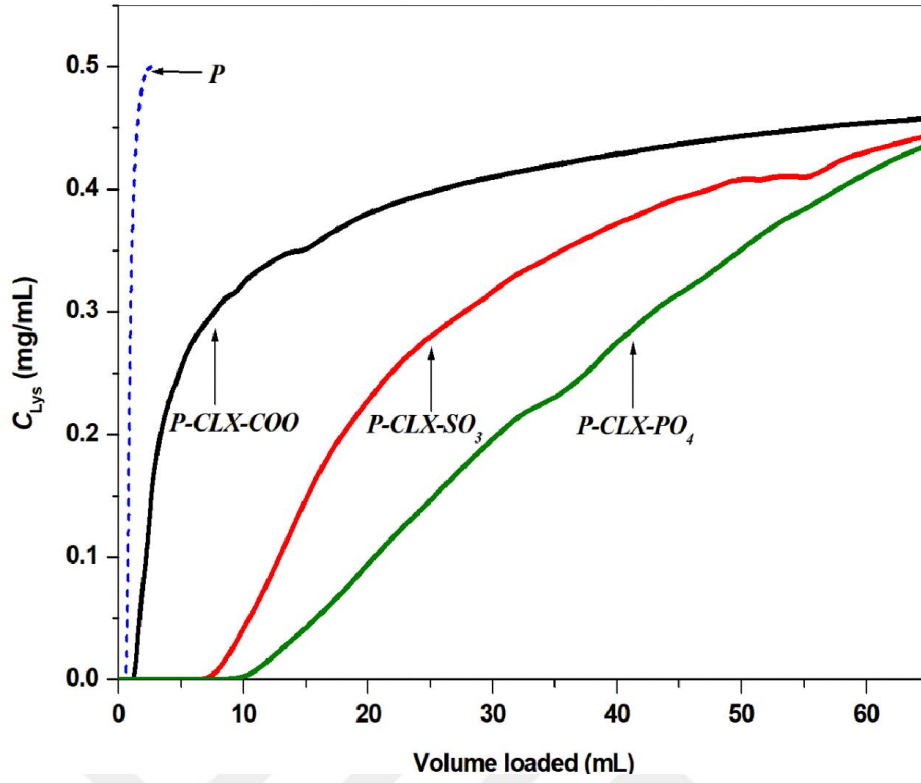
Burada; q : Monolit birim hacmi tarafından adsorplanan protein miktarı; C_0 : Protein çözeltisinin konsantrasyonu; V : Kolona beslenen toplam protein çözeltisinin hacmi; V_m : Monolitik kriyojel hacmi; A_u : Breakthrough eğrisinin üstünde kalan alan; A_d : Breakthrough eğrisinin altında kalan alan.

P, P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ sabit fazları üzerinde kaydedilen ve ölü hacim düzeltmesi yapılmış breakthrough eğrileri Şekil 4.27’te verilmiştir. Eğrilerden açıkça görüldüğü üzere, kaliksaren immobilizasyonundan sonra destek katısı P’nin (özellikle) toplam dinamik adsorpsiyon kapasitesinde belirgin artış meydana gelmiştir. Kuvvetli kation değiştirici özelliğe sahip P-CLX-SO₃’ün sergilediği breakthrough ve toplam kapasitelerin P-CLX-COOH’a göre daha fazla olduğu eğrilerden açıkça görülebilmektedir. P-CLX-COOH’ın breakthrough kapasitesi destek katısı P’nin sergilediği breakthrough kapasitesine yakın olmakla beraber; aynı sabit fazın sergilediği toplam kapasitenin destek katısı P’ye kıyasla çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler, monolitlerin yüzeyine immobilize edilen kaliksaren molekülünün yapısal özelliklerinin protein adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Breakthrough eğrilerinden hesaplanan adsorpsiyon kapasiteleri Tablo 4.5’te verilmiştir. Tablodan görüldüğü üzere, P-CLX-SO₃ sabit fazının adsorpsiyon kapasitesi (5,9 mg/mL) P-CLX-COOH üzerinde elde edilenden (2,9 mg/mL) yaklaşık 2 kat daha fazladır. Ayrıca; P-CLX-SO₃ sabit fazının P destek katısına göre sergilediği breakthrough ve toplam dinamik adsorpsiyon kapasitelerinin sırasıyla 10 ve 25 kat daha

fazla olduğu ortaya konulmuştur. Buradan da farklı fonksiyonel gruplara sahip kaliksaren moleküllerinin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi anlaşılabilmektedir. Lineer olmayan kromatografik şartlarda elde edilen bu sonuçlar, lineer kromatografi şartlarında elde edilenlerle uyum arz etmektedir (Bkz. Proteinler için kapasite faktörleri ile ilgili bölümler).

