

**REAKTİF FORMDA, HİDROFOBİK MONODİSPERS-
GÖZENEKLİ PARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE BORONAT
AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN DESTEK MALZEMESİ
OLARAK KULLANIMI**

**SYNTHESIS OF REACTIVE, HYDROPHOBIC
MONODISPERSE-MACROPOROUS PARTICLES AND
THEIR USE AS STATIONARY MEDIUM IN BORONATE
AFFINITY CHROMATOGRAPHY**

ÖZLEM ÖZKUL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Yeşim Sağ Açıkel

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel

Üye :.....
Prof. Dr. Tülay Durusoy

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. İ. Cengiz Koçum

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Selis Önel

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 29/06/2011 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca .../.../... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sevgili Aileme...

REAKTİF FORMDA, HİDROFOBİK MONODİSPERS-GÖZENEKLİ PARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE BORONAT AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN DESTEK MALZEMESİ OLARAK KULLANIMI

Özlem Özkul

ÖZ

Tez kapsamında reaktif formda, hidrofobik, monodispers ve gözenekli poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküller “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” ile sentezlenmiş ve boronat afinite kromatografisinde kesikli sistemde destek malzemesi olarak kullanılmıştır.

Reaktif klorometil grubuna sahip, 6 µm boyutundaki monodispers ve gözenekli poli(CMS-co-DVB) partiküllere bazik ortamda 3-aminofenilboronik asit, APBA, nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile bağlanmıştır. Çalışmada reaktif klorometil grubuna sahip partiküller ile çalışılmasının nedeni, polimerik yapıya seçilen ligandın kolaylıkla bağlanabilmesidir. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin boyut özellikleri ve yüzey yapısı, taramalı elektron mikroskobu, gözeneklilik özellikleri HPLC sisteminde ters-büyükölçü ayırma kromatografisi, yüzey alanı, BET analizi ile tayin edilmiştir. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ligand içeriği 75 mg APBA/g polimer olarak bulunmuştur.

Sentezlenen APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküller boronat afinite kromatografisi yoluyla kesikli sistemde diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonu için kullanılmıştır. Model molekül olarak askorbik asit (AA) ve ribonükleik asit (RNA) seçilmiştir. AA ve RNA için maksimum denge adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 147 mg AA/g polimer ve 134 mg RNA/g polimer olarak bulunmuştur. Bu değerler diol boronik asit etkileşiminin maksimum olduğu pH 8.5 değerinde elde edilmiştir. RNA ve AA için maksimum desorpsiyon oranları sırasıyla % 65 ve % 75 olarak bulunmuştur. Bu değerler değiştirilen adsorbanın, boronat afinite kromatografisi yöntemiyle biyomolekül izolasyonunda başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Monodispers-gözenekli partiküller, CMS, APBA, adsorpsiyon, boronat afinite kromatografisi, RNA, Askorbik asit.

Danışman: Prof.Dr. Süleyman Ali TUNCEL, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı.

SYNTHESIS OF REACTIVE, HYDROPHOBIC MONODISPERSE-MACROPOROUS PARTICLES AND THEIR USE AS STATIONARY MEDIUM IN BORONATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Özlem Özkul

ABSTRACT

In this study, hydrophobic, monodisperse and macroporous poly(4-chloromethylstyrene-co-divinylbenzene) particles in the reactive form were synthesized by multistage-microsuspension polymerization and used in batch fashion boronate affinity chromatography as a support material. The boronic acid functionalized ligand, 3-aminophenylboronic acid (APBA), was covalently attached onto the monodisperse and macroporous poly(CMS-co-DVB) particles in size 6 μm that have reactive chloromethyl group, in basic medium via the direct nucleophilic substitution reaction. In the study because of working with particles have chloromethyl group, selected ligand can easily be attached onto polymeric structure. Size properties and surface morphology, porosity characteristics and surface area of poly(CMS-co-DVB) particles were performed by scanning electron microscopy, inverse-size exclusion chromatography and BET analysis, respectively. Ligand content of APBA attached poly(CMS-co-DVB) beads was found as 75 mg APBA/g polymer.

APBA attached poly(CMS-co-DVB) beads were used as stationary medium for isolation of diol carrying biomolecules in batch fashion by means of boronate affinity chromatography. Ascorbic acid (AA) and ribonucleic acid (RNA) were selected as model molecules. Maximum equilibrium adsorption capacities of RNA and AA were found as 134 mg RNA/g polymer and 147 mg AA/g polymer, respectively. The maximum desorption ratios of RNA and AA were found as 65 % and 75 %, respectively. These values show that synthesized sorbents can successfully be used for isolation of biomolecules by boronate affinity chromatography method.

Keywords: Monodisperse-macroporous particles, CMS, APBA, boronate affinity chromatography, RNA, Ascorbic acid.

Advisor: Prof.Dr. Süleyman Ali TUNCEL, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering, Chemical Engineering Division.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez dönemim boyunca çalışmalarımın başlaması, şekillenmesi, ilerlemesi, yönlenmesi, sıkıntılı anlarda çözüme ulaşması ve en nihayetinde sonuçlanması için bilgi ve birikimlerini fazlasıyla sunan, yapıcı yaklaşımlarıyla ve müthiş sabrıyla yol gösteren, çok kıymetli bilim insanı, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e,

Hoşgörülü ve samimi yaklaşımlarıyla bizleri destekleyen Sn. Prof. Dr. Yeşim Sağ Açıkel, güler yüzü ve konuşmalarıyla bizleri motive eden saygıdeğer hocam Sn. Prof. Dr. Tülay Durusoy'a, yaptığı ilginç çalışmalar ve yardımları ile bizlere örnek olan saygıdeğer hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Cengiz Koçum'a, insani yaklaşımlarıyla her zaman beni motive eden ve kendine imrendiren saygıdeğer hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Selis Önel'e,

Üniversiteye başladığım günlerden itibaren beni hiç yalnız bırakmayan çok sevgili arkadaşım, kardeşim Ayça İskifoğlu'na,

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve her daim bana yol gösteren Dr. Saba Samatya ve Çiğdem Gölgelioğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım Bilginur Maraş, Aslıhan Bayraktar, Selin Sağlam ve Nilüfer Güleç'e,

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü çatısı altında bulunmuş olan ve halen bulunmaya devam eden tüm arkadaşlarıma,

ve tabii ki,

Hayatım boyunca beni en iyi şekilde yetiştirebilmek için elinden gelen her şeyi yapma çabası ile hayatını bizlere feda eden Canım Annem ve Babam'a, Amcalarıma ve Teyzelerime, canımdan çok sevdiğim Kardeşlerim Tuba, Dilek, Gönül, Kübra, Oğuzhan, Adem, Lale, Yasin ve Burak'a

Her şey için kalpten teşekkür ederim...

Özlem Özkul

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polimerler	3
2.1.1. Polimerlerin tanımı ve sınıflandırılması	3
2.1.2. Polimerlerin yapısı	4
2.1.3. Polimerlerin sentezi	5
2.1.3.1. Zincir polimerizasyonu	6
2.1.3.2. Kondenzasyon polimerizasyonu	6
2.1.4. Polimerizasyon teknikleri	7
2.1.4.1. Yığın polimerizasyonu	7
2.1.4.2. Çözelti polimerizasyonu	8
2.1.4.3. Süspansiyon polimerizasyonu	8
2.1.4.4. Emülsiyon polimerizasyonu	10
2.1.4.5. Dispersiyon polimerizasyonu	12
2.1.4.6. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemleri	14
2.1.5. Sentetik polimerlerin kimyasal modifikasyonları	16
2.2. Adsorpsiyon	17
2.2.1. Adsorban seçimi	19
2.2.2. Polimerik adsorbanlar	19
2.2.3. Desorpsiyon ve adsorbanların yenilenmesi	20
2.2.4. Adsorpsiyon izotermi	21
2.2.4.1. Henry yasası	21
2.2.4.2. Freundlich izotermi	22
2.2.4.3. Langmuir izotermi	22

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.2.4.4. BET izotermi	23
2.3. Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi, (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	24
2.3.1. Büyüklükçe ayırma kromatografisi.....	28
2.3.2. Afinite kromatografisi.....	30
2.3.2.1. Boronat afinite kromatografisi	31
2.4. Biyomoleküller ve Saflaştırılması	35
2.4.1. Ribonükleik asit (RNA)	35
2.4.2. Askorbik asit (C vitamini)	37
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	39
3.1. Polimerik Partiküllerin Sentezi	40
3.1.1. Çıkış lateksinin sentezi.....	40
3.1.1.1. Kullanılan kimyasallar	40
3.1.1.2. Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi.....	42
3.1.2. Poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin sentezi	43
3.1.2.1. Kullanılan kimyasallar	43
3.1.2.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi	45
3.1.2.3. PS ve poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ekstraksiyonu.....	49
3.2. Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerine Ligand Bağlama	50
3.3. PS, Poli(CMS-co-DVB) ve APBA Bağlı Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Karakterizasyonu	52
3.3.1. Ters-büyüklükçe ayırma kromatografisi, ISEC	52
3.3.2. BET (Brunauer-Emmet-Teller) analizi	53
3.3.3. Taramalı elektron mikroskobu, SEM	54
3.3.4. Potansiyometrik titrasyon	54
3.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Deneyleri	55
3.4.1. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu deneyleri.....	56
3.4.1.1. Derişim etkisi	56
3.4.1.2. pH etkisi.....	58
3.4.1.3. Adsorban derişimi etkisi.....	59
3.4.1.4. Adsorpsiyon hızı	60

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

3.4.2. Ribonükleik asit ve askorbik asit desorpsiyonu deneyleri	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	64
4.1. Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu	64
4.1.1. Taramalı elektron mikroskopu, SEM	64
4.1.2. Ters-büyükölçek ayırma kromatografisi (ISEC) ve BET (Brunauer- Emmet-Teller) analizi	66
4.2. APBA Bağlı Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Karakterizasyonu	67
4.2.1. Sıcaklık etkisi.....	67
4.2.2. Potansiyometrik titrasyon	69
4.3. Kesikli Sistemde Ribonükleik Asit ve Askorbik Asit Adsorpsiyon Çalışmaları	70
4.3.1. Derişim etkisi	71
4.3.2. pH etkisi	72
4.3.3. Adsorban derişimi etkisi	73
4.3.4. Adsorpsiyon hızı	74
4.3.5. Desorpsiyon davranışı.....	75
4.4. Ribonükleik Asit ve Askorbik Asit İzolasyon Koşulları	76
4.5. İzoterm Analizleri	77
4.5.1. Freundlich modeli	77
4.5.2. Langmuir modeli.....	78
5. SONUÇLAR	79
KAYNAKÇA.....	81
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. HPLC sisteminin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.2. SEC kolonunda ayırma mekanizması.....	29
Şekil 2.3. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.4. Boronat ligandları ile cis-diollar arasındaki esterleşme.....	32
Şekil 2.5. Ribonükleik asidin (RNA) kimyasal yapısı.	36
Şekil 2.6. Askorbik asidin (AA) kimyasal yapısı.	37
Şekil 3.1. Polistiren (PS) lateks sentezinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 3.2. Polistiren partiküllerin kimyasal yapısı.	43
Şekil 3.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu protokolü.....	46
Şekil 3.4. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kimyasal yapısı.	48
Şekil 3.5. Nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile ligand bağlama protokolü.	51
Şekil 4.1. Polistiren partiküllerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 5000X, (B) 3000X.	65
Şekil 4.2. Sentezlenen poli(CMS-co-DVB) partiküllerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 4000X, (B) 20000X.	65
Şekil 4.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ISEC yöntemi ile belirlenen gözenek dağılımı grafiği.....	66
Şekil 4.4. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kolondaki geri basınç-akış hızı grafiği. Mobil faz: Su, oda sıcaklığı.....	67
Şekil 4.5. Alizarin kırmızı ile yapılan adsorpsiyon deneyindeki, 60 °C ve oda sıcaklığında bağlanan ligand için sıcaklık etkisi.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sayfa

Şekil 4.6. Askorbik asit ile yapılan adsorpsiyon deneyindeki, 60 °C ve oda sıcaklığında bağlanan ligand için sıcaklık etkisi.....	69
Şekil 4.7. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküller ile NaOH çözeltisinin etkileşim öncesi ve sonrası potansiyometrik titrasyon eğrileri.	70
Şekil 4.8. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu üzerindeki diol gruplu moleküllerin başlangıç derişimi etkisi.	71
Şekil 4.9. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu üzerindeki pH etkisi.....	72
Şekil 4.10. Ribonükleik asit ve askorbik asit için adsorban derişiminin, denge adsorpsiyon kapasitesine etkisi.	73
Şekil 4.11. Ribonükleik asit ve askorbik asit için adsorpsiyon süresinin, denge adsorpsiyon kapasitesine etkisi.	74
Şekil 4.12. Ribonükleik asit ve askorbik asit için % desorpsiyon değerleri.	75
Şekil 4.13. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Freundlich izotermi.....	77
Şekil 4.14. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Langmuir izotermi.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Polistiren lateksin dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan kimyasallar ve polimerizasyon koşulları.....	41
Çizelge 3.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve polimerizasyon koşulları.....	44
Çizelge 3.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin sentez koşulları.....	48
Çizelge 3.4. Nükleofilik yer değiştirme tepkimesinde kullanılan APBA özellikleri ve bağlanma koşulları.	50
Çizelge 3.5. RNA ve askorbik asit özellikleri.....	55
Çizelge 4.1. Polistiren partiküllerin boy ve boy dağılım özellikleri.....	64
Çizelge 4.2. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özellikleri.....	65
Çizelge 4.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin gözeneklilik ve özgül yüzey alanı değerleri.	67
Çizelge 4.4. RNA ve AA için denge adsorpsiyon kapasiteleri üzerine etki eden parametreler ve adsorpsiyon için belirlenen en uygun değerler.	76
Çizelge 4.5. RNA ve AA için % desorpsiyon değerleri.....	76
Çizelge 4.6. Freundlich modelinin parametreleri.	77
Çizelge 4.7. Langmuir modelinin parametreleri.	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
AA	Askorbik asit
PAN	Poliakrilonitril
PVA	Polivinilasetat
PAA	Poliakrilikasit
PVP	Polivinilpirolidon
PCB	Poliklorlu bifeniller
LDPE	Düşük yoğunluklu polietilen
HDPE	Yüksek yoğunluklu polietilen
BET	Brunauer, Emmett ve Teller
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
FAD	Flavin adenin dinükleotid
CMS	4-klorometilstiren
DVB	divinilbenzen
APBA	3-Aminofenilboronik asit
AIBN	2,2'-Azobis(2-metil propiyonitril)
DBP	Dibütilftalat
LS	Sodyum dodesil sülfat, lauril sülfat
PS	Polistiren
PCMS	Poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen)
HEPES	(4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sülfonik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IEC	İyon değişim kromatografisi
AC	Afinite kromatografisi
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
RPC	Ters faz kromatografisi
NPC	Normal faz kromatografisi
ISEC	Ters-büyükölçü ayırma kromatografisi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
Na ₂ S ₂ O ₈	Sodyum persülfat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

A	Absorbans
$S_{\text{yüzey}}$	Adsorbanın yüzey alanı
K_H, n	Henry sabiti
q	Dengede katı yüzeyinde adsorplanmış madde miktarı, (mol/g)
C_e	Dengede adsorbatın çözelti fazındaki konsantrasyonu, (mol/l)
k_a	Adsorpsiyon hız sabiti
k_d	Desorpsiyon hız sabiti
θ	Adsorban tarafından kaplanan yüzey kesri
K	Adsorpsiyon denge sabiti
q_e	Adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanan miktar
q_m	Adsorbanın tek tabaka kapasitesi, (mol/g)
q_1	Birinci tabakanın adsorpsiyon ısısı, (kJ/mol)
q_L	Adsorplanan maddenin yoğunlaşma ısısı, (kJ/mol)
D_p	Hidrodinamik çap, (Å)
SD	Standart sapma
CV	Değişim katsayısı
Q	Denge adsorpsiyon kapasitesi, (mg adsorbat/g adsorban)
C_0	Başlangıç adsorbat derişimi, (mg adsorbat/mL)
V	Adsorpsiyon hacmi (mL)
m_a	Adsorban kütlesi (g)

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji başta olmak üzere, tüm bilim dallarında, geniş bir uygulama alanı bulan kromatografi teknikleri, araştırmacılara etkin ve hızlı analiz imkanı tanımaktadır. Kromatografik tekniklerin, basit ve geliştirilmeye açık oluşu, çeşitli biyolojik sıvılardan, hedef molekülleri ayırmak için gereksinime özgün sistemler kurulmasına olanak vermektedir. Kromatografik alandaki çalışmalar, özellikle proteinler, enzimler, peptitler, nükleik asitler ve hormonlar gibi biyomoleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında mevcut tekniklere göre daha yüksek verimle, daha güvenilir sonuçlar sağlamaktadır.

Kromatografik yöntemler arasında bahsedilen üstünlüklere sahip olan afinite kromatografisi, yüksek saflık derecelerinde ayırım yapılabilen önemli bir tekniktir. Afinite kromatografisinin saflık derecesinin yüksek olması, hedef molekülün adsorban sistemi tarafından özgül olarak tanınmasına dayanmaktadır. Adsorban sistemi, bir destek malzemesi ile destek üzerine bağlanan hedef molekülle non-kovalent olarak etkileşebilen bir ligand molekülünden oluşur.

Bu çalışmada boronat afinite kromatografisinde destek malzemesi olarak polimerik partiküller sentezlenmiştir. Polimerik partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers formda (eş boyutlu) partiküllerin sentezlenmesinin kolay olması, türevlendirme proseslerinin daha çeşitli ve kolay olması, geniş pH aralığında yapısal kararlılığa sahip olmaları gibi avantajlarının olmasından dolayı araştırmalar polimerik partiküller üzerinde yoğunlaşmıştır.

1990'lerden beri polimer bazlı monodispers ve gözenekli partiküller alternatif kolon dolgu malzemesi olarak gösterilmektedir. Literatürde eş boyutlu polimerik partiküllerin üretimi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu tür partiküller boyutları 1-20 µm arasında değişen gözenekli ve gözeneksiz monodispers formda Ugelstad ve arkadaşları tarafından aktif şişme metodu adı verilen yöntemle üretilmiştir (Ugelstad, et al., 1980).

Çalışma kapsamında ilk olarak, biyomoleküllerin izolasyonu amacıyla polimerik partiküller sentezlenmiştir. Reaktif formda partiküller 4-klorometilstiren ve divinilbenzen monomerlerinin "çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu"

ile sentezlenmiş ve partiküllerin boronat afinite kromatografisinde destek malzemesi olarak kullanılması hedeflenmiştir. Yöntemde ilk olarak, stirenin dispersiyon polimerizasyonu ile 3.3 mikron boyutunda monodispers polistiren partiküller sentezlenmiştir. PS partiküller ilk basamakta organik çözücü fazı, ikinci basamakta ise başlatıcı, monomer ve çapraz bağlayıcıyı içeren organik faz ile şişirilmiştir. Son aşamada ise 70 °C sıcaklıkta monomer fazı partiküller içerisinde polimerize edilerek, reaktif, monodispers ve gözenekli formda, hidrofobik, yaklaşık 6 µm boyutundaki poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin eldesi sağlanmıştır.

Sentezlenen partiküller üzerinde reaktif grupların varlığı, istenilen fonksiyonel gruba sahip sabit fazların sentezi için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Çalışma için reaktif klorometil grubunun seçilmesinin nedeni, grubun kolaylıkla türevlendirilebilir karakterde olmasıdır. Bu grup üzerinden tek basamaklı direkt tepkimeler ile polimerik yapıya iyon değiştirici ligandlar veya lineer hidrofobik ligandlar kolaylıkla bağlanabilmektedir.

Literatürde mevcut çalışmaların çoğunda klorometil fonksiyonel grubuna sahip partiküller genelde 4-klorometilstiren monomerinden çıkılarak sentezlenmektedir. CMS bazlı partikül eldesini takiben, bazik ortamda 3-aminofenilboronik asit (APBA) ligand olarak partikül yüzeyine bağlanmış ve APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kromatografik izolasyon amaçlı kullanılabilirliği, boronat afinite kromatografisi yoluyla kesikli sistemde test edilmiştir.