P-CLX-PO₄ sabit fazının sergilediği breakthrough ve toplam kapasitelerin (Şekil 4.27) çalışılan diğer iki sabit faza göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (breakthrough kapasitesi=2,3 mg/mL ve toplam kapasite=7,7 mg/mL). Hatta P-CLX-PO₄'ün sergilediği breakthrough kapasitesinin, P-CLX-COOH'ın toplam kapasitesine yakın olması, fosfonat gruplarına sahip kaliksaren türevinin verimliliğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. P-CLX-PO₄'ün sergilediği yüksek kapasite, fosfonat grubunun iki pKa değerine sahip olmasıyla ilişkilendirilmiş ve ortamın pH ve iyonik şiddetine göre sabit fazın yük yoğunluğunun görece artmış olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Nitekim yukarıda da açıklandığı üzere, lineer şartlarda, model proteinlerden Chy ve Cyt, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-COH sabit fazları üzerinde ayrılmamış olmasına rağmen, P-CLX-PO₄ sabit fazı üzerinde başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Yani, lineer ve lineer olmayan şartlarda elde edilen veriler birbiriyle uyum arz etmiştir.

Kriyojellerin yüksek gözenekli yapısı da dikkate alınarak, dinamik adsorpsiyon kapasitesi verileri mg/g cinsinden hesaplandığında, çalışılan yeni sabit fazların literatürdeki bazı sabit fazlara göre çok yüksek kapasite sergilediği görülebilir (Tablo 4.5). Bu nedenle, kaliksaren bağlanmış kriyojel esaslı bu sabit fazların özellikle preparatif kromatografide çok kullanışlı oldukları görülmüştür.



Şekil 4.27. Destek katısı (P), P-CLX-COOH, P-CLX-SO₃ ve P-CLX-PO₄ üzerinde Lys için kaydedilen breakthrough yükleme eğrileri

Deneysel şartlar: Besleme çözeltisi: 0,5 mg/mL Lys; pH=7; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon: UV 280 nm; Kolon: 5,0×120 mm; Desorpsiyon: 1,0 M NaCl (pH 7,0; 20 mM fosfat tamponunda); Kolon şartlandırma: 20 mM fosfat tamponu; pH 7,0.

Tablo 4.5. Çeşitli monolitik kriyojeller kullanılarak Lys için elde edilen adsorpsiyon kapasiteleri (gözlenen kapasiteler)

#	Adsorban	Kapasite (mg/mL)	Kapasite (mg/g)	Yükleme şartları ^a	Referans
1	P-CLX-PO ₄	7,7	340	0,5 mg/mL; pH=7,0	Sunulan çalışma; (Güven vd., 2018)
2	P-CLX-SO ₃	5,9	260	0,5 mg/mL; pH=7,0	Sunulan çalışma; (Güven vd., 2018)
3	P-CLX-COOH	2,9	130	0,5 mg/mL; pH=7,0	Sunulan çalışma; (Güven vd., 2018)
4	3-Merkaptopropan sülfonik asit immobilize edilmiş poli(metakrilat)	8	–	0,5 mg/mL; pH=6,4	(Perçin vd., 2015)
5	Poly(acrilamide) afinite kriyojel	–	149,9	1 mg/mL; pH = 7,2	(Verissimo vd., 2017)
6	Poli-(L)-histidin-bağlı poli(glsidilmetakrilat) kriyojel–Cu(II) şelatlı	–	36,4	1 mg/mL; pH = 7,0	(Çimen vd., 2016)
7	Kompozit kriyojel	–	27,6	1 mg/mL; pH = 6,0	(Baydemir vd., 2015)
8	Poli-(L)-histidin-bağlı poli(glsidilmetakrilat) kriyojel–Zn(II) şelatlı	–	26,8	1 mg/mL; pH = 7,0	(Çimen vd., 2016)
9	Poli-(L)-histidin-bağlı poli(glsidilmetakrilat) kriyojel–Ni(II) şelatlı	–	17,3	1 mg/mL; pH = 7,0	(Çimen vd., 2016)
10	Yüzeyi imprint edilmiş kriyojel	–	10,73	0,1 mg/mL; pH = 6,5	(Erol vd., 2016)
11	1-Propane sülfonik asit graft edilmiş poli(akrilamit)	2,5	–	1 mg/mL; pH 7,2	(Chen vd., 2008)
12	1-Propane sülfonik asit graft edilmiş poli(akrilamit)	0,76	–	1 mg/mL; pH 7,2	(Plieva vd., 2004)
13	Hüyük asit immobilize edilmiş poli(metakrilat)	0,5	–	0,5 mg/mL; pH 7,0	(Özkan 2016)

^a Yükleme aşamasında kullanılan Lys çözeltisinin konsantrasyonu ve pH değeri

BÖLÜM V

SONUÇLAR

Kaliksaren-kriyojel kimyasının protein-kromatografisi çerçevesinde ilk defa buluşturulduğu bu çalışmada; karboksilat, sülfonat ve fosfonat grupları içeren 3 farklı kaliksaren türevi poli(2-hidroksietil metakrilat-co-glisidil metakrilat), P, esaslı monolitik kriyojelle kimyasal yoldan immobilize edilmiş ve elde edilen 3 farklı yeni sabit fazın model proteinlere karşı sergilediği sabit faz özellikleri kapsamlı bir incelemeye tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçları şu şekilde özetlemek mümkündür:

- ❖ Farklı kation değiştirici gruplar içeren kaliksaren türevleri epoksit grupları içeren kriyojel destek katısına, morfolojisini bozmaksızın, başarılı bir şekilde kimyasal yoldan *in-situ* immobilize edilmiştir.
- ❖ Hazırlanan sabit fazlar elemental analiz, FTIR spektroskopisi, titrimetrik analiz, izoelektrik nokta analizi, SEM ve civa porozimetrisi gibi yöntem ve tekniklerle karakterize edilmiş ve immobilizasyon işleminin başarısı doğrulanmıştır.
- ❖ Hazırlanan sabit fazların su geçirgenliği özellikleri ve akış hızı-teorik tabaka sayısı özelliklerinin literatürdeki verilerle uyumlu olduğu görülmüş; monolitik kolonun düşük geri basınç sergilediği tespit edilmiştir.
- ❖ Bazı model proteinler (Chy, Cyt ve Lys) kullanılarak pH (5,0; 6,0 ve 7,0 değerlerinde) ve gradyent eğiminin (*hareketli fazdaki tuz, NaCl, konsantrasyonunun birim zamandaki değişimi; 33,3–200 mM/dak aralığında*) alıkonma özellikleri üzerine etkisi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Çalışılan her üç pH değerinde gradyent eğimi arttıkça her bir model protein için kapasite faktörlerinde düşüş gözlenmiş ve bu durum tipik bir iyon-değişim mekanizması ile ilişkilendirilmiştir. Her üç model proteinin kapasite faktörlerinin pH düştükçe azalma yönünde bir eğilim sergilemiş olması, düşük pH değerlerinde sabit faza bağlanan proteinlerden kaynaklanan bir tür maskeleyme etkisine atfedilmiştir. Tüm durumlarda, her bir protein için, en yüksek kapasite faktörleri pH 7,0'da elde edilmiştir. Çalışılan model proteinlerin sergilediği kapasite faktörleri ile proteinlerin izoelektrik noktaları, *iep*,

arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiş ve kapasite faktörlerinin genel anlamda Chy (*iep~9*), Cyt (*iep~10*) ve Lys (*iep~11*) sırasında arttığı görülmüştür. Daha düşük izoelektrik noktaya sahip serum albümin (HSA; *iep~5*) ve miyoglobinin (Mb; *iep~7*) ise genel olarak her üç sabit fazla çok düşük düzeylerde etkileşebildikleri ve düşük tuz konsantrasyonlarında dahi kolayca elue olabildikleri görülmüştür. Diğer taraftan Chy, Cyt ve Lys'nin hareketli fazda NaCl olmaksızın kolonlardan elue olmadıkları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, proteinlerin yeni tip sabit fazlarla etkileşiminde iyon-değişim mekanizmasının rol aldığını göstermiştir.