Bu amaçla, yapısında diol içeren askorbik asit (AA) ve ribonükleik asit (RNA) model molekül olarak denenmiştir. Kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri ile sentezlenen yapının diol grubu içeren moleküller için izolasyon yeteneğine sahip olduğu ve bu amaçla kullanılabilirliği tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimerler

2.1.1. Polimerlerin tanımı ve sınıflandırılması

Polimerler, en basit tanımıyla, çok sayıda aynı veya farklı atomik grupların kimyasal bağlarla, az veya çok düzenli bir biçimde, bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli, başka bir ifadeyle yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Sentetik polimerler genellikle, çok sayıda tekrarlanan “mer” veya “monomer” denilen basit birimlerden oluşur. “poli” Latince bir sözcük olup, çok sayıda anlamına gelir ki, “mer” sözcüğü ile birleştirilerek yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin adlandırılmasında kullanılır. Selüloz, nişasta, agaroz, doğal kauçuk vb. gibi doğal polimerlerin bazıları, sentetik polimerlerde olduğu gibi basit tekrarlanan birimlerden oluşur. Bazıları ise farklı yapıda birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur.

“Biyopolimerler” olarak adlandırılan ve yaşamla ilgili birçok önemli faaliyetin yürütülmesinde rol alan proteinler, nükleik asitler (DNA, RNA) ve enzimler bu tür doğal polimerlere örneklerdir. Polimerler doğal ya da sentetik olabilir. Doğal polimerlerin modifikasyonu ile elde edilen polimerlere yarı sentetik polimerler denir. Organik polimerler yapılarında başta karbon atomu olmak üzere, hidrojen, oksijen, azot ve halojen atomlarını içerirler. Eğer polimer zinciri üzerinde dizili atomların hepsi aynı türden ise bu polimerler “homozincir”, farklı atomlar ise “heterozincir” polimerler olarak adlandırılırlar.

Polimerler yapılarına göre sınıflandırılabilirler. Tek bir monomer biriminin tekrarlanması ile oluşan polimerler “homopolimer” adını alır. Eğer polimerler iki farklı monomerin karışımından oluşuyorsa “kopolimer” adını alır, “ardışık”, “blok” ve “geleşigüzel” olabilirler. Eğer bir polimerde ana zincire başka bir monomerin tekrarlandığı yan gruplar takılmışsa bu bir “graft” kopolimerdir. Homo olsun kopolimer olsun polimerler; “doğrusal”, “dallanmış” veya “çapraz bağlı” olabilir. Polimerler, sentez yöntemlerine göre de sınıflandırılabilirler. Örneğin, ester oluşumu gibi bir kondenzasyon reaksiyonu ile sentezlenen polimerler “kondenzasyon polimerleri” olarak adlandırılır. Eğer, sentez reaksiyonu bir çift bağın açılması ve monomerlerin birbirine, zincirin halkaları gibi, katılmasıyla oluşuyorsa polimerler “zincir” veya “katılma” polimerleridir.

Polimerler işleme şekillerine, başka bir ifadeyle ısıya ve/veya çözücülere karşı gösterdikleri davranışa göre iki grup altında incelenirler. Termoplastikler ısı ve basınç altında yumuşar, akarlar ve böylece çeşitli formlarda şekillendirilebilirler. Bunlar doğrusal yapıdadırlar (Pişkin, 1987). Polistiren ticari termoplastikler için önemli bir örnektir. Poliolefinler (örneğin, polietilen ve polipropilen) ve polivinil klorür diğer önemli örneklerdir. Termosetler ise çapraz bağlı, dolayısıyla çözünmez ve erimez polimerlerdir. Termosetlerin başlıca örnekleri epoksi, fenol-formaldehit reçineler ve cam elyafı gibi cam-takviyeli kompozitlerin üretiminde kullanılan doymamış polysterleri içerir (Fried, 2003).

Polimerler son kullanılış yerlerine göre, plastikler, kauçuklar, fiberler, kaplamalar, yapıştırıcılar olmak üzere beş ayrı grupta incelenirler. Fiziksel durumlarına göre de sınıflandırılabilirler. Örneğin, “amorf”, “kristalin”, “yarı kristalin” polimerlerden söz edilebilir. Amorf polimerlerde polimer zincirleri gelişigüzel şekilde birbirinin içine girmiş yün yumakları şeklindedir. Kristalin polimerik yapılarda, polimer zincirlerinin tamamı belli bir düzene girmiş veya kristalleşmiştir. Yarı kristalin polimerlerde ise, polimerik yapının bazı bölümleri kristalin, diğer bölümleri amorf yapıdadır (Pişkin, 1987).

2.1.2. Polimerlerin yapısı

Bir polimer molekülü karbon, oksijen, azot, hidrojen, halojenler, kükürt, fosfor, silisyum, vb. gibi atomların kovalent (birincil) bağlarla bağlandığı uzun bir zincirdir. Ana zincir üzerinde yalnızca iki veya daha fazla değerlikli atomlar bulunabilir. Bu nedenle hidrojen ve halojenürler ana zincir üzerinde yer alamazlar. Bu atomlar ve benzerleri ana zincir üzerindeki atomlara yine kovalent bağlarla süstitüye olabilirler. Kovalent bağlar genellikle yüksek enerjili (35-150 kcal/mol) bağlardır. Bu tür atomlar arasındaki uzaklık da kısadır (1.1-1.6 Å) ve birbirlerini izleyen bağlar arasındaki açılar karakteristiktir.

Polimer zinciri üzerinde yer alan çeşitli atomlar arasındaki kovalent bağlar; karbon bağları, karbon-hidrojen bağları, oksijen bağları, azot bağları, halojen bağları, kükürt bağları, silisyum bağları, fosfor bağlarıdır. İkincil bağlar, kimyasal olarak reaksiyona girmeyen polimer molekülleri arasında veya bir molekülün çeşitli bölümleri arasında oluşan bağlardır.

İkincil kuvvetlerin oluşturduğu bağların enerjileri 1-20 kcal/mol ve uzunlukları 2-5 Å aralığındadır. Van der Waals kuvvetleri olarak adlandırılan ikincil kuvvetler genellikle kısa mesafede etkin kuvvetlerdir. Bu kuvvetler; dipol-dipol etkileşmeleri, dipol-uyarılmış dipol etkileşmeleri, dispersiyon kuvvetleridir. İkincil kuvvetlerin oluşturduğu, özel ve çok karşılaşılan bir bağ türü de hidrojen bağlarıdır. Polimerik yapıdaki bağların, polimerik malzemenin özelliklerini önemli oranda etkilediği söylenebilir. Genel olarak, birincil bağlar olan kovalent bağlar, yapının ısı ve fotokimyasal kararlılığını belirler. Buna karşın, ikincil bağlar ise, polimerlerin erime, çözünme, buharlaşma, adsorpsiyon, difüzyon, deformasyon, vb. gibi birçok kimyasal ve fiziksel özelliklerini kontrol eder.

Konfigürasyon, bir molekülü oluşturan atomların kesin bir düzen içinde yerleşmesi anlamına gelir. Uzun zincirlerden oluşmuş polimer molekülleri de çok çeşitli konfigürasyon ve konformasyonlarda bulunabilir. Sentetik polimerlerde kararlı konfigürasyonlar gözlenir. Bir polimer zincirinde, sayı ve uzunluk olarak farklı derecelerde dallanma polimerlerde şiddetli düzensizliğe neden olur. Polimer zincirindeki çeşitli birimlerin ısı hareketliliği konformasyon değişimlerine yol açar. Bir polimer zinciri için, “çubuk”, “yumak” ve “sarmal” olmak üzere üç konformasyon durumu vardır.

Polimerlerin molekül ağırlığı ve dağılımı polimerik malzemenin özellikleri yönünden çok önemlidir. Genellikle, molekül ağırlığının artmasıyla yapıda griftlik ve moleküller arası çekim kuvvetleri artar ki bu da polimerik yapının mekanik ve ısı özellikleri başta olmak üzere işlenebilirliği, elektriksel, optik ve kimyasal özelliklerini önemli oranda değiştirir. Hem işlenebilir hem de yeterli mekanik özelliklere sahip ticari polimerik ürünlerde molekül ağırlığının 10^4 - 10^6 arasında olması istenir (Pişkin, 1987).

2.1.3. Polimerlerin sentezi

Polimerizasyonun oluşabilmesi için sistem yüksek enerjili durumdan alçak enerjili duruma geçmelidir. Başka bir ifade ile tüm polimerizasyon reaksiyonları ekzotermiktir. Polimerizasyon reaksiyonlarında ortaya çıkan ısı miktarı, polimerizasyona göre değişir. Polimer sentezi Carothers sınıflandırmasına göre; zincir (katılma) ve kondenzasyon (basamak) polimerizasyonu olmak üzere başlıca iki grupta incelenmektedir.

2.1.3.1. Zincir polimerizasyonu

Zincir polimerizasyonunda, monomerler doğrudan birbirine katılarak makromolekül zincirini oluştururlar. Bu türde, genellikle doymamış bağlar içeren etilen, stiren, vinil klorür, vb. gibi dien veya vinil monomerlerinin polimerizasyonu söz konusudur. Bütün zincir polimerizasyon yöntemlerinin en önemli ortak özelliği, polimer zincirinin çok kısa sürede (0,1 saniye gibi) yüksek molekül ağırlığına (10^5 - 10^7 gibi) ulaşmasıdır. Reaksiyonun başlamasından çok kısa bir süre sonra dahi, ortamda çok az fakat çok yüksek molekül ağırlıklı polimer ve çok sayıda monomer vardır.

Zincir polimerizasyonunun radikaller üzerinden yürüyen türüne “radikal polimerizasyonu” denir. Polimerizasyon başlama, üreme ve sonlanma olmak üzere başlıca üç basamakta gerçekleşir. Zincir polimerizasyonu serbest radikaller üzerinden olduğu kadar iyonlar (anyonlar ve katyonlar) ve koordinasyon kompleks yapıcı ajanlar üzerinden de yürüyebilir. Bu zincir polimerizasyonuna, “iyonik ve koordinasyon kompleks polimerizasyonu” denir (Pişkin, 1987).

2.1.3.2. Kondenzasyon polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerleri benzer veya farklı yapıdaki polifonksiyonel monomerlerin genellikle küçük bir molekül çıkararak reaksiyona girmesiyle elde edilir. Burada en önemli koşul monomerlerin polifonksiyonel oluşudur. “OH”, “COOH”, “NH₂”, vb. gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tane taşıyan monomerler esterleşme, amidleşme, vb. gibi reaksiyonlarla, genellikle H₂O, NH₃, CO₂, N₂, vb. gibi küçük moleküller çıkararak, kondenzasyon polimerlerini oluştururlar.

Polikondenzasyon polimerizasyonları “basamak polimerizasyonu” olarak da anılır. Çünkü bu tür polimerizasyonda, önce monomerler birleşir, dimerler oluşur, monomer dimerle birleşir trimerler oluşur ve böylece adım adım oluşan polimerin zincir boyu uzar. Bu özellik kondenzasyon polimerizasyonu ile zincir polimerizasyonu arasındaki en önemli farktır. Bu türde, her uzunluktaki polimer zinciri, reaksiyon süresince, aynı olasılıkta boyunu uzatarak büyür. Polimerizasyonun başlatılmasından bir süre sonra, örneğin ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 10,000'e ulaştınca, ortamdaki monomerlerin tamamına yakın bir bölümü reaksiyona girmiştir. Ancak, polimerizasyonun sonuna doğru polimer zincirleri son boylarına ulaşabilir (Pişkin, 1987).

2.1.4. Polimerizasyon teknikleri

Polimerizasyon reaksiyonları ekzotermiktir. Polimerizasyon reaksiyonlarında ortaya çıkan bu ısı, endüstriyel boyutta polimer üretiminde önemli problemlere neden olur. Özellikle zincir polimerizasyonunda, çok hızlı bir şekilde yüksek molekül ağırlığına çıktığı için, ortam viskozitesi hızla artar. Polimerlerin ısı iletkenlikleri de düşük olduğundan ısı transferi ve dolayısıyla sıcaklık kontrolü son derece zorlaşır. Bu nedenle endüstriyel boyutta polimer üretiminde özel önlemlerin alındığı prosesler kullanılır. Her polimerin reaksiyon mekanizması farklı olduğu için, başlama sıcaklığı, reaksiyon hızı, viskozite artışı, vb. gibi parametreler dikkate alınarak uygun polimerizasyon prosesinin seçilmesi gerekir. Polimerizasyon prosesleri başlıca beş grupta toplanarak incelenebilir.

- Yığın (kütle veya blok) polimerizasyonu,
- Çözelti polimerizasyonu,
- Süspansiyon polimerizasyonu,
- Emülsiyon polimerizasyonu,
- Dispersiyon polimerizasyonu.

Bu beş yöntem de uygun düzeneklerle radikal polimerizasyonunda çeşitli polimerlerin ticari olarak üretiminde uygulanmaktadır. Örneğin polistiren beş yöntemle de üretilmektedir. Kondenzasyon polimerizasyonları, genellikle yığın veya çözelti prosesleri ile gerçekleştirilir. İyonik ve koordinasyon kompleks polimerizasyonlarda başlatıcılar sulu ortamda aktivitelerini kaybettikleri için, bu polimerizasyonlar yalnızca yığın ve çözelti prosesleri ile yürütülür (Pişkin, 1987).

2.1.4.1. Yığın polimerizasyonu

Bu tür polimerizasyonda monomer, içine uygun bir başlatıcı ilave edildikten sonra, belli bir sıcaklık ve basınçta doğrudan polimerleştirilir. Bu prosesin en önemli özelliği oldukça saf polimerlerin üretilmesidir. Proseste, polimerizasyon sonucu oluşan ürün, üretim sonrası ayırma, saflaştırma vb. gibi prosesleri gerektirmez. Bu proseslerin en önemli dezavantajı ortaya çıkan ısının ortamdaki kolay kolay uzaklaştırılmayıp, dolayısıyla sıcaklık kontrolünün güç olmasıdır. Yığın polimerizasyonu, kesikli veya sürekli düzende yürütülebilir. Kesikli yığın polimerizasyonunda kirlenme azdır. Sürekli yığın polimerizasyonunda, kesikli

düzene göre sıcaklık kontrolü çok daha kolaydır ve molekül ağırlığı dağılımı dar ürünler elde edilir. Ancak, kullanılan cihazlar daha karmaşık ve pahalıdır (Pişkin, 1987).

Yığın polimerizasyonu polikondenzasyon ürünlerinin elde edilmesi için uygun bir yöntemdir. Bu tür polimerizasyon reaksiyonlarında, radikal polimerizasyonun tersine, polimerizasyon süresince zincirlerin boyu adım adım, yavaş bir şekilde artar, dolayısıyla reaksiyon ortamının viskozitesi hemen yükselmez (Fried, 2003).

2.1.4.2. Çözelti polimerizasyonu

Bu tür polimerizasyon, yığın proste ortaya çıkan sıcaklık kontrol zorluğunu ortadan kaldıran bir yaklaşımdır. Polimerizasyon uygun bir çözücü veya seyreltici faz içinde yürütülür. Polimerizasyon gaz, sıvı veya katı fazların bulunabileceği homojen veya heterojen ortamlarda yürütülebilir.

Bu tür prosesin en önemli avantajı, çözücü veya seyreltici etkisi ile ortam viskozitesinin düşük kalması, dolayısıyla sıcaklık kontrolünün kolaylıkla yapılabilmesidir. Ayrıca bu yaklaşımda ölü polimerlere radikal transferi ile oluşabilecek çapraz bağlanma ve dolayısıyla jelleşme önlenmektedir. Ancak çözücünün varlığı nedeniyle hem polimerizasyon hızı yavaşlar, hem de çözücüye zincir transfer reaksiyonları sonucu molekül ağırlığında önemli oranda düşme gözlenir. Düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) üretimi homojen fazlı çözelti polimerizasyonuna, yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) üretimi heterojen fazlı çözelti polimerizasyonuna örnektir. Poliakrilonitril (PAN), polivinilasetat (PVA), poliakrilikasit (PAA) ve polivinilpirolidon (PVP) üretimleri sulu çözeltilerde yürütülen çözelti polimerizasyonuna tipik örneklerdir (Pişkin, 1987).

2.1.4.3. Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu, günümüzde birçok önemli polimerin, yüksek kapasitelerle üretiminde kullanılmaktadır. Endüstriyel boyutlarda süspansiyon polimerizasyonu ile ilk üretilen polimer polivinilkloroasetattır. Akriklik ve metakriklik asitler, stiren ve kopolimerleri, vinil asetat, vinil klorür, vinilidin klorür, tetrafloroetilen, klorotrifloroetilen ve daha birçok doymamış monomer bu prosesle polimerleştirilmektedir.

Bu proseste monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı olarak genellikle su kullanılır. Başlatıcı suda dağılmış halde bulunan monomer damlacıklarının içinde çözülmüştür. Ortam sürekli karıştırılarak monomer süspansiyonunun devamlılığı sağlanır. Dağıtma ortamında çözünen süspansiyon stabilizörleri ve emülsifiyon yapıcı maddelerle süspansiyonun kararlılığı desteklenir. Sisteme uygun bir ısıtma programı uygulanarak monomer damlacıkların küresel polimer tanecikleri haline dönüşmesi sağlanır. Bu proseste, sistem parametrelerinin ayarlanmasıyla, 10 µ'dan 10 mm'ye kadar istenilen boyda polimer taneciklerinin eldesi gerçekleştirilebilmektedir.

Burada reaksiyon hızı yığın polimerizasyonuna göre daha hızlıdır. Sonlanma ve zincir transferi yavaş olduğundan, daha büyük molekül ağırlıklarına ulaşılır. Yığın prosese göre bu prosesin en önemli avantajı, düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolünün mükemmel olmasıdır. Ayrıca dağıtma ortamı olarak kullanılan su ucuzdur ve suyun yanma, patlama ve toksisite gibi yan etkileri yoktur.

Yığın polimerizasyonuna göre dezavantajları ise, sürekli karıştırma gerektirmesi ve süzme, yıkama, kurutma gibi fabrikasyonu daha karmaşık ve pahalı hale getiren yardımcı işlemler içermesidir. Ayrıca, yüzeyde adsorbe olan stabilizörler ve diğer katkı maddeleri nedeniyle ürün kirlenmektedir. Süspansiyon proseslerinin, emülsiyon proseslerine göre önemli avantajlarından biri, bu yöntemde ürün tanecik boyunun çok daha kolay ayarlanabilmesi ve istenilen boyda ve dar boy dağılımında ürün elde edilmesidir. Kararlı bir süspansiyon ve istenilen ürün özellikleri için karıştırma hızı optimize edilmelidir.

Süspansiyon polimerizasyonunda yığılma ve bloklaşmayı önlemek ve bir ölçüye kadar ürün tanecik boyutunu ayarlamak için ortama stabilizörler ve benzeri katkı maddeleri ilave edilir. Yüzey aktif madde konsantrasyonu da dikkat edilmesi gereken hususlardan biridir. Bu maddelerin değeri kritik bir değeri aşarsa ortamda yüzey aktif maddelerin misselleri oluşur ve bu misseller içinde, emülsiyon polimerizasyonu benzeri polimerizasyon reaksiyonları gözlenir. Bunlar da ürün tane boy dağılımını önemli oranda değiştirir. Süspansiyon polimerizasyonunda, diğer polimerizasyon proseslerinde olduğu gibi, sıcaklık kontrolü çok önemlidir (Pişkin, 1987).

2.1.4.4. Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonunun mekanizması, süspansiyon polimerizasyonundan çok daha karışık ve farklıdır. Polimer oluşum mekanizmaları arasındaki bu önemli farkın yanı sıra emülsiyon ve süspansiyon prosesleri ürün özellikleri yönünden de birbirinden ayrılabilir. Emülsiyon polimerizasyonunda, 0.05 ile 5 µ boyutlarında, çok daha küçük polimer partikülleri elde edilir. Ayrıca, emülsiyon polimerizasyonunda sonuç ürün bir sentetik lateks, başka bir ifadeyle, polimer partiküllerin sulu ortamdaki kararlı bir emülsiyon şeklindedir. Emülsiyon polimerizasyonunun yığın, çözelti ve süspansiyon proseslerine göre önemli avantajları şunlardır:

- Diğer proseslerin hemen hepsinde, genellikle polimerizasyon hızıyla polimerizasyon derecesinin (ortalama molekül ağırlığının) azaldığı bilinmektedir. Oysa emülsiyon polimerizasyonunda yüksek polimerizasyon hızı ile diğer yöntemlere göre daha yüksek molekül ağırlıklarına çıkılabilmektedir.
- Polimerizasyon sıcaklığı bağıl olarak düşük (0 - 80 °C) olup, reaksiyon adımları kolaylıkla kontrol edilebilir.
- Diğer yöntemlere göre ortam viskozitesi düşük olup, karıştırma, ısı transferi ve ürünün transferi (pompalanması) oldukça kolaydır.
- Sürekli üretim kolaydır.
- Dağıtma ortamı olarak kullanılan su hem ucuzdur, hem de diğer çözücü veya seyreltici ortamlara göre çok daha sağlıklı çalışılabilir.