- ❖ Model proteinlerin karışımlarından ayrılması kapsamında yürütülen analizlerde en iyi verim P-CLX-PO₄ ile elde edilmiş ve model proteinler (Chy, Cyt, Lys) pH=7,5'te başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. P-CLX-SO₃ ve P-CLX-COOH sabit fazları üzerinde Chy ve Cyt'nin birbirinden ayrılması mümkün olmamıştır.
- ❖ Lineer kromatografik şartlarda yürütülen analizlerden sonra her bir sabit fazın Lys'ye karşı sergilediği dinamik adsorpsiyon kapasiteleri de lineer olmayan kromatografik şartlarda (aşırı yükleme şartlarında) incelenmiştir. Sonuçlar lineer şartlarda elde edilen verilerle uyumlu olup, Lys için kaydedilen dinamik adsorpsiyon kapasitelerinin P-CLX-PO₄ (7,7 mg/mL; 340 mg/g), P-CLX-SO₃ (5,9 mg/mL; 260 mg/g) ve P-CLX-COOH (2,9 mg/mL; 130 mg/g) sırasında azaldığı görülmüştür. Destek katısının, P, kaliksaren immobilize edilmeksizin kayda değer bir adsorpsiyon kapasitesi sergilemediği tespit edilmiştir. Böylece; kaliksaren immobilizasyonun protein adsorpsiyon kapasitesi ve protein alıkonma davranışları üzerine etkisi de gözler önüne serilmiştir. Kaydedilen adsorpsiyon kapasitelerinin literatürdeki verilere kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmüş ve bu nedenle, çalışılan sabit fazların özellikle preparatif protein kromatografisi için faydalı yaklaşımlar sunabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; farklı fonksiyonel gruplar içeren kaliksarenlerin kriyojel destek katısına immobilizasyonu ile elde edilen monolitik sabit fazların protein ayırma-saflaştırma işlemleri için alternatif materyaller olarak kullanılabilmesi görülmüştür. Hazırlanan sabit fazların, proteinler gibi karmaşık yapılarla izah edilebilir bir mekanizma üzerinden etkileşmiş olması, bu sabit fazların endüstriyel ölçekteki olası uygulamalarında ayırma-

saflaştırma şartlarının kolayca öngörülebilmesi ve uygun stratejilerin belirlenmesi noktasında da önem arz etmektedir. Bu çalışmada incelenen kaliks[4]aren yapılarına ilaveten iyon değiştirici fonksiyonel gruplar taşıyan kaliks[6]aren ve kaliks[8]aren yapılarının da kriyojel destek katısına immobilizasyonu ve hazırlanan sabit fazların protein kromatografisinde kullanılabilirlikleri de ilginç ve bir o kadar da incelenmeye değer bir konu olarak durmaktadır. Çok farklı özelliklere sahip kaliksaren türevlerinin sentezlenebilmesi nedeniyle, kaliksaren-kriyojel esaslı materyallerin ayırma saflaştırma işlemlerinde geniş bir yelpazede uygulama alanı bulabilecekleri ve bu anlamda yüksek bir uygulanabilirlik potansiyelinin olduğu düşünölmektedir. Kaliksarenlerin kriyojellere immobilizasyonunda bu çalışmada kullandığımız *in-situ* metot yerine, kaliksarenlerle modifiye edilmiş monomerlerin doğrudan kriyojelleştirilmesine dayanan alternatif metotların uygulanabilirliklerinin de mutlaka incelenmesi gerektiğine inanıyoruz. Son olarak; kaliksaren-kriyojel kimyasında önemli bir boşluğu dolduracağı düşünölen bu çalışmanın, supramoleküler kimyanın diğer üyelerinin (ör. Siklodekstrinler, rezorsinarenler) kriyojel kimyası ile buluşturulup yeni tip ayırma-saflaştırma materyallerinin hazırlanması noktasında da bir sıçrama tahtası görevi üstlenebileceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

Akoz, E., Erdemir, S., and Yilmaz, M., “Immobilization of novel the semicarbazone derivatives of calix[4]arene onto magnetite nanoparticles for removal of Cr(VI) ion”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 73 (1–4), 449–458, 2012.

Arduini, A., Manfredi, G., Pochini, A., Sicuri, A. R. and Ungaro, R., “Selective Formylation of Calix[4]arenes at the at the ‘Upper Rim’ and Synthesis of New Cavitanads”, *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 936–937, 1991.

Arena, G., Contino, A., Longo, E., Sciotto, D., Spoto, G. and Torrisi, A., “Two Calix-Crown Based Stationary Phases. Synthesis, Chromatographic Performance and X-ray Photoelectron Spectroscopy Investigation”, *Journal of Supramolecular Chemistry*, 2 (6), 521–531, 2002.

Asliyuçe, S., Mattiasson, B. and Mamo, G., “Synthesis and use of protein G imprinted cryogel as affinity matrix to purify protein G from cell lyaste”, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1021 , 204–212, 2016.

Baydemir, G., Türkoğlu, E. A., Andaç, M., Perçin, I. and Denizli, A., “Composite cryogels for lysozyme purification”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62 (2), 200–207, 2015.

Bayrakci, M., Ertul, S., Sahin, O. and Yilmaz, M., “Synthesis of two new p-tert-butylcalix[4]arene β -ketoimin derivatives for extraction of dichromate anion”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63 (3–4), 241–247, 2009.

Bayrakci, M., Ertul, Ş. and Yilmaz, M., “Synthesis of new water-soluble phosphonate calixazacrowns and their use as drug solubilizing agents”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 74 (1–4), 293–303, 2012.

Bayrakçı, M., Ertul, Ş. and Yilmaz, M., “Synthesis of di-substituted calix[4]arene-based receptors for extraction of chromate and arsenate anions”, *Tetrahedron*, 65 (38), 7963–7968, 2009.

Bayrakçı, M., Ertul, Ş. and Yilmaz, M., “Transportation of Poorly Soluble Drug Molecules from the Organic Phase to the Aqueous Phase by Using Phosphorylated Calixarenes”, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56 (12), 4473–4479, 2011.

Bhatti, A. A., Qureshi, I., Memon, N. and Memon, S., “Evaluation of perchlorate sorption behavior of calix[4]arene appended resin”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 76 (1–2), 55–60, 2013.

Brindle, R., Albert, K., Harris, S. J., Tröltzsch, C., Horne, E. and Glennon, J. D., “Silica-bonded calixarenes in chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 731 (1–2), 41–46, 1996.

Carvalho, B. M. A., Carvalho, L. M., Silva, W. F., Minime, L. A., Soares, A. M., Carvalhoe, G. G. P. and Da Silva, S. L., “Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions”, *Food Chemistry*, 154, 308–314, 2014.

Chamseddin, C. and Jira, T., “Evaluation of the chromatographic performance of conventional, polar-endcapped and calixarene-bonded stationary phases for the separation of water-soluble vitamins”, *Chromatographia*, 76 (9–10), 449–457, 2013.

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 (1), 71–77, 2008.

Çimen, D., Türkmen, D. and Denizli, A., “Poly-(L)-histidine immobilized cryogels for lysozyme purification”, *Adsorption Science and Technology*, 34 (7–8), 469–487, 2016.

de Gaetano, Y., Clarot, I. and Regnouf-de-Vains, J.-B., “Cu(I) and Zn(II) chelations on polymer beads modified by attachment of a bipyridyl-calixarene-based chelate”, *Tetrahedron Letters*, 50 (42), 5793–5797, 2009.

Deng, Z., Liu, J., Hu, C., Yang, L., Du, H., Hu, H., Huang, Y., Yang, X., Jiang, Q. and Zhang, S., “Liquid chromatographic behavior of two alanine-substituted calix[4]arene-bonded silica gel stationary phases”, *Journal of Separation Science*, 37 (22), 3268–3275, 2014.

Erol, K., Köse, K., Uzun, L., Say, R. and Denizli, A., “Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 567–576, 2016.

Friebe, S., Gebauer, S., Krauss, G. J., Goermar, G. and Krueger, J., “HPLC on Calixarene Bonded Silica Gels. I. Characterization and Applications of the p-tert-Butyl-Calix[4]arene Bonded Material”, *Journal of Chromatographic Science*, 33 (6), 281–284, 1995.

Gebauer, S., Friebe, S., Gubitz, G. and Krauss, G.-J., “High Performance Liquid Chromatography on Calixarene-Bonded Silica Gels. II. Separations of Regio- and Stereoisomers on p-tert-Butylcalix[n]arene Phases”, *Journal of Chromatographic Science*, 36 (8), 383–387, 1998.

Gezici, O. and Ayar, A., “Stepwise frontal analysis to derive equilibrium sorption data for copper and aniline on functionalized sporopollenin”, *Clean - Soil, Air, Water*, 37 (4–5), 349–354, 2009.

Gezici, O. and Bayrakci, M., “Calixarene-engineered surfaces and separation science”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 83 (1–2), 1–18, 2015.

Gezici, O., Küçükosmanoğlu, M. and Ayar, A., (a) “The adsorption behavior of crystal violet in functionalized sporopollenin-mediated column arrangements”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 304 (2), 307–316, 2006.

Gezici, O., Tabakci, M., Kara, H. and Yilmaz, M., (b)“Synthesis of p-tert-butylcalix[4]arene dinitrile bonded aminopropyl silica and investigating its usability as a stationary phase in HPLC”, *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry*, 43 (2), 221–231, 2006.

Glennon, J. D., Horne, E., Hall, K., Cocker, D., Kuhn, A., Harris, S.J. and McKervey, M. A., “Silica-bonded calixarenes in chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 731 (1–2), 47–55, 1996.

Glennon, J. D., O’Connor, K., Srijaranai, S., Manley, K., Harris, S. J. and McKervey, M. A., “Enhanced chromatographic selectivity for sodium(1+) ions on a calixarene-bonded silica phase”, *Analytical Letters*, 26 (1), 153–62, 1993.

Guiochon, G., Shirazi, S. G. and Katti, A. M., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Boston, MA: Academic Press.