Bu polimerizasyon prosesinin dezavantajları da vardır. Bu proseste, diğer proseslerden çok daha fazla katkı maddesi kullanılır, dolayısıyla kirlenme fazladır. Ayrıca, katı ürün isteniyorsa, emülsiyondan ürünün eldesi için uygulanacak ilave ayırma, saflaştırma ve kurutma işlemleri prosesin maliyetini artırır. Bu polimerizasyonda, monomer yaklaşık 1 µ boyutunda damlacıklar halinde su içinde dağıtılır. Monomerin su içindeki çözünürlüğü ihmal edilebilecek kadar azdır (yaklaşık % 0.04). Başlatıcı suda çözünür ve uygun sıcaklıkta polimerizasyonu başlatacak radikalleri oluşturur. Monomer ve daha sonra oluşacak polimer partiküllerin kararlı emülsiyonunu sağlamak üzere emülsifiyon yapıcı maddeler ajanlar kullanılır. Bu ajanlar yüzey aktif maddelerdir. Moleküllerin bir tarafı hidrofilik diğer tarafı hidrofobiktir.

Bu moleküller sulu ortamda, hidrofobik monomer damlacıklarının çevresinde toplanarak, hidrofobik uçları monomer tarafına, hidrofilik uçları dış tarafa (su tarafına) olmak üzere yönelirler. Böylece, monomer-su arasındaki ara yüzeylere yerleşen bu ajanlar damlacıkların birbiriyle birleşmesini engeller ve kararlı emülsiyon oluştururlar.

Emülsifiyon yapıcı maddelerin emülsiyon polimerizasyonunda ikinci önemli görevleri, polimerizasyonun yürüyeceği miselleri oluşturmalarıdır. Emülsifiyon yapıcı maddeler sulu ortamda, ancak belli bir konsantrasyonun üzerinde buldukları zaman misel oluştururlar. Bu konsantrasyonuna “kritik misel konsantrasyonu” denir. Birçok emülsiyon polimerizasyonunda bu değer altında polimerizasyonun oluşmadığı gözlenmiştir. Miseller küresel veya çubuk şeklinde yapılardır. Misel çapı 50 Å civarında olup, kritik misel konsantrasyonunda 1 mL ortamda 10^{18} misel bulunur.

Monomerin varlığında bazı miseller hacimlerini iki kat kadar artırarak monomerle şişerler ve böylece polimerizasyonun yürümesi için gerçek ortamları oluştururlar. Bu durumda bulunan emülsiyon ortamı, sürekli karıştırılarak gerekli ısı ve kütle transferi sağlanır. Ortamın ısıtılmasıyla sulu fazda oluşan radikaller monomer taşıyan miseller içine difüze olur ve polimerleşmeyi başlatır. Bu miseller içinde, polimerleşmeyle eksilen monomer molekülleri yerine, monomer depoları olarak adlandırılacak monomer damlacıklarından yeni monomer molekülleri gelir.

Emülsiyon polimerizasyonunda dağıtma ortamı, genellikle sudur. Pratikte genellikle iyi ısı ve kütle transferi sağlayabilmek üzere ortam viskozitesinin düşük olması istenir. Buna ulaşabilmek için monomer/su oranı 1/2-1/3 aralığında tutulur. Daha büyük boyutlarda partikül içeren lateksler için 1/1 oranı daha uygundur. Emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı için optimum etkinliğin gözlemlendiği bir sıcaklıkta çalışılması gerekir. Karıştırma öncelikle monomer ve diğer bileşenlerin uygun dağıtılması için gereklidir. Karıştırma hızının artmasıyla polimerizasyon reaksiyon hızı artar, ortalama molekül ağırlığı azalır (Pişkin, 1987).

Emülsifiyon yapıcı maddeler dört grupta incelenebilirler: Anyonik, katyonik, amfoterik ve iyonlaşmayan emülsifiyon yapıcılarıdır. Emülsiyon polimerizasyonunda suda çözünen başlatıcılar kullanılır. Bunlar organik veya

inorganik peroksitler, diazo bileşikleri ve çeşitli redoks başlatıcılardır. Başlatıcı türü ve konsantrasyonu polimerizasyon hızını, dolayısıyla polimerleşme derecesini etkiler. Genellikle, başlatıcı konsantrasyonunun artmasıyla polimerleşme hızı artar, ortalama molekül ağırlığı düşer (Fried, 2003).

2.1.4.5. Dispersiyon polimerizasyonu

Mikron boyutunda tek düze lateks partiküllerin tek basamakta üretimi için dispersiyon polimerizasyonu olarak adlandırılan yöntem Barret tarafından geliştirilmiştir (Barret, 1975). Dispersiyon polimerizasyonu, monomerin organik bir dağıtma ortamı içerisinde çözünmesi ile yürütülen bir polimerizasyon yöntemidir (Corner, 1981; Almong, et al., 1980; Cawse, et al., 1997). Bu polimerizasyon yöntemi ile 1-10 µm aralığında monodispers polimerik partiküller elde edilmektedir. Bu yöntemde kullanılan başlatıcı, monomer fazı içinde çözünebilme özelliğine sahiptir. Başlangıçta tek fazlı olan polimerizasyon sistemi, katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamı içeren iki fazlı yapıya ulaşmaktadır. Aşağıdaki faktörlerin partikül boy ve boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Almong, et al., 1980).

- Başlatıcı türü ve derişimi,
- Dağıtma ortamı türü ve derişimi,
- Stabilizör türü ve derişimi,
- Monomer/dağıtma ortamı oranı,
- Polimerizasyon sıcaklığı,
- Karıştırma hızı ve türü.

Polimerizasyon sisteminde başlatıcı miktarının artırılması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında artış olduğu saptanmıştır (Ober and Hair, 1987). Başlatıcı derişiminin artırılması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalının oluşmasıyla açıklanmaktadır. Elde edilen polimerin molekül ağırlığında ise artan başlatıcı miktarı ile belirgin bir azalma gözlenmiştir. Molekül ağırlığındaki bu azalma daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısılması ile açıklanmaktadır (Ober and Hair, 1987; Tuncel, et al., 1993).

Dispersiyon polimerizasyonunda ortalama boy ve boy dağılımını etkileyen bir diğer önemli parametre, dağıtma ortamı türü ve bileşimidir. Dispersiyon polimerizasyonunda temel amaç, mümkün olduğunca dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Kullanılan dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü partiküllerin boyutunu ve boy dağılımını önemli ölçüde etkiler. İdeal olarak seçilen bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, oluşan polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir (Paine, et al., 1990; Cawse, et al., 1997). Artan monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı ile sonuç partikül boyutu genelde artış gösterir. Ancak bu oranın aşırı artışı ile sonuç partiküllerde önemli oranda boy dağılımı meydana gelmektedir (Lok, et al., 1985).

Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde dağıtma ortamında çözülebilen ve genellikle polimerik yapıda olan stabilizörler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda stabilizör derişiminin artırılması ile elde edilen polimerik partiküllerin boylarının azaldığı gözlenmiştir (Paine, et al., 1990; Cawse, et al., 1997). Sıcaklığın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda 55-80 °C aralığında artan polimerizasyon sıcaklığı ile ortalama partikül boyutu ve boy dağılımında artış olduğu gözlenmiştir. Artan sıcaklık ile polimerin molekül ağırlığında önemli bir azalmanın olduğu saptanmıştır (Ober, et al., 1985).

Tipik bir dispersiyon polimerizasyonu sisteminde başlangıçta tek bir faz vardır ve bu faz çözünmüş halde başlatıcı, monomer ve sterik stabilizör moleküllerini içerir. Isıtma ile başlatıcı bozunur ve serbest radikaller çözünmüş monomer molekülleri ile reaksiyona girerek oligomerik radikalleri oluşturur. Polimerizasyon ortamı olarak polimeri çözmeyen çözücüler seçildiği için, bu oligomer zincirleri belli bir kritik uzunluğa ulaşınca, bu uzunluk seçilen ortamın çözücülük özelliğine bağlıdır, çözünmez hale geçer. Bu şekilde polimerizasyonda bir faz ayrımı meydana gelir ve bu olaya çekirdeklenme adı verilir.

Dispersiyon polimerizasyonunda partikül oluşumu iki ana başlıkta incelenebilir; çekirdek oluşumu ve çekirdeklerin birleşmesidir. Oligomer zincirlerin belli bir uzunluğa ulaşması ile oluşan çekirdekler kararsızdır ve birbirleri ile birleşerek topaklar oluştururlar. Bu aşamada, sürekli fazda çözünmüş halde bulunan stabilizörler bu topaklar üzerine adsorbe olarak kararlı partikül çekirdeklerinin oluşmasını sağlar.

Yeterli sayıda kararlı partikül oluştuktan sonra sürekli fazda oluşan oligoradikaller veya kararsız çekirdekler bu partiküller tarafından yakalanır. Bu aşamada başka partiküller oluşmaz ve partikül oluşum aşaması tamamlanır. Çekirdek oluşum prosesi ile meydana gelen primer partiküller monomer ve polimerizasyon ortamı ile şişmiş durumdadır. Polimerizasyon bu aşamadan sonra bu partiküller içinde devam eder ve 1-10 µm aralığında tek düze partiküller oluşur (Tuncel, et al., 1997).

Dispersiyon polimerizasyonu sistemlerinde genelde düşük karıştırma hızları ile çalışılmaktadır. Özellikle monodispers partiküllerin eldesine yönelik çalışmalarda karıştırma hızı, polimerizasyon ortamında homojen bir ısı transfer rejimi elde edilebilecek düzeyde tutulmaktadır. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğın bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olmaktadır.

2.1.4.6. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemleri

Son yıllarda özellikle polimerik formdaki HPLC kolon malzemesi üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenmesinin silika bazlı malzemelere göre kolay olması, partikülün türevlendirme işleminin daha kolay yapılabilmesi, geniş pH aralığında kimyasal kararlılık, afinite kromatografisi, büyüklükçe ayırma kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi uygulamalar için daha uygun yapıya sahip olması çalışmaların son yıllarda polimerik malzemeler üzerine yoğunlaşılmasını sağlamıştır (Ellingsten, et al., 1990; Galila, et al., 1994).

Monodispers gözenekli partiküller varlığında kolonda oluşan düzenli akış profili nedeniyle yüksek kromatografik ayırma yeteneğı elde edilebilmektedir. Bu partiküllerin üretim yöntemleri genellikle "çok basamaklı polimerizasyon" adı altında toplanmaktadır. Bu küreler farklı fonksiyonel grupları içerecek şekilde sentezlenebilmektedirler (Ellingsten, et al., 1990; Galila, et al., 1994; Svec, et al., 1996; Hossoya, et al., 2001). Büyük boyutlu ve çapraz bağılı formda makrogözenekli monodispers polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili ilk çalışmalar Ugelstad tarafından yapılmıştır (Ellingsten, et al., 1990).

Bu çalışmada 1-100 µm boyut aralığındaki gözenekli eş boyutlu partiküller, stirenin emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Elde edilen partiküller ilk önce dodesil klorür ya da dibütiftalat gibi düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan ile şişirilmiştir. İkinci basamak şişirme prosesi, monomer ve çapraz bağlayıcı içeren monomer faz emülsiyonunda yapılmıştır. Polimerizasyon 80 °C'de ve Na₂S₂O₈'in başlatıcı olarak kullanıldığı ortamda gerçekleştirilmiştir. İnert organik bileşen ve monomer fazında şişirilen polistiren partikül yapısı içinde polimerizasyon gerçekleştirilerek ortalama boyutu 5 µm olan monodispers partiküller elde edilmiştir.

İki basamaklı polimerizasyon yöntemi kullanılarak monodispers ve büyük boyutlu partiküllerin çapraz bağlı formda eldesi amacıyla bir diğer yöntem Okuba ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Okuba, et al., 1992). Dinamik şişime yöntemi adı verilen bu yöntemle, dispersiyon polimerizasyonu ile 1,9 µm boyutunda monodispers polistiren partiküller üretilmiştir. Partiküllerin şişirilmesi sulu ortamda başlatıcı içeren divinilbenzen ile yapılmıştır. İşlem homojen formda olan ve divinilbenzen içeren etanol-su ortamında başlamaktadır. Şişme ortamına bir enjeksiyon pompası kullanılarak sürekli sabit hızla su beslemesi yapılmaktadır. Böylece dağıtma ortamının polaritesi zamanla artırılmaktadır. Divinilbenzen dağıtma ortamından ayrılarak monodispers partiküllerin geçişi sağlanmaktadır. Şişirme işlemi sonrasında ikinci basamak polimerizasyonunda divinilbenzen partiküller içinde polimerleştirilmekte, 4,3 µm boyutunda ve çapraz bağlı partiküller elde edilmektedir. (Okuba, et al., 1992)

Monodispers ve makrogözenekli formda partikül sentezine yönelik çok basamaklı polimerizasyon yöntemlerinden biri de Cheng ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Cheng, et al., 1992a; Cheng, et al., 1992b). Bu yöntem dört temel basamaktan oluşmaktadır.

1. Monodispers çıkış lateksinin sentezi,
2. Lateksin porojen ve monomer karışımı ile şişirilmesi,
3. Monomer yapının şişmiş yapıdaki partiküller içerisinde polimerizasyonu,
4. Elde edilen yapının polistiren için iyi bir çözücü olarak bilinen bir çözücüyle ekstraksiyonu ile stabil gözenek yapısının elde edilmesi (Cheng, et al., 1992a; Cheng, et al., 1992b).

Kromatografik uygulamalara yönelik makrogözenekli monodispers partiküllerin sentezi için başka bir yöntem de Frechet ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Wang, et al., 1994; Galila, et al., 1994). Bu yöntemde 1,1 µm boyutundaki monodispers polistiren çıkış partikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile üretilmiştir.

İki basamaktan oluşan bu yöntemde, çıkış partikülleri ilk basamakta lauril sülfat içeren sulu ortamda emülsifiye edilmiş dibütilftalat ile oda sıcaklığında şişirilmiştir. İkinci basamak şişirme işleminde ise öncelikle hacimce % 50 stiren ve % 50 divinilbenzen içeren monomer karışımı dibütilftalat ile birlikte yine lauril sülfatın sulu çözeltisinde dağıtılmıştır. Bu monomer karışımının içerisinde repolimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit de bulunmaktadır.

İlk basamak şişirme işleminde elde edilen ve dibütilftalat içeren polimerik partiküller, ikinci basamakta hazırlanan emülsiyon ile tekrar oda sıcaklığında etkileştirilmiştir. Organik fazın tamamının partiküllere transfer olmasının ardından elde edilen süspansiyon ortamına stabilizör olarak polivinil alkol ve ikinci basamak polimerizasyonunda yeni partikül oluşumunu engellemek için suda çözünen inhibitör olarak sodyum nitrat eklenmiştir.

Monomer karışımının dilüent varlığında partiküllerin içerisinde polimerizasyonu ile 7,4 µm boyutundaki monodispers partiküller çapraz bağlı formda sentezlenmiştir. Partiküller toluen ile ekstrakte edilmiş ve gözenekli yapının oluşması sağlanmıştır (Wang, et al., 1994; Galila, et al., 1994).

2.1.5. Sentetik polimerlerin kimyasal modifikasyonları

Birçok durumda, polimerler biyouyumluluk, yangın geciktiricilik veya yapışma gibi bazı özellikleri geliştirmek veya belirli fonksiyonel grupları sağlamak için iyon-değişimi veya diğer uygulamalarda kimyasal olarak modifiye edilir. Örneğin, bromlama bazı polimerlere yangın geciktirme özelliği katmak amacıyla bazen kullanılır.

Bir başka örnek olarak, polivinil klorürün yumuşama sıcaklığını arttırmak veya diğer polimerler ile karışma özeliğini geliştirmek için, polimerizasyondan sonra klorlanabilir. Bazı durumlarda, önemli ticari polimerler sadece öncü polimerlerin kimyasal modifikasyonları ile üretilebilirler (Fried, 2003).

2.2. Adsorpsiyon

Bir katının veya sıvının içindeki iyonlar, atomlar veya moleküller arası kuvvetler, etraflarındaki diğer iyonlar veya moleküller tarafından sarılarak bir denge kurulduğu halde yüzeydeki kuvvetlerin bir kısmı serbest bulunmaktadır. Bu sebeple katı ve sıvı yüzeyleri, değmekte oldukları gaz ve sıvıları yüzeylerine çekerler. Bu şekilde katı veya sıvı yüzeyinde maddelerin tutunmasına adsorpsiyon denir.

Yüzeyde tutulan maddeye adsorplanan, yüzeyine çeken maddeye de adsorplayan veya adsorplayıcı denilmektedir. Bir olayın adsorpsiyon mu yoksa absorpsiyon mu olduğu şüpheli ise sorpsiyon terimi kullanılır. Adsorpsiyon, adsorplanan ve adsorplayıcının tabiatına, sıcaklığa ve adsorplanan maddenin konsantrasyonuna veya basıncına geniş ölçüde bağlıdır. Başlıca iki tip adsorpsiyon söz konusudur:

- Fiziksel veya Van der Waals adsorpsiyonu,
- Kemosorpsiyon veya aktiflenmiş adsorpsiyon.

Fiziksel adsorpsiyon sırasında atom, molekül, iyon şeklinde olabilen adsorplanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında uzun mesafeli fakat zayıf olan Van der Waals çekim kuvvetleri etkindir. Kimyasal adsorpsiyon sırasında ise tanecikler ile yüzey arasında bir kimyasal bağ ve genellikle de kovalent bağ oluşmaktadır. Kimyasal adsorpsiyon tek tabakalı yani monomoleküler olabildiği halde, fiziksel adsorpsiyon tek tabakalı ya da çok tabakalı olabilmektedir. Ayrıca çoğu fiziksel adsorpsiyonlar tersinir olarak yürütülebildiği halde kimyasal adsorpsiyonlar yürütülemez.

Fiziksel adsorpsiyon düşük sıcaklıklarda herhangi bir adsorplayıcı-adsorplanan ikilisine bağlı olarak meydana gelebilir. Kimyasal adsorpsiyon ikili sistemin türüne, ikili arasında özel bir kimyasal ilgiye bağlıdır. Fiziksel adsorpsiyon oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşirken, kimyasal adsorpsiyonun hızı, aktifleşme enerjisine bağlıdır (Sarıkaya, 1997).Fiziksel adsorpsiyon, düşük adsorpsiyon ısı ile karakterize edilir ve bu denge çabuk kurulur. Adsorpsiyon dengesi tersinirdir. Kemosorpsiyonda ısı değişimi 20 kcal' den 100 kcal' ye kadar yükselen büyük değerler alır ve adsorbat yüzeye daha sıkı bağlanmıştır.

Katı yüzeyler sadece gazları değil, çözeltilerden çözülmüş maddeleri ve bazı hallerde çözücüyü de adsorbe ederler. Aktif kömür, asetik asit çözeltisi ile çalkalanırsa asetik asidin bir kısmı kömür tarafından tutulur ve çözeltide asetik asit konsantrasyonu düşer. Gazların katılar tarafından adsorpsiyonunda, adsorpsiyon şiddetli değilse, sadece katı ile gaz arasındaki kuvvetler rol oynar. Fakat çözeltilerin adsorpsiyonunda durum daha karışıktır. Adsorplayıcı yüzeyi çıplak kalmaz, ya çözücü ya da çözünen madde tarafından kaplanmıştır. Çözülmüş maddenin bir katı tarafından adsorplanabilmesi için; çözülmüş maddenin çözeltiden alınması, çözücünün katı yüzeyinden alınması ve çözülmüş maddenin yüzeye bağlanması gerekir. Durumu daha basitleştirmek üzere, yüzeyde çözücü ve çözülmüş maddenin tutunma rekabeti söz konusudur denilebilir.