Gutsche, C. D., *Calixarenes Revisited: Monographs in Supramolecular Chemistry* *Monographs in Supramolecular Chemistry*, Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H. and Muthukrishnan, R., “Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol”, *Journal of the American Chemical Society*, 103 (13), 3782–3792, 1981.

Gutsche, C. D. and Nam, K. C., “Calixarenes. 22. Synthesis, properties, and metal complexation of aminocalixarenes”, *Journal of the American Chemical Society*, 110 (18), 6153–6162, 1988.

Guven, I., Gezici, O., Bayrakci, M. and Morbidelli, M., “Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1558, 59–68, 2018.

Hu, K., Zhao, W., Wen, F., Liu, J., Zhao, X., Xu, Z., Niu, B., Ye, B., Wu, Y. and Zhang, S., “Investigation on the preparation and chromatographic behavior of a new para-tert-butylcalix[4]arene-1,2-crown-4 stationary phase for high performance liquid chromatography”, *Talanta*, 85 (1), 317–324, 2011.

Huai, Q. Y., Zhao, B. and Zuo, Y. M. ., “Preparation and evaluation of an end-capped p-tert-butyl-calix[4]arene- bonded-silica stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography”, *Chromatographia*, 59 (9–10), 637–645, 2004.

Jain, V. K., Pandya, R. A., Pillai, S. G., Agrawal, Y. K. and Shrivastav, P. S., “Application of a Chelate Forming Calix[4]arene-o-vanillinthiosemicarbazone Resin to the Separation, Preconcentration and Trace Determination of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) in Natural Water Samples”, *Microchimica Acta*, 147 (4), 253–264, 2004.

Konak, Ü. İ., Turhan, İ. and Certel, M., “Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması”, *Academic Food Journal*, 12 (2), 79–87, 2014.

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”, *Journal of Chromatography A*, 1103 (1), 35–42, 2006.

Lakouraj, M. M., Hasanzadeh, F. and Zare, E. N., “Nanogel and super-paramagnetic nanocomposite of thiacalix[4]arene functionalized chitosan: synthesis, characterization and heavy metal sorption”, *Iranian Polymer Journal*, 23 (12), 933–945, 2014.

Lee, Y. K. K., Ryu, Y. K. K., Ryu, J. W. W., Kim, B. E. E. and Park, J. H. H., “Reversed-phase liquid chromatography of some positional isomers on calix[6]arene-p-sulfonate-bonded silica”, *Chromatographia*, 46 (9–10), 507–510, 1997.

Lei, G., Xiong, X., Wei, Y., Zheng, X. and Zheng, J., “Novel tetrazole-functionalized ion exchanger for weak cation-exchange chromatography of proteins”, *Journal of Chromatography A*, 1187 (1–2), 197–204, 2008.

Li, L. S., Da, S. L., Feng, Y. Q. and Liu, M., (a)“Preparation and characterization of a p-tert-butyl-calix[6]-1,4-benzocrown-4-bonded silica gel stationary phase for liquid chromatography.”, *Journal of Chromatography. A*, 1040 (1), 53–61, 2004.

Li, L. S., Liu, M., Da, S. L. and Feng, Y.-Q., (b)“High performance liquid chromatography of aromatic carboxylic acids on p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase”, *Talanta*, 62 (3), 643–648, 2004.

Li, L. S., Liu, M., Da, S. L. and Feng, Y.-Q., (c)“Studies on the chromatographic behavior of nucleosides and bases on p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase by HPLC”, *Talanta*, 63 (2), 433–441, 2004.

Li, L. S. S., Da, S. L. L., Feng, Y. Q. Q. and Liu, M., (d)“Study on the chromatographic behavior of water-soluble vitamins on p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase by HPLC”, *Talanta*, 64 (2), 373–379, 2004.

Liu, M., Li, L. S., Da, S. L. and Feng, Y. Q., “High performance liquid chromatography with cyclodextrin and calixarene macrocycle bonded silica stationary phases for separation of steroids”, *Talanta*, 66 (2 SPEC. ISS.), 479–486, 2005.

Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y. and Mattiasson, B., “The potential of polymeric cryogels in bioseparation”, *Bioseparation*, pp. 163–188.

Ludwig, R., “Calixarenes in analytical and separation chemistry.”, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367 (2), 103–128, 2000.

Ludwig, R., “Calixarenes for biochemical recognition and separation”, *Microchimica Acta*, pp. 1–19.

McGovern, R. E., Fernandes, H., Khan, A. R., Power, N. P. and Crowley, P. B., “Protein camouflage in cytochrome c–calixarene complexes”, *Nature Chemistry*, 4 (7), 527–533, 2012.

McGovern, R. E., McCarthy, A. A. and Crowley, P. B., “Protein assembly mediated by sulfonatocalix[4]arene.”, *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 50 (72), 10412–5, 2014.

Memmi, L., Lazar, A., Brioude, A., Ball, V. and Coleman, A. W., “Protein-calixarene interactions: complexation of Bovine Serum Albumin by sulfonatocalix[n]arenes.”, *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2 (23), 2474–2475, 2001.

Mňuk, P. and Feltl, L., “Gas chromatographic study of the inclusion properties of calixarenes I. p-tert.-Butylcalix[4]arene in a micropacked column”, *Journal of Chromatography A*, 696 (1), 101–112, 1995.

Mňuk, P., Feltl, L. and Schurig, V., “Gas chromatographic study of the inclusion properties of calixarenes II. Selective properties of cyclic tetra- to octamers derived from phenol, and some problems associated with the use of calixarenes in capillary gas chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1996. doi:10.1016/0021-9673(95)01142-0

Oshima, T., Goto, M. and Furusaki, S., “Complex formation of cytochrome c with a calixarene carboxylic acid derivative: A novel solubilization method for biomolecules in organic media”, *Biomacromolecules*, 3 (3), 438–444, 2002.

Özkan, A. E., Hüyük Madde Esaslı Monolitik Kriyojellerin Hazırlanması ve Ayırma İşlemlerinde Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ömer Halisdemir Üniversitesi*, Niğde/Türkiye, 2016.

Özkan, A. E., Guven, I. and Gezici, O., “Protein ion-exchange chromatography on a biomacromolecule-immobilized monolithic cryogel”, *Turkish Journal of Chemistry*, 42 (2), 355–370, 2018.

Pasquale, S., Sattin, S., Escudero-Adán, E. C., Martínez-Belmonte, M. and de Mendoza, J., “Giant regular polyhedra from calixarene carboxylates and uranyl”, *Nature Communications*, 3 , 785, 2012.

Perçin, I., Khalaf, R., Brand, B., Morbidelli, M. and Gezici, O., “Strong cation-exchange chromatography of proteins on a sulfoalkylated monolithic cryogel”, *Journal of Chromatography 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”, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 807 (1), 129–137, 2004.

Qureshi, I., Memon, S. and Yilmaz, M., “Novel Calix[4]arene-based Amberlite XAD-4 Modified Resin for As(III) Removal from Water”, *CLEAN - Soil, Air, Water*, 41 (3), 258–266, 2013.

Sayin, S., Ozcan, F., Memon, S. and Yilmaz, M., “Synthesis and oxoanions (dichromate/arsenate) sorption study of N-methylglucamine derivative of calix[4]arene immobilized onto poly[(phenyl glycidyl ether)-co-formaldehyde]”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67 (3–4), 385–391, 2010.

Sayin, S. and Yilmaz, M., “Synthesis of a new calixarene derivative and its immobilization onto magnetic nanoparticle surfaces for excellent extractants toward Cr(VI), As(V), and U(VI)”, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56 (5), 2020–2029, 2011.

Shinkai, S., “Calixarenes - the third generation of supramolecules”, *Tetrahedron*, 49 (40), 8933–8968, 1993.

Singh, N. K., Dsouza, R. N., Grasselli, M. and Fernández-Lahore, M., “High capacity cryogel-type adsorbents for protein purification”, *Journal of Chromatography A*, 1355, 143–148, 2014.

Sliwka-Kaszynska, M., “Calixarenes as Stationary Phases in High Performance Liquid Chromatography,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 37 (3), 211–224, 2007.

Śliwka-Kaszyńska, M., Gorczyca, G. and Ślebioda, M., “Characterization of 1,3-alternate calix[4]arene-silica bonded stationary phases and their comparison to selected commercial columns by using principal component analysis”, *Journal of Chromatography A*, 1217 (3), 329–336, 2010.

Sokoließ, T., Menyes, U., Roth, U. and Jira, T., “New calixarene-bonded stationary phases in high-performance liquid chromatography: Comparative studies on the retention behavior and on influences of the eluent”, *Journal of Chromatography A*, 898 (1), 35–52, 2000.

Sokoließ, T., Schönherr, J., Menyes, U., Roth, U. and Jira, T., “Characterization of calixarene- and resorcinarene-bonded stationary phases”, *Journal of Chromatography A*, 1021 (1–2), 71–82, 2003.

Tabakci, M., “Immobilization of calix[6]arene bearing carboxylic acid and amide groups on aminopropyl silica gel and its sorption properties for Cr(VI)”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 61 (1–2), 53–60, 2008.