Adsorpsiyon şiddetinin çözücünün bünyesine ne şekilde bağlı olduğu teorik olarak tamamen açıklanamamıştır. Fakat genel olarak bir çözeltide çözücünün adsorplanma kabiliyeti ne kadar büyükse çözülmüş madde o kadar az adsorplanır. Çözülmüş madde ile çözücü arasında aktif yerlerin işgal edilmesinde bir rekabet söz konusu olduğundan birisi ne kadar şiddetle adsorbe edilirse diğerine o kadar az yer kalır. Adsorpsiyon muhtelif metotlarla ölçülür. Başlıca iki metot önemlidir.

- Direkt metot; adsorbe edilen miktar, adsorplayıcı deneyden önce ve sonra tartılarak aradaki farktan hesaplanır.
- İndirekt metot; deneyden önce ve sonra adsorplanan maddenin basıncı veya konsantrasyonu ölçülür, aradaki fark adsorplanan miktarı verir.

Kromatik adsorpsiyon, çözeltilerdeki adsorpsiyonun önemli bir uygulama yeridir. Bu metodun prensipleri ilk defa M. Tswette (1906) tarafından verilmiştir ve önce renkli maddelere uygulanmasından bu adı almıştır. Bu metodun esası, verilen bir adsorplayıcının çözelti içinde bulunan değişik maddeleri farklı oranlarda adsorplamasına dayanır. Bir cam boru içine adsorplayıcı madde doldurulur ve muhtelif maddeleri ihtiva eden çözelti bu sütundan yavaşça akıtılırsa en kolay adsorbe olan madde sütunun yukarı kısmında ve daha az adsorbe olanlar sıra ile daha aşağıda olmak üzere sütunda alt alta tabakalar halinde adsorbe olurlar. Bu yolla karışımda bulunan maddeler kısmı olarak ayrılmış olur. (Üneri, 1969)

2.2.1. Adsorban seçimi

Bir adsorbanın seçiminde ilk olarak dikkat edilen özellik, ayrılan veya saflaştırılan kimyasal sistemlerin denge izotermidir. Denge verileri, ilgili sıcaklık ve basınç aralıkları için gereklidir ve adsorplayıcı satıcısı tarafından sağlanmıyor ise, deneysel olarak elde edilmelidir. Saf türlerin izotermi, belirli bir ayırma için bir adsorbanın uygunluğunu gösterir fakat birden çok tür adsorplanıyorsa sonuçları yorumlarken dikkatli olmak gerekir. Eğer denge verileri, bir adsorbanın istenilen ayırma işlemi için uygun olduğunu gösteriyorsa, kinetik özelliklerin uygun olup olmadığının da belirlenmesi gereklidir. Denge etkisinden dolayı birçok ayırma işlemi etkili olsa bile, adsorbanların fiyatlarının uygun olması ve uygun saflıkta olmaları sağlanmalıdır. Başlıca adsorban çeşitleri şunlardır: Silika jel, aktif alümina, karbonlar, zeolitler, polimer ve reçineler, killer (Crittenden, et al., 2004).

2.2.2. Polimerik adsorbanlar

İyonik olmayan, sentetik polimerlerin geniş bir aralığı özellikle analitik kromatografi uygulamaları için mevcuttur. Endüstriyel kullanımlar için, tanecik formunda ticari olarak uygun reçineler (genellikle 0,5 mm çapında) çoğunlukla stiren/divinilbenzen ve akrilik asit esterleri/divinilbenzen kopolimerlerine dayanır ve çeşitli yüzey polaritelerine sahiptirler. İlgili monomerler, monomerleri çözen fakat polimerler için zayıf bir şişirme ajanı olan çözücü içerisinde emülsiyon polimerizasyonu ile polimerleştirilir. Bu işlem polimer matrisi oluşturur.

Polimerlerin yüzey alanları $750 \text{ m}^2/\text{g}$ 'a kadar yükselebilir. Seçici adsorpsiyon özellikleri; matrisin yapısından, kontrollü gözenek boyutu dağılımından, yüksek yüzey alanlarından ve kimyasal yapısından elde edilir. Polimerik adsorbanların uygulamaları, sulu çözeltilerden; fenol, benzen, toluen, klorlu organikler, PCB (poliklorlu bifeniller), zirai ilaç, antibiyotik, aseton, etanol, deterjan, emülgatör, boya, steroid, amino asitler, vb. gibi geniş bir aralığa sahip çözünen maddelerin ayrılmasını içerir. Buhar desorpsiyonu, çözücü elüsyonu, pH değişikliği ve kimyasal ekstraksiyon içeren çeşitli metotlarla yenileme etkili olabilir (Crittenden, et al., 2004).

Farklı kimyasal yapı ve polariteye sahip bir dizi makro gözenekli metakrilat sorbenti, polarite ve gözenekli yapının sulu çözeltilerden organik bileşiklerin

sorpsiyonu üzerindeki etkisini incelemek için hazırlanmıştır. Laboratuvar ve ticari örneklerle, farklı gözenekli yapının ve polaritenin gözenekli kopolimerleri tarafından organik bileşiklerin sorpsiyonu karşılaştırılmıştır. Organik adsorbatların polimer adsorbanlar üzerindeki adsorpsiyon izotermi kesikli metot ile belirlenmiştir.

Fiziksel adsorpsiyon, adsorbanın kolay desorpsiyon ve yenilenmesinden dolayı tercih edilir. Adsorplanan-adsorban etkileşiminin en bilinen tipi, belirli olmayan etkileşim (Van der Waals) ve belirli etkileşimlerdir (Keesom kuvvetleri – yönelim kuvvetleri, Debye kuvvetleri – indüksiyon kuvvetleri). Bundan dolayı, sudan organik bileşiklerin sorpsiyon ile ayrılmasında en etkili olan hidrofobik adsorbanlardır. Stiren-divinilbenzen, metakrilat adsorbanından daha yüksek miktarda mikro gözenekler ve spesifik yüzey alanı değerleri göstermiştir. Genellikle, polimerdeki mikro gözeneklerin miktarının artması ile adsorpsiyon kapasitesi artar. Adsorplananın lipofilitesi (yağ severliği) artarken, sudan adsorplanma miktarı da artmıştır. Polimer adsorbanlar, karbonlu adsorbanlara göre, organik bileşiklerin sorpsiyonu ve desorpsiyonunda daha üstündür. Adsorpsiyon kapasitesi, adsorplanan maddenin polaritesinin artmasıyla artar (Mota, et al., 2006).

2.2.3. Desorpsiyon ve adsorbanların yenilenmesi

Belli uygulamalarda, atık olarak tanımlanabilecek adsorbanı kullandıktan sonra atmak ekonomik olabilir. Şüphesiz adsorbatların konsantrasyonu ve yapısı bertaraf yolunu etkileyecektir. Adsorban maliyetinin düşük ve yenilenmesinin çok zor ve de adsorptif ayırma işleminin adsorplamayan ürünlerinin yüksek değere sahip olduğu durumlarda adsorban bertarafı avantajlı olacaktır. Proses uygulamalarının çoğunluğunda, atık olarak adsorbanın bertarafı ekonomik bir seçenek değildir ve bu nedenle adsorbanın yeniden kullanılabilmesi yeterli ölçüde yenileme, ya yerinde ya da adsorpsiyon tankının dışında gerçekleştirilir. Desorpsiyon ve yenilemenin pratik metotları, aşağıdakilerin bir veya daha fazlasından oluşan bir kombinasyonu içerir:

- Sıcaklıktaki artma,
- Konsantrasyonda azalma,
- İnert bir sıvı ile arıtma,
- Daha güçlü bir adsorplama türü ile yer değiştirme,
- pH gibi kimyasal bir koşulun değişimi (Crittenden, et al., 2004).

2.2.4. Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon olayı bir denge reaksiyonuna benzer. Sürücü güç, adsorban yüzeyindeki adsorplanan katı madde konsantrasyonu ile dengede olan sıvıdaki çözünmüş madde konsantrasyonu arasındaki farktır. Adsorpsiyon ilk başladığı anda yüzeyde adsorplanan madde bulunmayacağından sürücü güç maksimumdur ve adsorpsiyon hızı yüksektir. Çözelti belirli miktarlarda adsorplayıcı madde ile temas ettirildiğinde, çözeltideki adsorplanan maddenin konsantrasyonu adsorplayıcı yüzeyinde bulunan madde miktarı ile dengeye gelene kadar azalır. Adsorpsiyon dengesi kurulduğunda, adsorplanan maddenin çözelti fazındaki konsantrasyonu sabit kalır. Bu andan itibaren adsorpsiyon dengesi kurulmuş olur.

Genellikle birim adsorplayıcı madde başına adsorplanan madde miktarı, sabit sıcaklıkta bu maddenin çözelti fazındaki konsantrasyonunun fonksiyonudur. "Adsorpsiyon izotermi" denen sonuç fonksiyon, sabit sıcaklıkta dengede çözelti fazında kalan çözünen konsantrasyonuna karşı birim adsorplayıcı madde başına adsorplanan madde miktarının grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Adsorpsiyon proseslerini açıklamak için en yaygın olarak kullanılan izotermi Henry, Freundlich, Langmuir ve BET izotermidir (Metcalf, et al., 1972).

2.2.4.1. Henry yasası

Sabit sıcaklıkta gazların sıvılardaki çözünürlüklerinin basınçla değişimi deneysel olarak ilk kez İngiliz kimyacı William Henry (1775-1836) tarafından incelenmiştir. Seyreltik çözeltilerde mol kesri yerine molalite ya da molarite alınarak Henry yasası tanımlanmaktadır. Bu durumda adsorplanmış miktarın doğrudan denge çözelti konsantrasyonu ile değişimini gösteren en basit adsorpsiyon izotermi olan Henry yasası şu şekilde ifade edilebilir:

$$q_e = K_H C_e \quad (2.1.)$$

Burada q_e , dengede katı yüzeyinde adsorplanmış madde miktarı (mol/g); C_e , dengede adsorbatın çözelti fazındaki miktarı (mol/L) ve K_H , Henry sabitidir ve birimsizdir (Sarıkaya, 1997).

2.2.4.2. Freundlich izotermi

Çözeltiden adsorpsiyon için olduğu kadar gazların adsorpsiyonu için de başarılı bir şekilde kullanılan bir izotermdir (Özdemir, 2005; Türkyılmaz, 2005).

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (2.2.)$$

K_F ve n , Freundlich sabitleri olup adsorban ve adsorbatın yapısına ve sıcaklığa bağlı deneysel sabitlerdir. Yukarıdaki denklemin her iki tarafının doğal logaritması alınır,

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (2.3.)$$

elde edilir. $\ln q_e$ 'nin $\ln C_e$ 'ye karşı eğrisi düz bir doğru verecektir. Doğrunun eğiminden n ve kayım değerinden K_F hesaplanır. $1/n$, heterojenite faktörüdür ve 0-1 aralığında değişen değerler alır. Yüzey ne kadar heterojense, $1/n$ değeri o kadar sıfıra yakın olur (Kalay, 2006).

2.2.4.3. Langmuir izotermi

Bu izoterm, Irving Langmuir (1918) tarafından bazı varsayımlar yapılarak geliştirilmiştir. Langmuir izotermi fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon için düşük basınçta ve bir dereceye kadar yüksek sıcaklıklarda kabul edilir. Bu izoterme göre:

- Katı yüzeyinde bir adsorbatın adsorpsiyonu tek tabaka adsorpsiyonu ile sınırlıdır.
- Katı yüzeyi homojendir yani adsorbat molekülü için her bağ noktasının afinitesi aynıdır.
- Adsorplanmış moleküller arası etkileşim söz konusu değildir.
- Adsorplanmış moleküller lokalize olmuştur yani bu moleküller katı yüzeyi etrafında hareket edemezler.

Çözeltideki moleküllerin dinamik dengede olduğu farz edilirse aşağıdaki reaksiyon yazılabilir.



Burada k_a ve k_d , sırasıyla adsorpsiyon ve desorpsiyon hız sabitleridir.

Adsorpsiyonda birbirine ters iki olay düşünülebilir. Adsorbanın yüzey alanı $S_{yüzey}$ ve adsorbat tarafından kaplanan kesir θ ile gösterilirse, adsorpsiyondan dolayı yüzey örtülmesinin değişim hızı, adsorbat tarafından kaplanmış kesir $(1-\theta)$ ve çözeltinin konsantrasyonu (C_e) ile orantılı olacaktır.

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a(1 - \theta)C_e \quad (2.5.)$$

Desorpsiyondan dolayı değişim hızı adsorplanmış kesir (θ) ile orantılı olacağından,

$$\frac{d\theta}{dt} = k_d\theta \quad (2.6.)$$

yazılabilir. Yukarıdaki eşitliğe göre, desorpsiyon hızı konsantrasyondan bağımsız, fakat θ 'ya bağlı olacaktır. Dinamik dengede bu iki olayın hızı birbirine eşit olacağından:

$$k_a C_e (1 - \theta) = k_d \theta \quad (2.7.)$$

yazılabilir. Bu eşitlikte $K = k_a/k_d$ yazılır ve düzenlenirse:

$$\theta = \frac{KC_e}{1+KC_e} \quad (2.8.)$$

elde edilir. Burada K , adsorpsiyon denge sabitidir. Adsorbanın birim kütlesi başına adsorplanan miktar:

$$q_e = q_m \theta \quad (2.9.)$$

ile verilir. θ 'nın değeri yerine yazılır ve düzenlenirse,

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2.10.)$$

elde edilir. Burada q_m , adsorbanın tek tabaka kapasitesidir (mol/g). Bu eşitlik Langmuir eşitliği olarak bilinir. C_e/q_e 'nin C_e 'ye karşı eğrisi, eğimi $1/q_m$ ve ekstrapolasyonu $1/q_m K$ olan düz bir doğru verecektir (Hunter, 1999; Kalay, 2006).

2.2.4.4. BET izotermi

Brunauer, Emmett ve Teller tarafından geliştirilen BET izotermi, çok tabakalı adsorpsiyon prosesinin açıklanabilmesi için, Langmuir izotermine göre daha kullanışlıdır.

Bu model, adsorban yüzeyinde birden fazla adsorplanmış tabaka oluştuğunu varsaydığından Langmuir izoterminin her bir tabakaya uygulanış şeklidir. BET izotermini aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$\frac{C_e}{q_e(1-C_e)} = \frac{1}{q_m c} + \frac{(c-1)}{q_m c} C_e \quad (2.11.)$$

Eş.2.11'e göre $\frac{C_e}{q_e(1-C_e)}$ 'nin C_e 'ye karşı eğrisi, eğimi $(c-1)/(q_m c)$ ve ekstrapolasyonu $\frac{1}{q_m c}$ olan düz bir doğru verecektir. Adsorplama gücünün bir ölçüsü olan c sabiti,

$$c \approx \exp\left[\frac{(q_1 - q_L)}{RT}\right] \Rightarrow c = e^{(q_1 - q_L)/RT} \quad (2.12.)$$

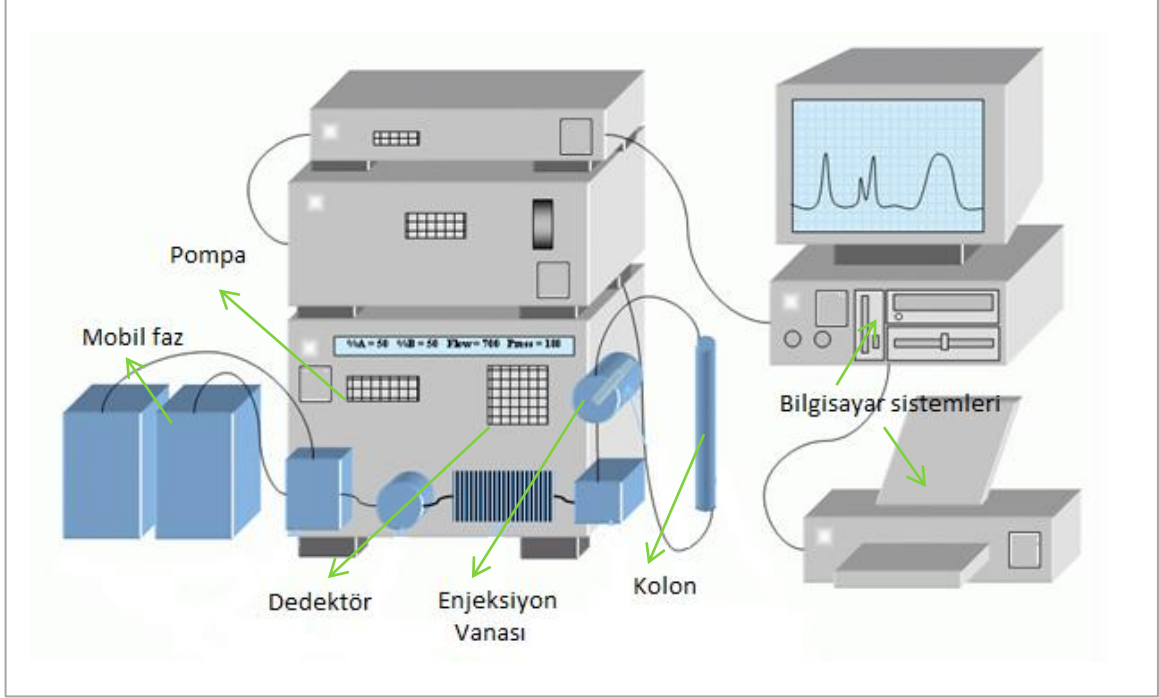
olarak verilmektedir. Buradaki q_1 , birinci tabakanın adsorpsiyon ısısını (kJ/mol), q_L adsorplanan maddenin yoğunlaşma ısısını (kJ/mol); ve $q_1 - q_L = q$ net adsorpsiyon ısısını (kJ/mol) göstermektedir. Yoğunlaşma ısısı belli olduğundan c sabitinden son bağıntı yardımıyla birinci tabakanın q_1 adsorpsiyon ısısı bulunur. Yüzeyin adsorplama gücü yüksek olduğunda q_1 çok büyük olacak ve q_L sabit olduğuna göre son bağıntı uyarınca c sabiti de çok yüksek olacaktır. Bu durumda BET denkleminde göre çizilen doğru merkezden geçer ve bu doğrunun eğimi $1/q_m$ olur (Özdemir, 2005; Kalay, 2006).

2.3. Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi, (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Bir karışımda bulunan iki ya da daha fazla maddenin, sabit faz ve hareketli faz arasında gerçekleşen kütle aktarımı ile birbirinden ayrılabilmesini sağlayan ayırma tekniklerine kromatografik yöntemler adı verilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir biçimde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça hassas bir kromatografik yöntemdir.

Sıvı kromatografisi 1900'lü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmıştır. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır.

Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi önemlidir ve çözülmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki hareketsiz dolgu malzemesi olarak tanımlanır. Çözülmüş bileşenler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim, sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir (Meyer, 2010).



Şekil 2.1. HPLC sisteminin şematik gösterimi.

Şekil 2.1'de görüldüğü gibi HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar sistemlerinden oluşmaktadır. Ayırmanın gerçekleştiği kolon, bu sistemin önemli bir bölümüdür. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir (Cazes, 2010).

Mobil faz ve bileşimi, HPLC uygulamalarında kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan mobil fazların ortak özellikleri; yüksek derecede saflık, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, dedektör ile uyumluluk ve uygun fiyata sahip olmasıdır. Her bir HPLC türünde kullanılan mobil fazlar farklı özelliklere sahiptirler.

İyon değişim kromatografisi (Ion Exchange chromatography, IEC), afinite kromatografisi (Affinity Chromatography, AC) ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) sürekli faz olarak genellikle farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltileri kullanılır.

Mobil faz olarak, ters-faz sıvı kromatografisinde (Reversed Phase Chromatography, RPC) su ve asetonitril karışımı gibi polar, normal-faz sıvı kromatografisinde (Normal Phase Chromatography, NPC) apolar çözücü karışımları kullanılır. Büyüklükçe ayırma kromatografisinde (Size-exclusion Chromatography, SEC) ise kullanılan çözücü polimer örneğini çözebilen fakat dolgu malzemesi ile kimyasal etkileşime girmeyen bir çözücü olmalıdır. Bu durum, doğru molekül ağırlığı tayininde çok önemlidir (Ünsal, 2006).

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorban çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbanları geniş yüzey alanına sahip, küçük ve katı yapıdaki partiküllerdir. Adsorban özellikleri; olabildiğince eş boyutlu ve ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı, 3-10 μm partikül boyutu, 70-300 Å gözenek boyutu, 50-250 m^2/g yüzey alanına sahip olmalıdır. Kolon dolgu malzemesi olarak üretilen partiküllerin kolon içersine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi yüksek basınçlı pompalar ile sağlanır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın daha da artırılması gerekir.

Tipik HPLC kolonları 2-30 cm aralığında uzunluğa sahip, mikron boyutlu partikül içeren (1-10 μm) ve iç çapı 2-10 mm arasında olan yüksek basınca (400 atm) dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir.

Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorban, floresansemisyon ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi, UV absorban dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190-600 nm aralığında analiz mümkün olmaktadır.

İdeal bir dedektör; yüksek duyarlılık, hızlı tepki, minimum pik yayılması, düşük sinyal gürültüsü, ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı, çalışma kolaylığı ve genişliği gibi özelliklere sahip olmalıdır.

HPLC günümüzde, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları; bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

- **Bileşen ayırma:** Her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır.
- **Saflaştırma:** Hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir. Bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür.
- **Tanımlama:** HPLC'de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir.

Derişim tayini: HPLC'de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC'ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur.

HPLC'de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

- **İzokratik elüsyon:** Kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

- **Gradient elüsyon:** Sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu malzemesi yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır (Ünsal, 2006).

2.3.1. Büyüklükçe ayırma kromatografisi

Büyüklükçe ayırma kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC), herhangi etkileşim olayları yerine basit bir molekül büyüklüğü sınıflandırmanın yapıldığı ve temelde diğer tüm kromatografik metotlardan farklı olan bir kromatografi çeşididir. Kolondaki sabit faz partiküllerinin gözeneklerine difüzlenebilecek kadar büyük olan örnek moleküller, kolonu terk ederler.

Gözenekli bir malzeme kolon dolgu malzemesi olarak kullanılır. Örnek moleküller ve kolondaki partiküller arasında hiçbir etkileşim yoktur. İkincisi, moleküller mümkün olan en kısa sürede kolon boyunca hareketli faz sayesinde taşınırlar. Ancak partiküllerde var olan gözeneklere nüfuz edebilen küçük moleküller var ise, hareketli faz bu durum için elverişlidir. Hareketli faz gözeneklerde hareketsizken, difüzyon sadece moleküllerin sızıp akabileceği yönde olur (Meyer, 2010).

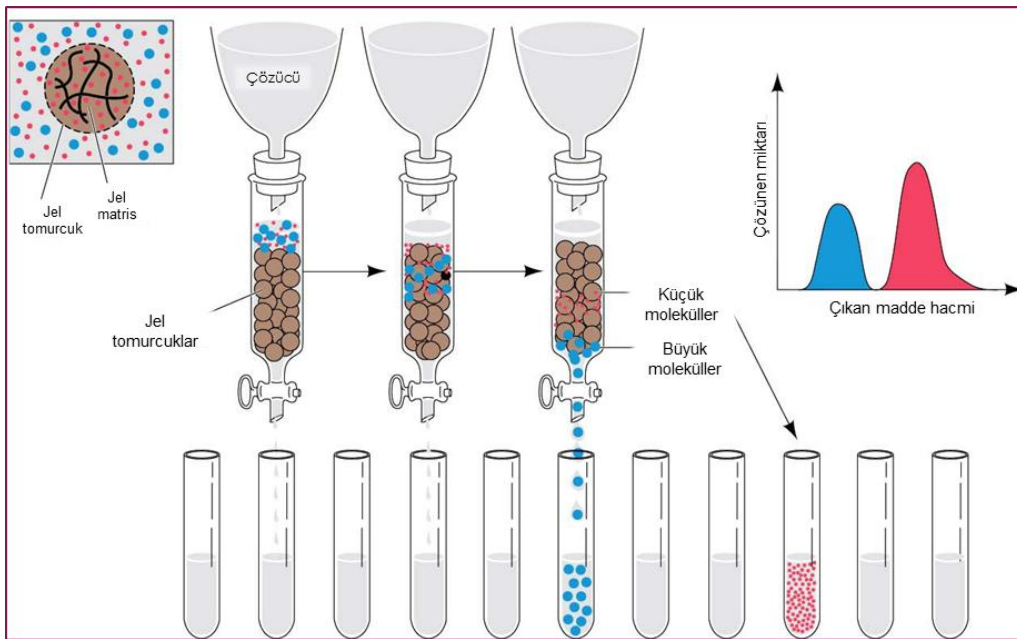
Jel filtrasyon kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) olarak da bilinen bu teknik, yaygın olarak lineer polimerlerin molekül ağırlıklarının ve molekül ağırlığı dağılımlarının (polidispersite indeksi) tespit edilmesinde kullanılır. Ayrıca molekül ağırlığı bilinen polimerik standartlarla SEC dolgu malzemesinin gözeneklilik özelliklerinin belirlenmesinde ikincil yöntem olarak kullanılır.

SEC için dolgu malzemesi, çözücü ve çözünenin içerisinde difüzlenebileceği monodispers, farklı boyuttaki gözeneklere sahip, küçük (5-10 µm) silika veya polimerik partiküllerdir. SEC'de analitler moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Oldukça gözenekli dolgu malzemesi içerisinde sürekli faz ile taşınan analit sürekli fazdan ayrılarak gözeneklere difüzlendirirler. Gerek gözenekler içerisindeki ve gerekse partiküller arasındaki alıkonma sürelerinin toplamı o analitin kolondan çıkış süresine eşittir. Bu adsorban özelliğine sahip gözenekli polimerik partiküllerin çevresinde akış hızlıdır. Gözenek boşluklarında ise akış oldukça yavaştır ve gözenek duvarlarının büyüklüğüne bağlıdır.

Gözeneklerdeki alıkonma süresi analiz edilen molekül büyüklüğüne bağlıdır. Gözeneklere göre daha küçük çapta olan moleküller gözenekler içerisindeki labirentlere doğru difüzlendikleri için kolon içinde daha düşük bir ortalama hıza sahiptirler. Ortalama gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise gözenek içerisine girmemektedirler. Dolayısı ile kolondaki alıkonma süresi daha az olmakta ve kolondan düşük molekül boyutuna sahip bir analite göre daha çabuk çıkmaktadırlar.

Sonuç olarak Şekil 2.2'de görüldüğü gibi en büyük moleküller kolondan ilk olarak, en küçük olanlar ise en sonda çıkmaktadır. Bu iki uç arasındaki analitler ise molekül büyüklükleri ile orantılı olarak bu iki süre arasında kolonu terk etmektedirler. SEC'de diğer yöntemlerin tersine analitle sabit faz arasında kimyasal bir etkileşim yoktur. SEC tamamen fiziksel bir eleme işlemidir. Alıkonma süreleri sadece molekül büyüklüğü ve gözenek yapısı ile ilgilidir (Ünsal, 2006).

- Enjekte edilen bütün moleküller, kolondan çıkar (istenmeyen adsorpsiyon etkisi olmadığı sürece).
- Alıkonma süresi kromatogramın tamamlandığını gösterir; dolayısıyla ayırma zamanı tahmin edilebilir.
- Elüsyonu hacmi veya zamanı sadece molekül boyutunun bir fonksiyonudur ve dolaylı olarak mol kütlelerini verir. Büyüklükçe ayırma kromatografisi mol kütleleri tayininde kullanılabilir (Meyer, 2010).

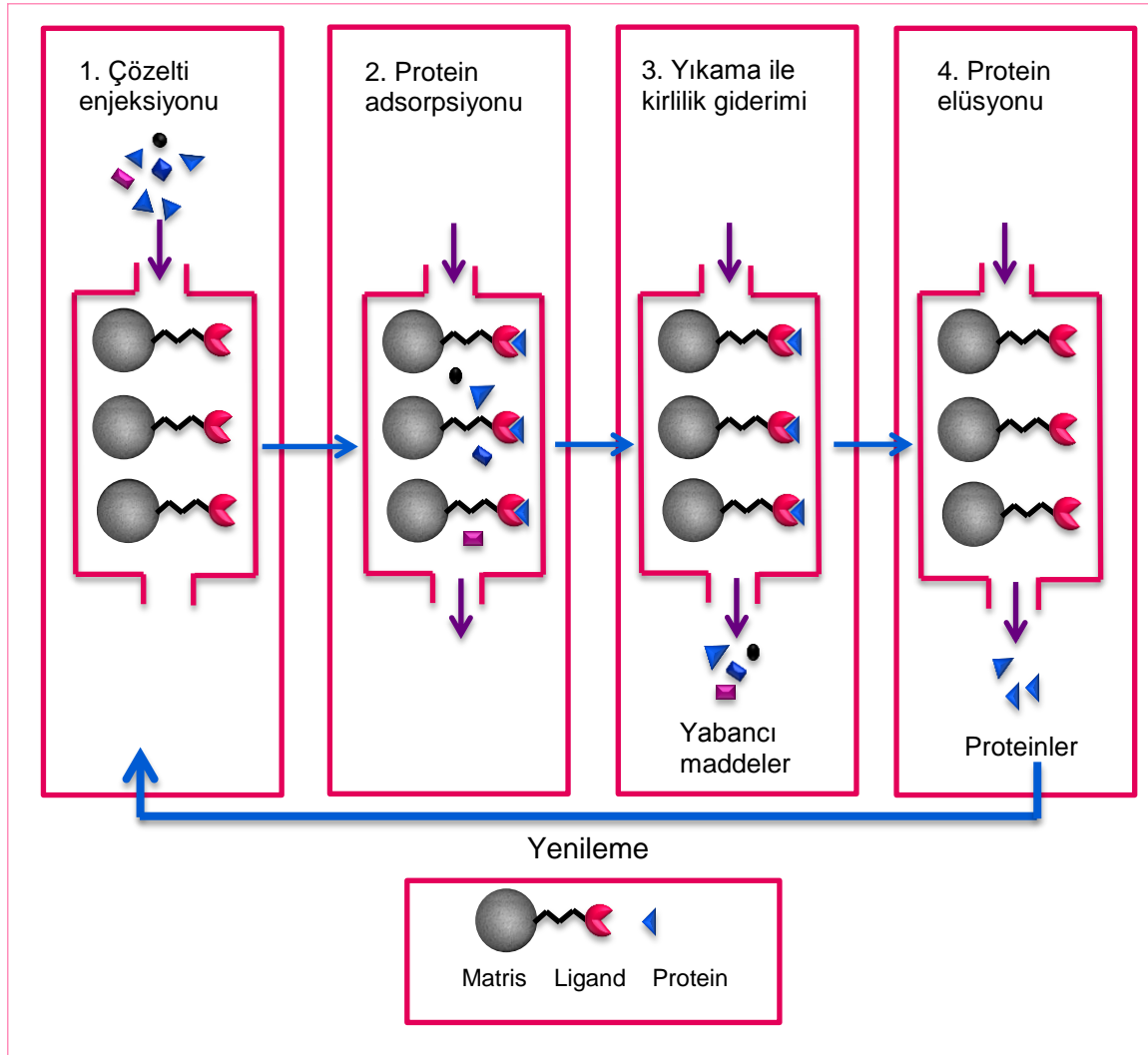


Şekil 2.2. SEC kolonunda ayırma mekanizması.

2.3.2. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi (Affinity Chromatography, AC) biyolojik olarak aktif veya yapısal olarak benzersiz moleküller ile tamamlayıcı moleküller arasındaki tersinir ve biyospesifik etkileşimlerin olduğu sıvı kromatografisinin bir çeşididir. Tamamlayıcı moleküller; biyolojik örneklerden hücre bileşenlerinin veya belirli makromoleküllerin seçici ekstraksiyonu, ayırması, saflaştırması, analizi veya belirlenmesi için kullanılırlar.

Afinite kromatografisi; matrislerin aktivasyonu, ligandların bağlanması, protein adsorpsiyonu, elüsyonu ve afinite matrisinin yenilenmesini içeren beş adımlı bir süreçtir. Şekil 2.3'te afinite kromatografisinin şematik gösterimi verilmiştir. Birçok çalışmada, aktivasyon işlemi siyanojen bromür metodu kullanılarak yapılır.



Şekil 2.3. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.

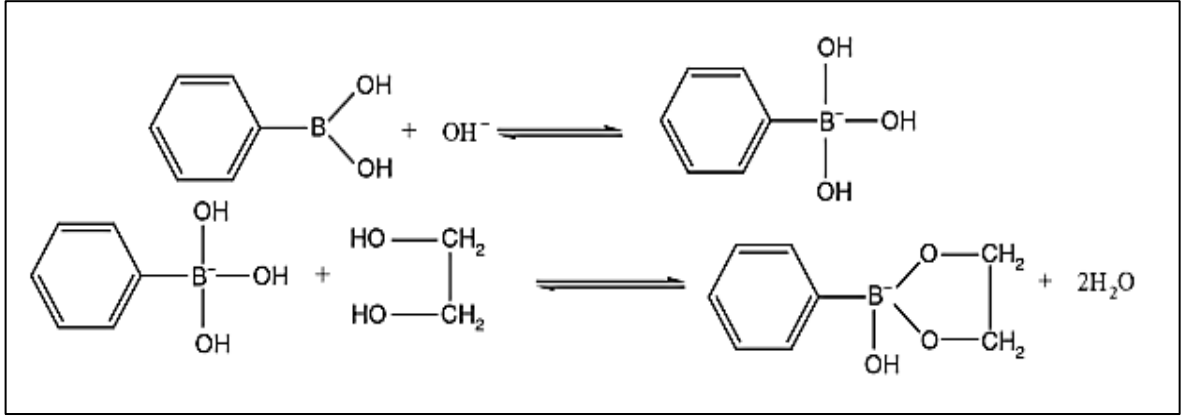
Ancak CNBr ile yapılan aktivasyon mekanizması üzerindeki çalışmalar bu metodun ciddi sorunlara neden olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, daha stabil ürünler veren yeni aktivasyon metotları geliştirilmiştir. Yeni yöntemler, başlıca N-hidroksi süksinimid kloroformat veya karbonil bis-imidazol veya karbonil (bis-N-hidroksi süksinimid) ve hidroksi süksinimid esterleri gibi karbonatlar, kloroformatlara dayalı olmuştur. Aminlerle reaksiyonları kararlı karbamatlar veya amidlerde sonuçlanır. Aktifleşmiş taşıyıcılara ligandları bağlama genellikle nötürün biraz üzerindeki bir pH' da yapılır.

Afinite kromatografisi, ilk olarak enzimlerin ve proteinlerin saflaştırılması için bir prosedür olarak tanıtılmıştır. Afinite kromatografisi moleküler tanıma ilkesine dayanır ve bugünlerde proteinlerin fizyolojik veya yapısal olarak saflaştırılması için uygun olan en güçlü tekniktir. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan çok sayıda proteine ek olarak, bu metot enzim ve hormonların etki mekanizması, protein-protein veya hücre-hücre etkileşimleri gibi birçok biyolojik sürecin araştırılması için vazgeçilmez bir araç olmuştur. Moleküler tanıma veya biyotanıma ile ilgili birçok yöntemin ortaya çıkması biyolojik bilimlerde hemen hemen tüm alanları etkilemiştir (Wilcheck, et al., 1985; Wilchek, et al., 1994).

Bazı afinite metotları şunlardır: Afinite çöktürme, afinite kapiler elektroforez, afinite bölümlenme, afinite itme kromatografisi, avidin-biotin immobilize sistemi, boronat afinite kromatografisi, kovalent afinite kromatografisi, boya-ligand afinite kromatografisi, yüksek performans afinite kromatografisi, hidrofobik kromatografi, immunoafinite kromatografisi, perfüzyon afinite, zayıf afinite kromatografisi, tiofilik kromatografi, tandem afinite saflaştırma ve reseptör afinite kromatografisi (Cuatrecasas, et al., 1968).

2.3.2.1. Boronat afinite kromatografisi

Nükleik asit bileşenleri, karbonhidratların ayrılması için boronat afinite kromatografisi kullanımı 1970'de Weith ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. O tarihten beri, boronatin özgülüğü, cis-diol içeren bileşiklerin, katekol içerenlerin, nükleositlerin, nükleotidlerin, nükleik asitlerin, karbonhidratların, glikoproteinlerin ve enzimlerin birçok çeşidinin ayırımında kullanılmıştır. Boronat kromatografisi için temel etkileşim, boronat ligandları ile cis-dioller arasındaki esterleşmedir.



Şekil 2.4. Boronat ligandları ile cis-dioller arasındaki esterleşme.

3-Aminofenilboronik asit ($pK_a = 8,8$), en eski ve hala kullanılan boronat ligandır. 3-Aminofenilboronik asidin immobilizasyonunu içeren tüm uygulamalarda, pH mümkün olduğunca yüksek olmalıdır, genellikle 8.5 üzerinde. Ancak birçok durumda, yüksek pH değerlerinde analitler biyolojik aktivitelerini kaybedebilirler. Düşük pH'lerde kullanılabilen üzere geliştirilen boronat ligandları bildirilmiştir, ancak şu anda hiçbiri ticari olarak kullanılmamaktadır.

Cis-diol ester oluşumu, boronat afinite kromatografisi için esas olmakla birlikte, ikinci etkileşimler proseste önemli rol oynarlar. Başlıca dört ikincil etkileşim aşağıda açıklanmıştır.

- **Hidrofobik etkileşimler:** Hidrofobik etkileşimlere sebebiyet veren bir fenil halkasına sahip olmasından dolayı, şimdiye kadar kullanılan hemen hemen tüm ligandlar aromatik boronat ligandlardır. Aromatik bir π - π etkileşimi fenil gruplarıyla meydana gelebilir. Bu durum, analitlerin spesifik olmayan adsorpsiyonuna sebep olabilir, özellikle proteinlerle. Hidrofobik etkiyi azaltmak için, iyonik güç düşük olmalı, genellikle 50 nM civarında.
- **İyonik etkileşimler:** Aktif tetrahedral boronatin negatif yükü, iyonik çekme veya itmeye sebep olabilir. Genelde, bu etki boronat/cis-diol ester oluşumundan daha zayıftır. İyonik etkiyi azaltmak için, iyonik güç yüksek olmalı fakat hidrofobik etkileşimi önlemek için 500 nM den düşük olmalı. 50-500 nM arasında olması makuldür.

- **Hidrojen bağı:** Boronik asit iki hidroksil grubuna sahip olduğu için, hidrojen bağı bulundurmaktadır. Bu genellikle küçük olsa bile, özel durumlarda hidrojen bağı kromatografik ayırmalar için, boronat afinite kromatografisi ile serin proteinaz izolasyonunda olduğu gibi, önemli bir faktördür.
- **Yük transfer etkileşimi:** Yüksüz, trigonal bir boronatta boron atomu boş bir orbitale sahip olduğundan dolayı, yük transfer etkileşimi için bir elektron alıcı olarak davranabilir. Protonlanmamış aminler iyi elektron donörleridir ve bir amin, borona bir elektron çiftini verdiği zaman, boron atomu tetrahedral yapıda olur. Bu durum aminlerin boronat/cis-diol esterifikasyonu ilerletmek için kullanılma sebebini açıklayabilir. Ancak, amine bitişik bir hidroksil grubu var ise boronat/cis-diol esterifikasyonu engellenebilir. Bu sebepten ötürü tris (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) ve etanolaminleri boronat kromatografisinde bağlayıcı tampon olarak kullanılmaktan kaçınılmalıdır.

Boronat afinite kromatografisi, aşağıda açıklanan dört ana grupta toplanan biyomoleküllerin ayırma işleminde kullanılmaktadır.

- **Karbonhidratlar:** Cis-diol içeren karbonhidratlar boronat afinite jellerine bağlanabilirler ve bağlanma şiddeti cis-diol sayısı ile doğru orantılıdır. 1960'lı yıllarda, Bourne ve arkadaşları cis-diol veya cis-triollerini bulunan şekerlerin hareketliliğini artırabilen kağıt kromatografisinde geliştirilen çözücülere fenilboronik asit eklemeyi bulmuşlardır. Boronat kromatografisi boronat jellerine en güçlü bağlanan, cis-1,2-diol içeren bileşiklerle monosakkarit ve oligosakkaritlerin ayırma işlemleri için kullanılır. Güçlü bağlardan dolayı sorbitol veya manitol gibi karbonhidratlar, çeşitli analitlerin elüsyonu için rakip dioller olarak sıklıkla kullanılır.

Polisakkaritler, monosakkarit bileşenlerinden daha kısıtlıdır çünkü glikozidik iç bağlar cis-diol sayısını azaltır ve sadece uç kısımlarda kalanlar boronat esterifikasyon için uygundur. Bu durum, nişasta, agaroz, metilselüloz ve inülin gibi birçok polisakkaritin boronat ile etkileşmeme sebebi olabilir. Buna karşılık, çok sayıda zamk ve müsilaj boronat ile reaksiyona girer.