Thompson, A. B., Cope, S. J., Swift, T. D. and Notestein, J. M., “Adsorption of n - Butanol from Dilute Aqueous Solution with Grafted Calixarenes”, *Langmuir*, 27 (19), 11990–11998, 2011.

Uygun, M., Akduman, B., Akgöl, S. and Denizli, A., “A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (8), 1815–1826, 2013.

van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. and Klinkenberg, A., “Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography”, *Chemical Engineering Science*, 50 (24), 3869–3882, 1995.

Veríssimo, L. A. A., Paganoto, F. S., Mol, P. C. G., Ilhéu Fontan, R. d. C., Minim, V. P. R. and Minim, L. A., “Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification”, *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 52 (12), 1973–1982, 2017.

Wang, C., Bai, S., Tao, S. P. and Sun, Y., “Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins”, *Journal of Chromatography A*, 1333 , 54–59, 2014.

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

Xiao, X.-Z., Feng, Y.-Q., Da, S.-L. and Zhang, Y., “Preparation and evaluation of p-tert-butyl-calix[4]arene-bonded silica stationary phases for high performance liquid chromatography”, *Chromatographia*, 49 (11–12), 643–648, 1999.

Xiao, Y. X., Xiao, X. Z., Feng, Y. Q., Wang, Z. H. and Da, S. L., “High-performance liquid chromatography of sulfonamides and quinolones on p-tert-butyl-calix[6]arene-bonded silica gel stationary phase”, *Talanta*, 56 (6), 1141–1151, 2002.

Xu, W., Li, J. S., Feng, Y.-Q. Q., Da, S.-L. L., Chen, Y.-Y. Y. and Xiao, X.-Z. Z., “Preparation and characterization of p-tert-butyl-calix[6]arene-bonded silica gel stationary phase for high-performance liquid chromatography”, *Chromatographia*, 48 (3–4), 245–250, 1998.

Yao, K., Yun, J., Shen, S. and Chen, F., “In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns”, *Journal of Chromatography A*, 1157 (1–2), 246–251, 2007.

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”, *Journal of Chromatography A*, 1109 (1), 103–110, 2006.

Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H. and Denizli, A., “Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography”, *Biochemical Engineering Journal*, 43 (3), 272–279, 2009.

Yun, J., Tu, C., Lin, D. Q., Yao, S. J., “Microchannel liquid-flow focusing and cryopolymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation”, *Journal of Chromatography A*, 1247 , 81–88, 2012.

Zinke, A. and Ziegler, E., “Zur Kenntnis des Härtungsprozesses von Phenol-Formaldehyd-Harzen, X. Mitteilung”, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 77 (3–4), 264–272, 1944.



ÖZ GEÇMİŞ

İdris GÜVEN, 30.05.1989 tarihinde Bursa'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Kırklareli'nde tamamladı. 2008 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Kimya Bölümü'nden 2013'te mezun oldu. 2014 yılında Çanakkale Biga Balıklıçeşme köyünde jandarma olarak askerlik hizmetini tamamladı. 2015 yılında Niğde Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2015-2017 yılları arasında 115Z236 numaralı TÜBİTAK projesinde proje asistanı olarak görev aldı. 2017 yılında Niğde Organize Sanayi Bölgesi'nde, Güner Tarım A.Ş. de kimyager olarak çalışmaktadır.

Uluslararası Makaleleri:

- ❖ Guven, I., Gezici, O., Bayrakci, M., Morbidelli, M., Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1558 (2018) 59-68. DOI:10.1016/j.chroma.2018.05.026
- ❖ Özkan, A. E., Güven, İ., Gezici, O., Protein ion-exchange chromatography on a biomacromolecule-immobilized monolithic cryogel, *Turkish Journal of Chemistry*, 42 (2) (2018) 355-370. DOI:10.3906/kim-1612-65
- ❖ Şenlik, K., Gezici, O., Guven, I., Pekacar, A. I., Adsorption of nitroaniline positional isomers on humic acid-incorporated monolithic cryogel discs: Application of ligand-exchange concept, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5 (3) (2017) 2836-2844. DOI:10.1016/j.jece.2017.05.041
- ❖ Gezici, O., Guven, I., Özcan, F., Ertul, S., Bayrakci, M., Humic-makeup approach for simultaneous functionalization of polyacrylonitrile nanofibers during electrospinning process, and dye adsorption study, *Soft Materials*, 14 (4) (2016) 278-287. DOI:10.1080/1539445X.2016.1201506

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından 1 (bir) adet uluslararası SCI makale üretilmiştir. Bu üretilen eser aşağıda sunulmuştur.

- Guven, I., Gezici, O., Bayrakci, M., and Morbidelli, M., “Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1558, 59-68, 2018. DOI:10.1016/j.chroma.2018.05.026