- **Nükleosidler, nükleotidler ve nükleik asitler:** Riboz boronat ile güçlü etkileşimlere sebep olan, 2',3' konumunda 1,2-cis-diollerine sahiptir. Bu nedenle, boronat afinite kromatografisi ribonükleosidlerin, ribonükleotidlerin ve RNA'nın ayrılmasında başarıyla kullanılmaktadır. DNA'da 3'-hidroksil olmadığı için, boronat matrisleri ile esterleşme olmaz. Böylece, boronat afinite kromatografisi kolaylıkla RNA'yı DNA'dan ayırabilir. 3'-fosforil ribonükleotidler boronat jellere aynı sebepten ötürü bağlanamadığı için, onlar da kolaylıkla RNA'dan ayrılabilir.

Oligonükleotidler ve büyük RNA moleküllerinin 3'-terminal'de sadece bir tane cis-diolü olduğu için boronat jelleri ile olan bağları nispeten zayıf ve daha uzun zincirlerdir. mRNA da boronat afinite kromatografisi kullanılarak izole edilebilir. Boronat afinite kromatografisi, aminoasetile edilmiş tRNA'nın aminoasetile edilmemiş tRNA'dan ayrılması için de kullanılır. NAD(H), NADP(H) ve FAD gibi dinükleotid kofaktörlerin birden fazla erişilebilir cis-diolü olduğu için, mononükleotidler veya oligonükleotidlerden daha güçlü bir şekilde boronat kromatografi jellerine bağlanırlar.

- **Glikoproteinler ve enzimler:** Boronat afinite kromatografisinin en önemli kullanımlarından biri, glikozillenmemiş hemoglobinden glikozillenmiş hemoglobinin ayrılmasıdır. Boronat afinite kromatografisi diyabetik hemoglobin, yani glike albümin tayini için kullanılır çünkü glikozillenmiş hemoglobin düzeylerinin ölçümü diyabetin klinik tedavisinde önemli bir göstergedir.

Boronik asit türevleri, serin proteinazların güçlü geçiş-eş durum inhibitörleri olduğu için, α -kimotripsin, tripsin, subtilisin, insan nötrofil elastaz, insan katepsin G ve domuz pankreatik elastazı gibi serin proteinazların saflaştırılması ve izolasyonu için afinite ligandları olarak kullanılabilir. Normalde boronat ile etkileşmeyen proteinler "ligand-aracılı" kromatografisi ile izole edilebilir. Bu süreçte, boronat kolonu ilk olarak bir cis-diol içeren afinite ligandı ile dolgunlaştırılır.

Hedef proteini içeren numune kolona gönderilir. Hedef protein afinite ligandı ile etkileşir, böylece protein kolon içerisinde ya alıkonur ya da geri bırakılır.

Bağlanan proteinler tampon, çözünen afinite ligandları veya cis-diol rakipleri ile yapılan yıkamaya devam edildikçe geri bırakılır. Örneğin, konkanavalin A, afinite ligandı olarak metil α -D-glikopiranozid kullanılarak; glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (maya), afinite ligandı olarak NADP⁺ kullanılarak; heksokinaz (maya), afinite ligandı olarak ATP kullanılarak; laktat dehidrojenaz, afinite ligandı olarak NAD⁺ kullanılarak ve UDP-glikoz pirofosforilaz, UTP kullanılarak izole edilir.

- **Çeşitli küçük moleküller:** Bazı düşük molekül ağırlıklı biyolojik moleküller de boronat afinite kromatografisi ile izole edilebilir. Katekolaminleri içeren katekoller, D,L-dopa, 5-S-sisteinildopa, dopamin, epinefrin ve norepinefrin bu büyük grubu oluşturan bileşiklerdir. Boronat afinite kromatografisi ile izole edilen nonkatekoller, α -hidroksicarboksilik asitleri (laktik, salisilik vs.), pridoksal, kuersetin ve ekdisteroitleri içerirler. Genelde bu moleküller ve boronat arasındaki etkileşim boronat/cis-diol ester oluşumundan dolayıdır (Bailon, et al., 2000).

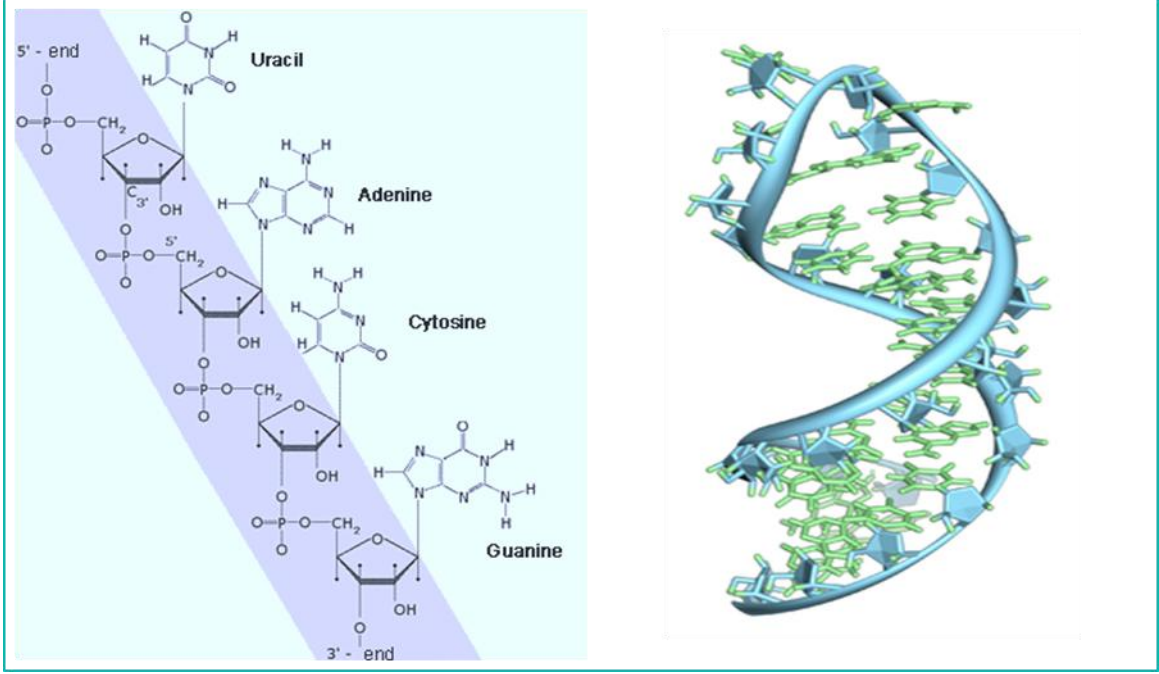
2.4. Biyomoleküller ve Saflaştırılması

2.4.1. Ribonükleik asit (RNA)

Ribonükleik asitler kromatografik ayırma için uygun olma gibi, bir dizi eşsiz özelliklere sahiptirler. Bir RNA molekülü basit bir polimerdir. Monomerler, kolaylık sağlamak için genellikle nükleotid olarak adlandırılan ribonükleotid monofosfatların karışımından oluşmaktadır. Ribonükleik asit (RNA) nükleotidlerin uzun bir zincirinden oluşmaktadır. Her nükleotid; azotlu baz, adenin (A), sitozin (C), guanin (G) veya urasil (U), 1' ile 5' numaralı karbon ile bir riboz şekeri ve ribozun 5' konumuna bağlı bir fosfat grubu içermektedir.

DNA ve RNA arasında bazı farklılıklar vardır. RNA, çift zincirli DNA ile karşılaştırıldığında genellikle daha kısa ve tek zincirlidir. DNA hidroksil grubundan yoksun iken, RNA'nın ribozun 2' pozisyonunda bir hidroksil grubu vardır. Bu fark iki molekülün farklı şekillerde, tek ya da çift sarmal olarak bulunmasının nedenidir. DNA, B formunda bir sarmal yapısını alırken, RNA A formunda bir sarmal yapıya bürünür. Bir DNA-RNA dubleksi ise B formunu benimseyecektir.

RNA ve DNA arasındaki bir diğer fark ise; RNA ligandlara bağlanma ve/veya katalizleme enzimatik reaksiyonlara yeteneği olan yapılardan oluşurken DNA genetik bilginin taşıyıcısı olarak yapısında ve fonksiyonlarında kararlılık gerektirir.



Şekil 2.5. Ribonükleik asidin (RNA) kimyasal yapısı.

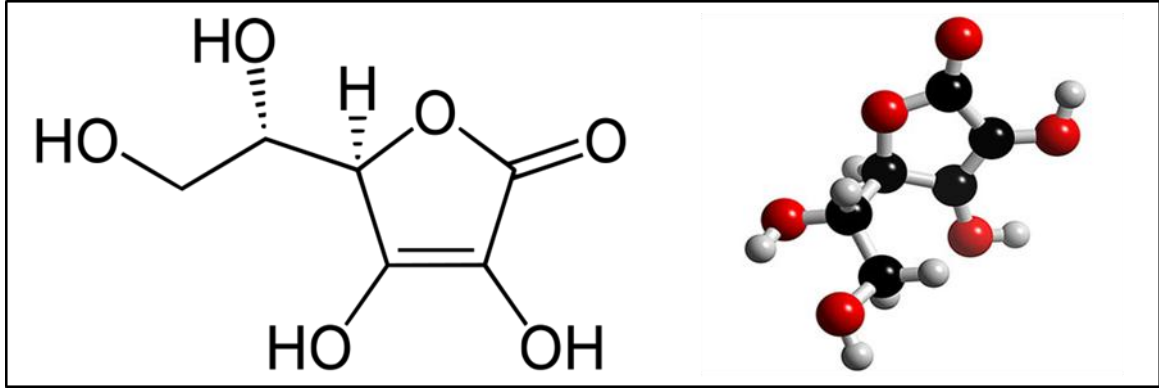
RNA polar ve elektronegatif olduğundan genellikle proteinlerden daha büyük fakat DNA molekülünden daha küçüktür. DNA gibi, RNA'nın da mükemmel bir doğası vardır. Fakat RNA'lar genellikle tek zincirli oldukları için, bu özellik daha erişilebilirdir. Bu özellikler iyon-değişim kromatografisi, iyon-çiftleşme kromatografisi, ters-faz sıvı kromatografisi, büyüklükçe ayırma kromatografisi ve afinite kromatografisinde RNA'nın ayrıştırılması için kolaylık sağlamaktadır.

Nükleik asitleri proteinlerden ayırmak için genel laboratuvar uygulamaları fenol faz ekstraksiyonu ve yüksek tuz koşullarında etanol çöktürmesidir. Bu yöntemlerin varyasyonları ile bütün RNA'lar saflaştırılabilirler. RNA güçlü bir biyomoleküldür ve birçok biyolojik fonksiyonun kontrol edilmesinde veya performansında doğrudan etkilidir. RNA kromatografisi için çalışan HPLC sistemlerinin kurulması, tek zincirli ve çift zincirli DNA'nın ayırma çalışmalarına dayanmaktadır. 1993 yılında Guenther Bonn, Christian Huber ve Peter Oefner ilk olarak DNA kromatografisi ve ardından RNA kromatografisi için temel teknolojiyi tanımlamıştır. (Gjerde, et al., 2009).

2.4.2. Askorbik asit (C vitamini)

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Kapalı formül $C_6H_8O_6$ şeklinde olup; % 40,91 karbon (C), % 4,48 hidrojen (H) ve % 54,5 oksijen (O) içerir. Sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Bir gram askorbik asit 3mL suda, 30 mL alkolde ve 100 mL gliserinde çözünür. Eter, kloroform, benzen, petrol eteri, yağlar ve yağ çözücülerinde çözünmez.

Şekil 2.6'da molekül şekli gösterilen L-askorbik asit 5 üyeli heterosiklik halka içinde bir endiol grubu bulunan dibazik asittir. Bu yapı asit-baz davranışı sergiler ve ilk olarak 3. hidroksil grubu iyonlaşır. Askorbik asit, konjüğe olmuş karbonil ve endiol sistemi üzerinden π elektronlarının delokalizasyonu ile stabilleşir (Davies, 1992).



Şekil 2.6. Askorbik asidin (AA) kimyasal yapısı.

Askorbik asit, oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle antioksidan, monosakkarit türevi olan bir organik asittir. Askorbik asit yapıca diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Askorbik asit rengi karakteristik olmak yerine beyaz ile hafif sarı arasında değişen yapıdadır. Askorbik asit dikdörtgen kristal yapıdadır ve çok özel hafif bir kokusu vardır. Ticari C vitamini genelde askorbik asit kristallerinden veya askorbik asidin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır.

Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel araştırmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başlamış ve daha sonra araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddesinin ve özellikle yeşil sebze ve meyvelerin iskorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır.

1912 yılında C. Funk adlı bir kimyacı iskorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye “antiskorbütik vitamin” adını vermiştir. Bundan sonra Drummond 1920’de antiskorbütik vitamin için “Vitamin C” adını kullanmıştır.

Zilva ve çalışma arkadaşları (1918–1929), limondaki askorbik asidi izole ederek, bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini saptamışlardır. Zilva bu çalışmaları esnasında 2,6-diklorofenol-indofenolün, (2,6-DCPIP), C vitamini çözeltisi tarafından indirgendini bulmuştur. Zilva çalışmalarını devam ettirirken 1928 yılında “Szent-Györgyi” adlı bir kimyacı askorbik asidi bitki ve hayvanların böbreküstü bezlerinden ayırmış, ancak 1932 yılına kadar devam ettirdiği bu çalışmalar esnasında bu maddenin antiskorbüt vitamin olduğunu anlayamamış ve daha sonra King yayınında bu maddeye heksuronik asit adını vermiştir. Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacı özellikle Tillmans, Vedder, Nelson, Harris ve Von Vragha vitaminin kimliğini saptamışlar ve glikozdan sentezini gerçekleştirmişlerdir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Reaktif klorometil grubuna sahip hidrofobik formdaki, monodispers ve gözenekli partiküller 4-klorometilstiren (CMS) ve divinilbenzen (DVB) monomerlerinin çok basamaklı mikrosüspansiyon kopolimerizasyonu ile sentezlenmiş ve boronat afinite kromatografisinde sabit faz olarak kullanılmıştır.

Çalışma için reaktif klorometil grubunun seçilmesinin nedeni, grubun kolaylıkla türevlendirilebilir karakterde olmasıdır. Bu grup üzerinden tek basamaklı direkt tepkimeler ile polimerik yapıya iyon değiştirici ligandlar veya lineer hidrofobik ligandlar kolaylıkla bağlanabilmektedir. Mevcut çalışmaların çoğunda klorometil fonksiyonel grubuna sahip partiküller genelde 4-klorometilstiren monomerinden çıkılarak sentezlenmektedir.

Bu çalışmada ilk olarak, çıkış lateksi olarak stirenin dispersiyon polimerizasyonu ile 3.3 µm boyutunda monodispers polistiren (PS) partikülü sentezlenmiştir. polistiren partiküllerin çok basamaklı mikrosüspansiyon kopolimerizasyonunda, ilk basamakta gözenek yapıcı organik çözücü faz, ikinci basamakta ise başlatıcı, monomer ve çapraz bağlayıcıyı içeren organik faz ile şişirilmiştir. Son aşamada ise 70 °C sıcaklıkta monomer fazı partiküller içerisinde polimerleştirilerek, reaktif ve eş boyutlu (monodispers) formda poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin eldesi sağlanmıştır.

Partiküllerin karakterizasyonu; boyut özellikleri ve yüzey yapısı Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), yüzey alanı BET (Brunauer-Emmett-Teller) analizi, gözeneklilik özellikleri ise HPLC sisteminde Ters-büyükölçek Ayırma Kromatografisi (Inverse-size Exclusion Chromatography, ISEC) yöntemiyle tayin edilmiştir.

Poli(CMS-co-DVB) partiküllere; tek basamakta gerçekleştirilen nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile 3-aminofenilboronik asit (APBA), ligand olarak bağlanmıştır. Ligand bağlama işlemi 60 °C'de ve bazik ortamda yürütülmüştür. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin karakterizasyonu potansiyometrik titrasyon ile yapılmıştır. Sentezlenen ligand bağlı partiküller, boronat afinite kromatografisi yoluyla kesikli sistemde diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Bu amaçla ribonükleik asit (RNA) ve askorbik asit (AA) gibi biyomoleküller model molekül olarak denenmiştir. Bu çalışmada model molekül olarak RNA ve AA seçilmesinin nedeni, sentezlenen yapının farklı molekül ağırlıklarındaki biyomoleküllerin izolasyonu için kullanılabilirliğini test etmektir. Bu sebeple yüksek molekül ağırlığına sahip RNA ve düşük molekül ağırlığına sahip AA, model molekül olarak seçilmiştir.

Kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri ile sentezlenen yapının diol grubu içeren farklı moleküller için izolasyon yeteneği belirlenmiştir. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarında, diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonu için en uygun derişim, pH, zaman ve adsorban derişimi belirlenmiştir.

3.1. Polimerik Partiküllerin Sentezi

Polimerik partiküllerin sentezine, dispersiyon polimerizasyonu ile polistiren (PS) partiküllerin çıkış lateksi olarak eldesi ile başlanmıştır. Daha sonra, 3.3 µm boyutunda ve eş boyutlu polistiren partiküller ilk basamakta gözenek yapıcı organik çözücü faz, ikinci basamakta ise başlatıcı, monomer ve çapraz bağlayıcıyı içeren organik faz ile şişirilmiştir. Son aşamada ise 70 °C sıcaklıkta monomer fazı partiküller içerisinde polimerleştirilerek, reaktif ve monodispers formda poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin eldesi sağlanmıştır.


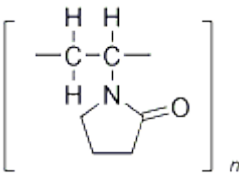

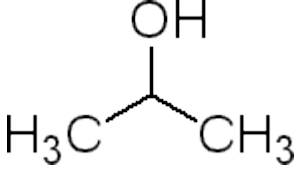

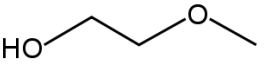

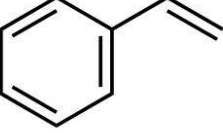

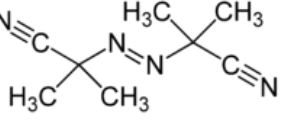
3.1.1. Çıkış lateksinin sentezi

3.1.1.1. Kullanılan kimyasallar

Polistiren lateks (Seed Latex, SL) partiküllerin sentezinde, sterik stabilizör olarak polivinilpirolidon K-30, dağıtma ortamı bileşenleri olarak mutlak etil alkol ve 2-metoksietanol (HPLC için uygun) seçilmiş ve alındığı şekliyle dispersiyon polimerizasyonunda kullanılmıştır. Vakumda distile edilen ve kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanan stiren, monomer olarak kullanılmıştır. Başlatıcı olarak ise etil alkolden kristalize edilen 2,2'-azobis(2-metilpropiyonitril), AIBN kullanılmıştır.

PS lateks sentezi için dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan kimyasallar ve polimerizasyon koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

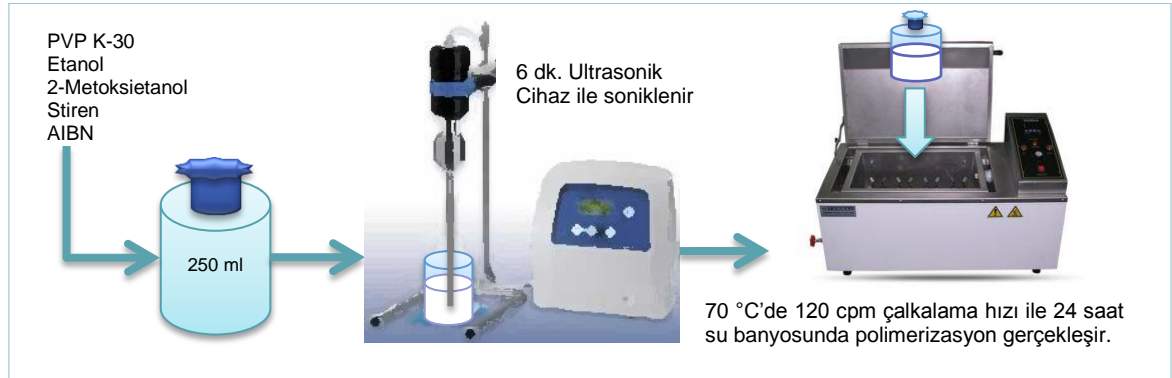
Çizelge 3.1. Polistiren lateksin dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan kimyasallar ve polimerizasyon koşulları.

Kimyasal Madde	Firma	Fonksiyon	Miktar	Kimyasal Yapı
Polivinilpirolidon (PVP K-30)	 USA	Sterik Stabilizör	2.1 g	 (C ₆ H ₉ NO) _n
Etanol (Mutlak, ≥ % 99.8)	 Almanya	Dağıtma Ortamı	84 mL	 CH ₃ CH ₂ OH
2-Metoksietanol (HPLC sınıfı, % 99,9+)	 Almanya	Dağıtma Ortamı	36 mL	 C ₃ H ₈ O ₂
Stiren	 Almanya	Monomer	20 mL	 C ₈ H ₈
2,2'-Azobis(2- metilpropionitril), AIBN	 New Jersey US	Başlatıcı	0.44 g	 C ₈ H ₁₂ N ₄
Polimerizasyon Koşulları				
Sıcaklık			70 °C	
Karıştırma Hızı			120 cpm	
Polimerizasyon Süresi			24 saat	

3.1.1.2. Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi

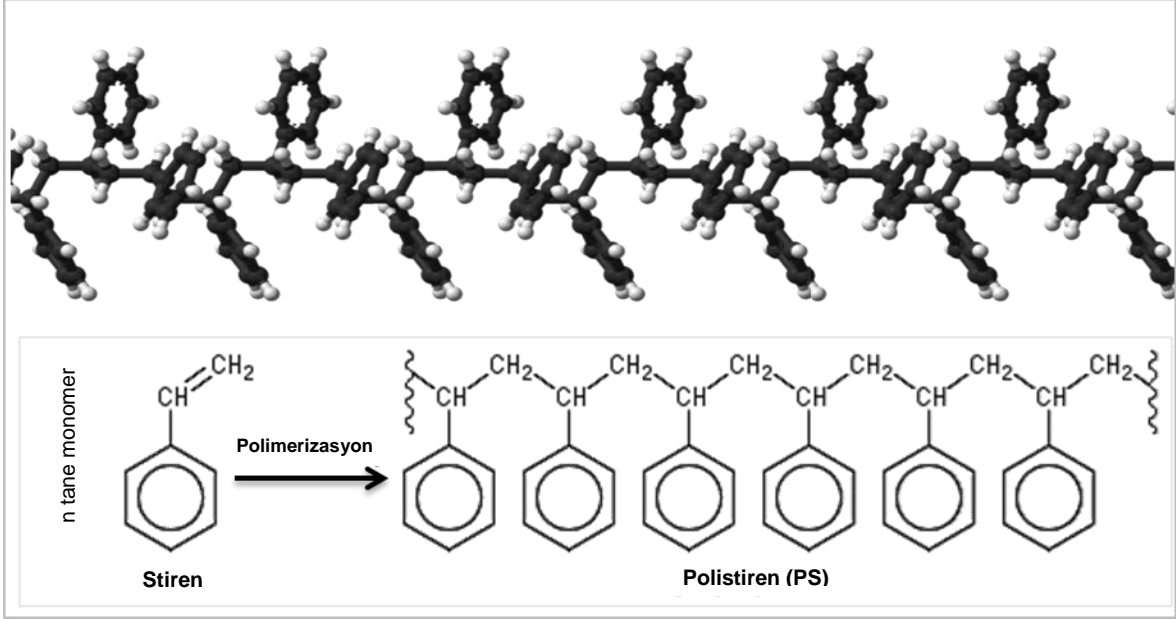
Dispersiyon polimerizasyonu ile poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) sentezi için çıkış lateksi olarak kullanılan polistiren partiküller hazırlanmıştır. Bu yöntemde, ilk olarak dağıtma ortamı hazırlanmıştır. 2.1 g polivinilpirolidon (PVP K-30), 84 mL etanol ve 36 mL 2-metoksietanol karışımı içerisinde çözülmüştür. Bu işlem, Şekil 3.1'de görülen 250 mL hacme sahip, ağzı sızdırmaz şekilde kapatılabilen, polimerizasyon reaktörü olarak kullanılan bir cam şişede gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dağıtma ortamına 20 mL stiren monomeri ve 0.44 g 2,2'-azobis(2-metilpropionitril), AIBN eklenmiştir. Son karışım, AIBN'nin tamamen çözünmesini sağlayabilmek amacıyla 6 dakika boyunca ultrasonik cihaz (Bandelin Electronic SONOPULS HD 2070, Almanya) ile soniklenmiştir. Bu işlem oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

AIBN'nin iyice çözüldüğünden emin olarak, ağzı sızdırmaz şekilde kapatılmış cam reaktör oda sıcaklığında bir çalkalamalı su banyosuna (Memmert Type WB 14, Germany) yerleştirilmiş ve 120 cpm çalkalama hızı ile polimerizasyon sıcaklığı 70 °C'ye ayarlanmıştır. Belirtilen sıcaklık ve çalkalama hızında, 24 saat boyunca polimerizasyon işlemi gerçekleşmiştir. Polistiren (PS) lateks partiküllerin sentezi şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Polistiren (PS) lateks sentezinin şematik gösterimi.

Dispersiyon polimerizasyonu ile 3.3 µm boyutunda monodispers ve gözenekli polistiren lateks partiküller elde edilmiştir. PS partiküllerin kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir. Tez kapsamında, hidrofobik formdaki monodispers ve gözenekli poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin sentezi amacıyla sentezlenen çıkış lateksi kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Polistiren partiküllerin kimyasal yapısı.

3.1.2. Poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin sentezi


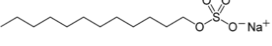

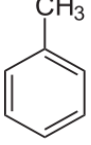

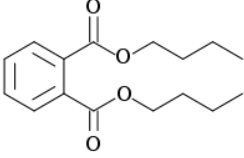



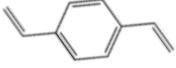

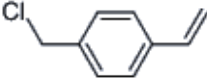

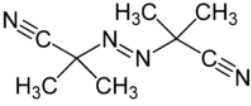
Reaktif formda, monodispers ve gözenekli partiküller 4-klorometilstiren ve divinilbenzen monomerlerinin “çok basamaklı mikrosüspansiyon kopolimerizasyonu” ile hazırlanmıştır.

3.1.2.1. Kullanılan kimyasallar


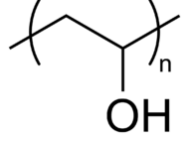
Çok basamaklı polimerizasyon yönteminde kullanılan kimyasallar ve özellikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu yöntemde, ilk basamakta gözenek yapıcı ajan olarak toluen, dibütülfalat (DBP) ve dodekanol; anyonik emülsifiyon yapıcı madde olarak ise sodyum dodesil sülfat (lauril sülfat, LS) kullanılmıştır. Toluen, DBP, dodekanol ve sodyum dodesil sülfat (SDS) alındığı şekliyle doğrudan kullanılan malzemelerdir.

İkinci basamakta kullanılan iki farklı monomerden 4-klorometilstiren (CMS) doğrudan, ikincisi ise çapraz bağlayıcı olan divinilbenzen (DVB); ağırlıkça % 55 oranında DVB izomerleri içeren DVB karışımından, inhibitörlerin uzaklaştırılması amacıyla ağırlıkça % 5’lik NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilerek kullanılmıştır. Başlatıcı olarak ise etil alkolden kristalize edilen 2,2’-azobis(2-metilpropiyonitril) kullanılmıştır. Üçüncü basamakta ise stabilizör olarak poli(vinil alkol) (PVA, % 87-89 hidrolize) kullanılmıştır. Bütün deneylerde distile su kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve polimerizasyon koşulları.

Kimyasal Madde	Firma	Fonksiyon	Miktar	Kimyasal Yapı
Sodyum Dodesil Sülfat, SDS	 SIGMA-ALDRICH Almanya	Emülsifiyon Yapıcı	0.25 g	 $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$
Toluen	 SIGMA-ALDRICH Almanya	Gözenek Yapıcı	2 mL	 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$
Dibütilftalat	 Fluka Almanya	Gözenek Yapıcı	1 mL	 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$
1-Dodekanol	 Fluka Almanya	Gözenek Yapıcı	0.25 mL	 $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$
Divinilbenzen, % 55	 ALDRICH Chemistry Almanya	Çapraz Bağlayıcı Monomer	1.8 mL	 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}$
4-vinilbenzil klorür (4-klorometil stiren, CMS)	 ALDRICH Chemistry Almanya	Monomer	1.2 mL	 $\text{C}_9\text{H}_9\text{Cl}$
2,2'-Azobis(2-metilpropiyonitril), AIBN	 ACROS ORGANICS New Jersey US	Başlatıcı	0.08 g	 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4$

Çizelge 3.2. devam ediyor.

Poli(vinil alkol) PVA Hidrolize, % 87-89	 Almanya	Stabilizör	0.8 g	 (C ₂ H ₄ O) _n
Polimerizasyon Koşulları				
Sıcaklık				70 °C
Karıştırma Hızı				120 çpm
Polimerizasyon Süresi				24 saat

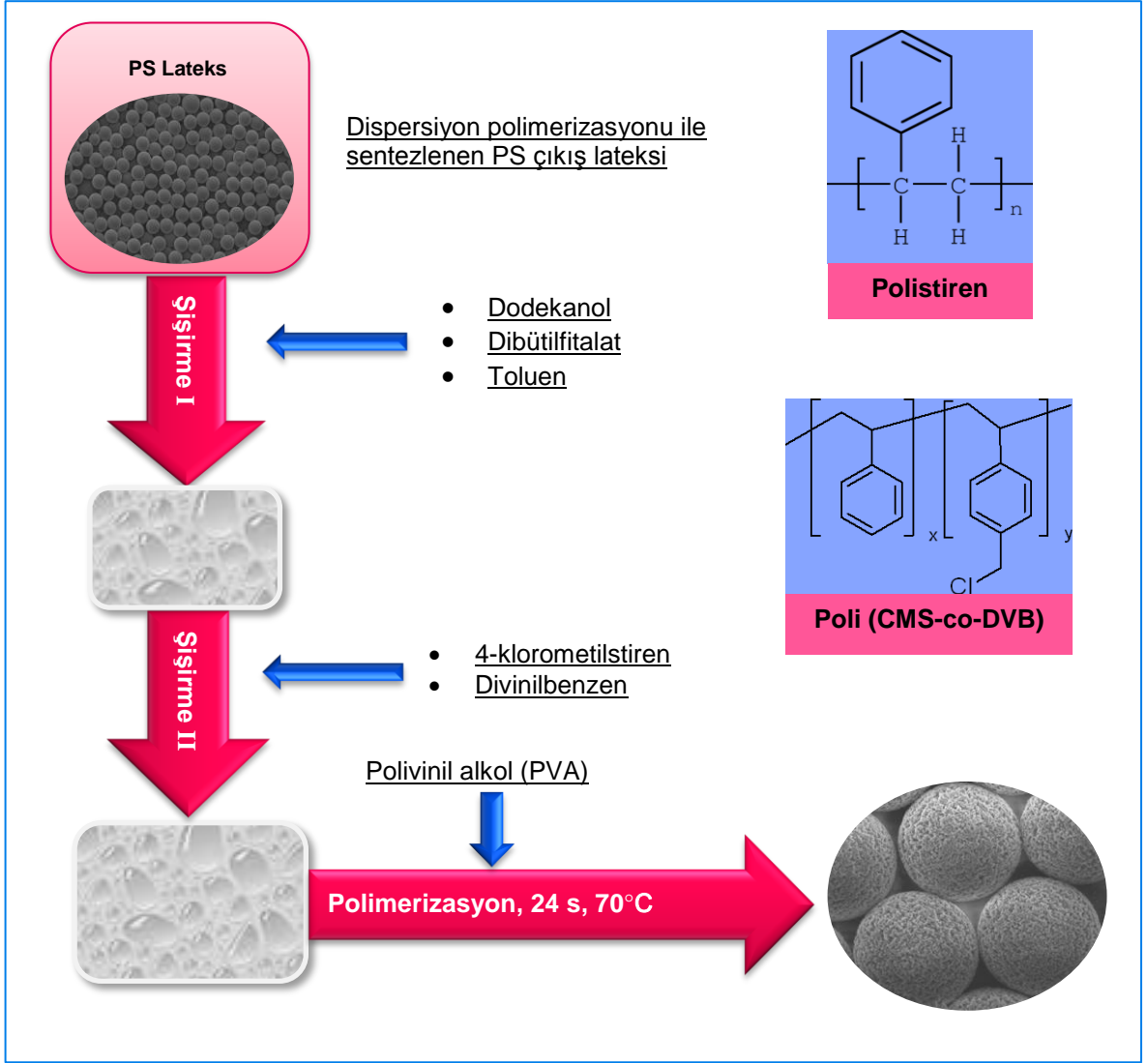
3.1.2.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi

Çok basamaklı yöntemin ilk basamağında PS çıkış lateksi ilk basamakta gözenek yapıcı organik çözücü, ikinci basamakta ise başlatıcı, monomer ve çapraz bağlayıcıyı içeren organik faz ile monodispersitesi korunarak şişirilmiştir. Üçüncü basamakta ise, monomer fazı partiküller içerisinde polimerleştirilerek, reaktif ve monodispers formda, hidrofobik poli(CMS-co-DVB) partiküllerin eldesi sağlanmıştır. Poli(CMS-co-DVB) lateks partiküllerin çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmesi şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin sentezi basamakları:

- PS çıkış lateksinin gözenek yapıcı organik çözücü faz ile şişirilmesi,
- PS çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi,
- Monomer fazın, şişirilmiş PS çıkış lateksi içerisinde polimerizasyonudur.

Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle yaklaşık 6 µm boyutunda monodispers partiküller sentezlenmiştir.



Şekil 3.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu protokolü.

Çıkış lateksinin organik faz ile şişirilmesi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin ilk basamağı olan PS çıkış lateksinin organik faz ile şişirilmesine, ağırlıkça % 0.55 sodyum dodesil sülfat içeren sulu çözelti hazırlanarak başlanmıştır. 45 mL distile su içerisinde 0.25 g SDS'nin tamamen çözünmesi için 10 dk. boyunca ultrasonik su banyosu (Branson LC 30, Almanya) içerisinde tutulmuştur. Daha sonra, gözenek yapıcı organik faz, 1 mL dibütilfitalat (DBP), 2 mL toluen ve 0.25 mL dodekanolün karıştırılması ile hazırlanmıştır. Hazırlanan gözenek yapıcı organik fazın iyice dağıtılması için 10 dk. ultrasonik su banyosuna koyulmuştur.

Son olarak, hazırlanan organik faz hazırlanan emülsifiyon yapıcı SDS çözeltisi ile karıştırılarak, yaklaşık 1 µm boyutunda kararlı damlacıklar şeklinde dağıtılması amacıyla 6 dakika boyunca ultrasonik cihaz (Bandelin Electronic SONOPULS HD 2070, Almanya) ile soniklenmiştir. 6 dk. sonra, organik faz-su emülsiyonuna 0.35 g PS lateksini içeren dispersiyon eklenmiş ve 2 dk. daha ultrasonik cihaz ile sonikasyona devam edilmiştir. Toplamda 8 dk. süren sonikasyon işleminden sonra karışım bir manyetik karıştırıcıda (IKA Werke, Almanya) oda sıcaklığında, 300 rpm hızda 24 saat karıştırılarak PS partiküller organik faz ile şişirilmiştir.

Çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi

İkinci şişirme basamağına ağırlıkça % 0.55 sodyum dodesil sülfat içeren sulu çözelti hazırlanarak başlanmıştır. 45 mL distile su içerisinde 0.25 g SDS'nin tamamen çözünmesi için 10 dk. boyunca ultrasonik banyo içerisinde tutulmuştur. 1.2 mL 4-klorometilstiren (CMS) ve 1.8 mL divinilbenzen (DVB) içerisinde 0.08 g 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) çözülerek monomer fazı hazırlanmıştır. Monomer fazın içerisinde AIBN'nin iyice çözünmesi için karışım 10 dk. boyunca ultrasonik su banyosuna koyulmuştur.

Daha sonra, hazırlanan SDS çözeltisi içerisine monomer fazı eklenerek ultrasonik cihaz ile 8 dk. boyunca karışım sayesinde monomer fazın sulu ortamda mikron boyutunda damlacıklar şeklinde dağıtılması sağlanmıştır. Elde edilen monomer emülsiyonu bir önceki basamakta oluşturulan, gözenek yapıcı çözücü ile şişirilmiş partikülleri içeren emülsiyona eklenmiştir. İkinci basamak sonunda elde edilen son karışım da oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca 300 rpm hızıyla karıştırılarak, monomer fazın şişirilmiş PS partiküllerin içerisine difüzenmesi ve partiküllerin şişirilmesi sağlanmıştır.

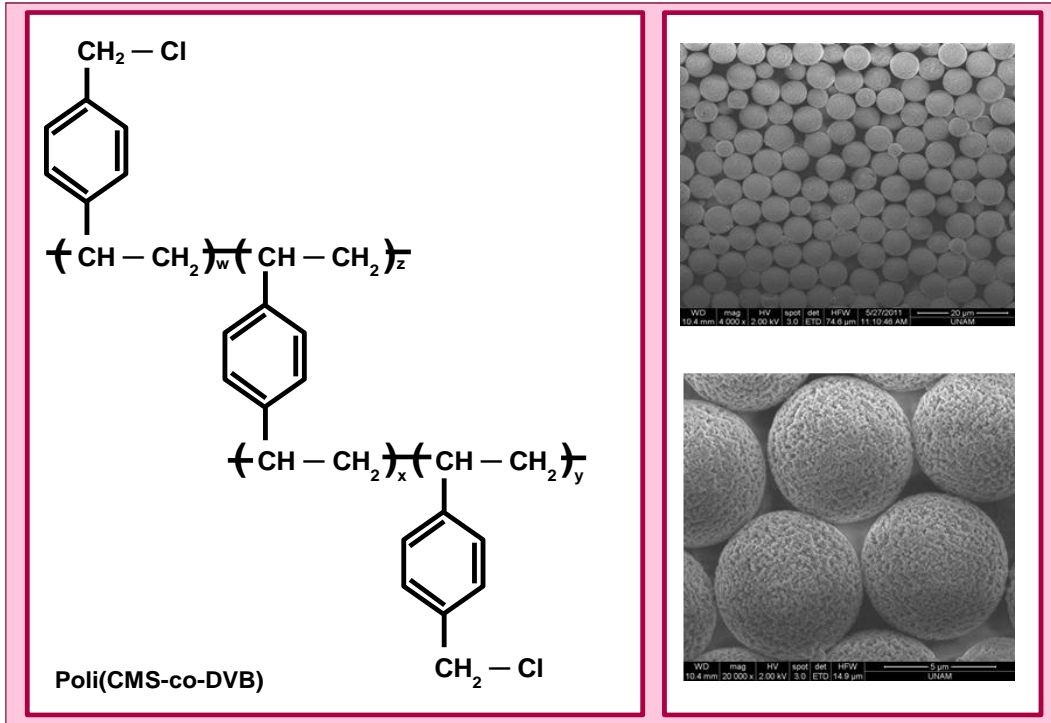
Monomer fazın şişmiş PS partiküller içinde polimerizasyonu

Üçüncü basamakta, 48 saat boyunca şişirilmiş PS partiküllerini içeren dispersiyon 250 mL hacme sahip sızdırmaz kapaklı cam bir reaktöre alınarak, karışım içerisine 48 saat boyunca çözünmesi sağlanan, ağırlıkça % 8 polivinil alkol (PVA) içeren 10 mL sulu çözelti eklenmiştir. Ağız sıkıca kapatılan reaktör, oda sıcaklığındaki çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Type WB 14, Almanya) yerleştirilmiştir. Kullanılan çalkalamalı su banyosunun sıcaklığı 70 °C'ye ve 120 cpm çalkalama

hızına ayarlanarak, yaklaşık 40 dk. 'lık bir sürede sıcaklığın 70 °C'ye gelmesiyle 24 saatlik polimerizasyon başlatılmıştır. 24 saatin sonunda su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığında soğutulmuştur. Sentezlenen poli(CMS-co-DVB) partiküllerin sentez koşulları ise Çizelge 3.3'te, kimyasal yapısı Şekil 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin sentez koşulları.

Birinci basamak						
Partikül	PS Lateks (g)	Dodekanol (mL)	Toluen (mL)	DBP (mL)	Su (mL)	SDS (g)
PCMS	0.35	0.25	2	1	45	0.25
İkinci Basamak						
Partikül	CMS (mL)	DVB (mL)	AIBN (g)	Su (mL)	SDS (g)	
PCMS	1.2	1.8	0.08	45	0.25	
Üçüncü Basamak						
Partikül	PVA (g)			Su (mL)		
PCMS	0.8			10		
Polimerizasyon Koşulları						
Sıcaklık	Çalkalama Hızı			Süre		
70 °C	120 cpm			24 saat		



Şekil 3.4. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kimyasal yapısı.

3.1.2.3. PS ve poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ekstraksiyonu

PS ve poli(CMS-co-DVB) partiküllerin polimerizasyonu sonucunda, ana ürün olarak elde edilen eş boyutlu gözenekli partiküllerin yanında, bazı deney kombinasyonlarında ortalama boyutu 1 µm civarında olan partikül fraksiyonu yan ürün olarak elde edilebilmektedir. Eş boyutlu olması istenilen partiküllerin küçük boyutlu partiküllerden arındırılması amacıyla santrifüjleme ve dekantasyon protokolü uygulanmıştır.

Oda sıcaklığında soğutulan reaktör içeriği 5000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir (Nüve NF 200, Türkiye). Santrifüj sonrası, santrifüj tüpündeki süpernatant atılmış, 10 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine distile su eklenerek, bir baget yardımıyla dibe çöken katı ile suyun iyice karışması sağlanmış ve 5000 rpm'de 5 dk. tekrar santrifüjlenmiştir. Bu şekilde, santrifüjleme-dekantasyon işlemi, beş kez distile su ve iki kez teknik etanol ile olmak üzere yedi kez yapılmıştır.

Etanol ekstraksiyonunu tamamlandıktan sonra, partiküller yaklaşık 50 mL tetrahidrofur (THF, HPLC grade, Riedel de Haen, Almanya) içerisinde dağıtılarak 60 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 1 saat boyunca 120 cpm hızıyla çalkalanmıştır. THF-partikül dispersiyonu, 1 saat sonrasında 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. THF ile ekstraksiyon aynı şekilde bir kez daha tekrarlanmıştır.

THF ekstraksiyonu sonrasında, santrifüjleme-dekantasyon işlemi yapılarak partiküller 10 mL'lik santrifüj tüplerinde teknik etanol içerisinde dağıtılarak, 5000 rpm'de 5 dk. boyunca 2 kez santrifüjlenmiştir. Partiküller, etanolden sonra distile su ile 2000 rpm'de 1 dk. boyunca 3 kez santrifüjlenmiş ve süpernatant yavaşça atılarak dipte kalan eş boyutlu makro partiküller, süpernatantta asılı kalan küçük partiküllerden dekantasyon yöntemiyle ayrılmıştır. Mikroskop (Nikon Alphaphot-2 YS2, Japonya) ile yapılan gözlem sayesinde küçük partiküllerin sulu dispersiyon ortamından uzaklaştırıldığı görülmüştür.

Sentezlenen partiküller saklanmak üzere, son dekantasyon işleminden sonra, yaklaşık 100 mL distile su içerisine alınmıştır. Sulu fazdaki polimerik partikül içeriği gravimetrik analiz yöntemiyle hesaplanmıştır. Bu yöntemde, kütlesi bilinen bir kaba, sentezlenen partiküllerin sulu karışımından 1 mL koyulup, 70 °C'deki vakum etüvünde (Nüve Vakummetre EV 018, Türkiye) 24 saat boyunca kurutulmuştur.

Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra tartılan kabın kütlesi ile kabın boş kütlesi arasındaki fark, 1 mL hacimdeki partikülün miktarını vermektedir. Bu sayede, belirli hacimdeki PS ve poli(CMS-co-DVB) partiküllerin miktarı tayin edilmiştir.

3.2. Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerine Ligand Bağlama

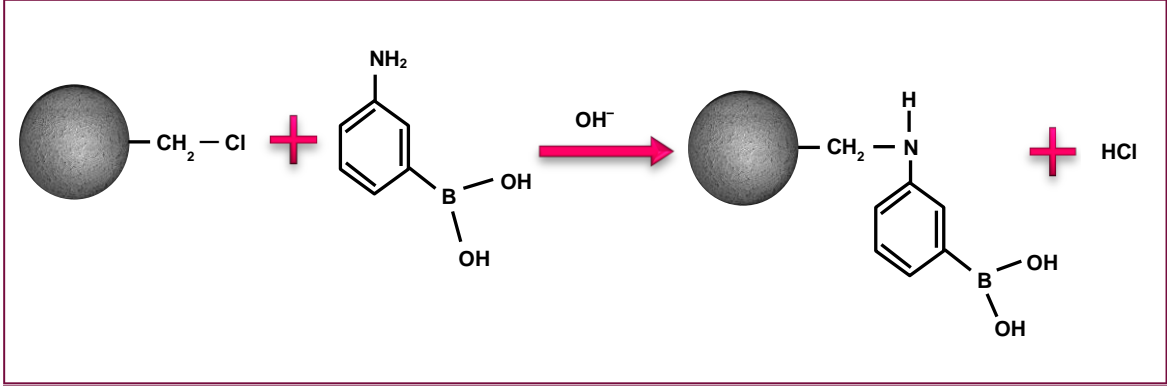
Poli(CMS-co-DVB) partiküllerine, bazik ortamda 3-aminofenilboronik asit (APBA) nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile bağlanarak, reaktif klorometil gruplarına sahip poli(CMS-co-DVB) partikülleri, kolaylıkla türevlendirilmiştir. Çizelge 3.4'te nükleofilik yer değiştirme tepkimesinde kullanılan APBA'nın özellikleri ve bağlanma koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.4. Nükleofilik yer değiştirme tepkimesinde kullanılan APBA özellikleri ve bağlanma koşulları.

Kimyasal Madde	Firma	Fonksiyon	Miktar	Kimyasal Yapı
3-Aminofenilboronik asit, yarı sülfat tuzu, \geq % 95	 Almanya	Ligand	0.4 g	 $H_2NC_6H_4B(OH)_2 \cdot 0.5H_2SO_4$
Bağlanma Koşulları				
Sıcaklık			Oda sıcaklığı / 60 °C	
Karıştırma Hızı			6.5 rpm	
Bağlanma Süresi			24 saat	

Ligand bağlama işlemi için gerekli olan 1 g poli(CMS-co-DVB) partiküllerini içeren hacimdeki sulu faz santrifüjlenmiş ve sıvı kısım atılmıştır. 50 mL'lik cam bir reaktörde, 10 mL distile su içerisinde, 0.4 g 3-aminofenilboronik asit çözünmüştür. APBA'nın tamamen çözünmesi için 10 dk. boyunca ultrasonik banyoda soniklenmiştir. Daha sonra, çözeltinin pH değeri, pH metre (İSTEK Neomet, Türkiye) ile 3 M NaOH çözeltisi kullanılarak 12'ye ayarlanmıştır. pH değeri 12 olan, 10 mL APBA çözeltisi ile 1 g poli(CMS-co-DVB) partikülleri ile etkileştirilmiştir.

Partiküller ile etkileşen APBA çözeltisinin, pH'ı kontrol edilmiştir. Reaktörün kapağı sızdırmaz bir şekilde kapatılarak, oda sıcaklığında bulunan ve yaklaşık 40 dk.' da 60 °C'ye gelen çalkalamalı bir su banyosuna koyularak, 24 saat boyunca bağlama gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra reaktör su banyosundan alınır ve oda sıcaklığında soğutulmuştur. Şekil 3.5'te nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile ligand bağlama protokolü verilmiştir.



Şekil 3.5. Nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile ligand bağlama protokolü.

Oda sıcaklığında soğutulan reaktör içeriği 5000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, santrifüj tüpündeki süpernatant atılmış ve 10 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine distile su eklenerek, bir baget yardımıyla dibe çöken katı ile suyun iyice karışması sağlanmış ve 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Bu şekilde, santrifüjleme-dekantasyon işlemi, iki kez distile su ile tekrarlanmış ve partiküller yaklaşık 50 mL distile su içine alınarak gravimetrik analizi yapılmıştır.

60 °C'de gerçekleştirilen ligand bağlama deneyi, oda sıcaklığında da gerçekleştirilmiştir. Ligand bağlama işlemi oda sıcaklığında ve 60 °C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilerek, ligand bağlanmasının hangi sıcaklıkta daha iyi olduğu, alizarin kırmızısı (ASR) ve askorbik asit (AA) için yapılan adsorpsiyon deneylerindeki adsorpsiyon kapasitelerine bakılarak tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, APBA bağlamaları tespit edilen uygun sıcaklıkta yapılmıştır.

3.3. PS, Poli(CMS-co-DVB) ve APBA Bağlı Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Ters-büyükölükçe ayırma kromatografisi, ISEC

Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin Ters-büyükölükçe Ayırma Kromatografisi (ISEC) ile gözeneklilik özellikleri belirlenmiştir. Kromatografik çalışmalardan önce, sentezlenen partiküller 4.6 mm iç çapında ve 50 mm uzunluğundaki çelik kolona (Schimadzu, Japonya) doldurulmuştur. Partiküllerin dolum işlemi HPLC sisteminde (Hewlett Packard, Japonya), distile su ile gerçekleştirilmiştir.

Partiküller kolon içerisinde boşluk kalmayacak şekilde doldurulduktan sonra 15'er dk. boyunca kolondan sırasıyla asetonitril, THF ve tekrar asetonitril geçirilmiştir. Böylelikle partiküller kolon içerisinde iyice yerleştirilmiştir. Daha sonra kolonun HPLC cihazına ters bağlanması ile kolondan ters yönde akış uygulanmış ve 30 dk. distile su geçirilmesi ile partiküllerin kolona iyice dolgulanması sağlanmıştır.

ISEC çalışmalarında HPLC cihazı (SHIMADZU Liquid Chromatography, Japonya) izokratik konumda çalıştırılmış ve mobil faz olarak THF kullanılmıştır. THF akış hızı 1 mL/dk değerinde sabit tutularak, moleköl ağırlığı 1000-2.000.000 arasında değişen sekiz farklı polistiren (PS) standart ve toluen kolona enjekte edilmiştir. HPLC cihazının UV dedektörü 254 nm'de çalışılarak her bir standart için alıkonma süresi tayin edilmiştir. Toluene ve PS standartlara ait alıkonma hacimleri kolonların gözeneklilik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla hesaplanmıştır.

Ortalama gözenek çapının belirlenmesi için, öncelikle kullanılan PS standartlara ait hidrodinamik çap değerleri D_p (Å); standartların ağırlıkça ortalama moleköl ağırlık değerleri (M_w) kullanılarak Eş.3.1 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$D_p = 0.62 \times (M_w)^{0.59} \quad (3.1.)$$

Farklı PS standartlar için hidrodinamik çap değerleri ve ISEC'den elde edilen alıkonma hacimleri Ferreira tarafından geliştirilen algoritmada kullanılarak, kolon malzemesine ait ortalama gözenek boyutu, gözenek boy dağılımı, gözeneklilik oranı hesaplanmıştır (Ferreira, et al., 2003). Gözeneklilik özelliklerinin hesaplanmasında toluene ve moleköl ağırlığı 2.000.000 olan PS standart kullanılmıştır.

Toluen kolondaki bütün gözeneklere girebilecek yeterince küçük bir molekül olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle ISEC ile elde edilen tolueenin alıkonma hacmi, kolon içerisinde toplam boşluk hacmini vermiştir. 2.000.0000 molekül ağırlığındaki PS standardın ise partiküllerdeki hiç bir gözeneğe giremediği varsayılmıştır. Bu nedenle bu standardın alıkonma hacmi ile ise partiküller arası boşluk hacmi bulunmuştur.

Kolonda partiküllere ait gözenek hacmi ($V_{gözenek}$) ise toplam boşluk hacminden partiküller arasındaki boşluk hacmi çıkarılarak bulunmuştur. Bu varsayımlar temelinde gözeneklilik oranı (% P) Eş.3.2 yardımıyla hesaplanmıştır. Bu ifade de $V_{katı}$, partikül katı iskeletinin hacmini ifade etmektedir ve kolonun toplam hacminden tolueenin alıkonma hacmi çıkarılarak bulunmuştur.

$$\% P = \frac{V_{gözenek}}{(V_{gözenek} + V_{katı})} \times 100 \quad (3.2.)$$

ISEC analizlerinde kullanılan diğer bir önemli parametrede PS standartlara ait dağılım katsayısı K_0 'dır. Eş.3.3'e göre hesaplanan bu ifadede, V_a analizi yapılan PS standardın alıkonma hacmi, V_{toluen} ve $V_{2.000.000}$ ise sırası ile toluen ve en yüksek molekül ağırlıklı PS standardın alıkonma hacmini göstermektedir. Bu değer kolonlara ait birincil kalibrasyon eğrilerinin çiziminde kullanılmıştır.

$$K_0 = \frac{V_a - V_{2.000.000}}{V_{toluen} - V_{2.000.000}} \quad (3.3.)$$

3.3.2. BET (Brunauer-Emmet-Teller) analizi

Yüzey alanı, Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) ile çok noktalı analiz yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla partiküller 70°C'de 24 saat boyunca etüvde kurutulmuştur. Cihaz hücreğine yerleştirilen yaklaşık 1 g kurutulmuş partikül, 6 saat boyunca vakumlanmıştır. Analiz sıvı azot içerisine yerleştirilen örnek hücreğinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gazı basıncından hesaplanması temeline dayanır.

3.3.3. Taramalı elektron mikroskobu, SEM

Monodispers ve gözenekli PS, poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ortalama partikül boyu ve boy dağılımı için taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JEM 1200EX, Japonya) ile elde edilen mikroskop fotoğrafları kullanılmıştır. Partiküller vakum altında kurutulmuş ve 3000-20000X büyütme ile SEM cihazında fotoğraflanmıştır. Yaklaşık 50-60 partikül içeren SEM fotoğraflarının değerlendirilmesi ile, sayıca ortalama partikül boyu ve boy dağılımı için standart sapma (standard deviation, SD) ve % değişim katsayısı (coefficient of variation %, CV %) değerleri belirlenmiştir.

$$D_p = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_T} \quad (3.4.)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (D_i - D_p)^2}{N_T - 1}} \quad (3.5.)$$

$$\% CV = \frac{SD}{D_p} \quad (3.6.)$$

Eş.3.4'teki D_p (μm), sayıca ortalama partikül çapı; N_i (adet), D_i çapındaki partiküllerin sayısı; D_i (μm), i nolu partikül çapı; N_T (adet), bir SEM fotoğrafındaki toplam partikül sayısını vermektedir. Sentezlenen partiküllerin monodispersitesini ölçmek amacıyla, her tür partikül için çekilen SEM fotoğrafları değerlendirilmiş ve Eş.3.4 kullanılarak, sayıca ortalama partikül çapı, Eş.3.5 kullanılarak, standart sapma değeri, Eş.3.6 kullanılarak ise % değişim katsayısı hesaplanmıştır.

3.3.4. Potansiyometrik titrasyon

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri için potansiyometrik titrasyon yapılmıştır. Titrasyon için kullanılan 1 g partikül, % 0.5'lik HCl çözeltisi ile 3 kere, ardından su ile 3 kere 5000 rpm'de 5 dk. yıkanmıştır. 30 mL % 2'lik NaOH çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltinin 5 mL'si titrasyon için ayrılmıştır. 20 mL 0.5 M NaOH çözeltisi ile 1 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri etkileştirilmiş ve 2 saat manyetik karıştırıcıda 300 rpm karıştırma hızıyla karıştırılmıştır. Ayrılan 5 mL'lik NaOH çözeltisi 10 mL distile su ile seyreltilerek 0.1 M HCl çözeltisi ile titrasyon yapılmıştır.

2 saat sonunda partikül ile etkileştirilen NaOH çözeltisi 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek, partiküller üzerindeki süpernatanttan süzülerek alınan 5 mL örnek titrasyon için ayrılmıştır. Aynı şekilde 10 mL distile su ile seyreltilen 5 mL'lik örneğin 0.1 M HCl ile titrasyonu yapılmıştır. Titrantın örnek içerisine her eklenişle, örneğin değişen pH değeri, pH metre ile belirlenmiştir. Bu şekilde her iki hacim için yapılan titrasyon sonucunda, titrant hacmine karşı pH değerleri grafiğe geçirilmiştir. İki grafikte de pH'ın nötr olduğu titrant hacmi belirlenerek, titrant hacimleri arasındaki farktan 1 g partiküle bağlanan APBA miktarı hesaplanmıştır.

3.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Deneyleri


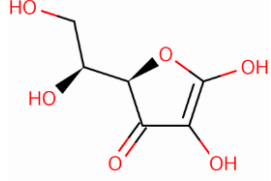

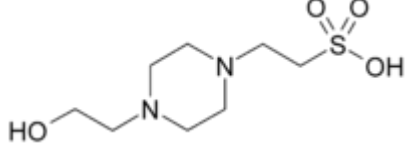
Bu çalışmada APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri destek malzemesi olarak boronat afinite kromatografisinde kullanılmış ve diol gruplu moleküllerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedef molekül olarak seçilen ribonükleik asit (RNA) ve askorbik asit izolasyon yeteneği, kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri ile belirlenmiştir.

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü ile RNA ve AA izolasyonu için en uygun adsorpsiyon koşullarını belirleyebilmek amacıyla, adsorpsiyon üzerindeki derişim, pH, zaman ve adsorban derişimi etkileri incelenmiştir. Bu deneyler neticesinde, hedef molekül için en uygun adsorpsiyon ve desorpsiyon koşulları belirlenmiştir. RNA ve AA için yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon deneylerinde aynı metot kullanılmıştır. RNA ve AA özellikleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. RNA ve askorbik asit özellikleri.

Kimyasal Madde	Firma	Fonksiyon	Kimyasal Yapı
Ribonükleik asit (RNA from torula yeast, Type VI)	 SIGMA-ALDRICH Almanya	Adsorbat	

Çizelge 3.5. devam ediyor.

Askorbik asit (Reagent grade)	 Almanya	Adsorbat	 $C_6H_8O_6$
HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit)	 Almanya	Tampon Çözelti	 $C_8H_{18}N_2O_4S$

3.4.1. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu deneyleri

Adsorpsiyon deneyleri derişim, pH, zaman ve adsorban etkisi olmak üzere dört adımda yapılmıştır. İlk olarak yapılan derişim etkisi deneyi ile APBA bağı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonunda, optimum diol gruplu molekül derişimi belirlenmiştir. İkinci olarak yapılan pH etkisi ile, adsorbat izolasyonu için çalışılabilecek en uygun pH değerleri tespit edilmiş ve bulunan en uygun derişim değerinin doğruluğu teyit edilmiştir. Aynı şekilde, zaman ve adsorban etkisi ile, adsorpsiyon için en uygun zaman ve adsorban miktarları belirlenmiştir. pH etkisi deneylerinde, adsorpsiyonun en düşük olduğu pH değerlerinde RNA ve AA desorpsiyonu yapılmıştır. RNA ve AA'nın bütün adsorpsiyon ve desorpsiyon deneyleri için tampon çözelti 0.05 M HEPES çözeltisi olarak seçilmiştir.

3.4.1.1. Derişim etkisi

Derişim etkisi deneyleri için 250 mL distile su içerisinde 3 g HEPES çözünerek 0.05 M HEPES tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan HEPES tamponunun pH değeri 5 M NaOH çözeltisi ile 8.5 olarak ayarlanmıştır. RNA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7 ve 10 mg RNA/mL, AA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg AA/mL derişimlerinin her biri için 0.05 g APBA bağı poli(CMS-co-DVB) partikülü adsorban olarak kullanılmıştır.

Her derişim değeri için santrifüj tüplerine 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü koyularak, pH 8.5 değerindeki HEPES tamponu ile yaklaşık 5 kere 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjleme-dekantasyon işlemleri yapılarak, partiküller içindeki kirlilik giderilmiştir. RNA için 258 nm, AA için 260 nm'de partiküllerin tampon çözelti ile yıkanmasından sonra okunan absorbans değeri 0.05'in altına düşürülmüştür.

Her derişim için 20 mL'lik adsorpsiyon şişelerine 15'er mL HEPES tamponu konularak ve 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg adsorbat/mL derişimleri için sırasıyla 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 105, 150 ve 180 mg adsorbat 15 mL'lik tamponların içinde çözülmüştür. Böylelikle 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg adsorbat/mL derişimlerindeki adsorpsiyon ortamları hazırlanmıştır. Her derişimdeki adsorpsiyon şişelerinin pH değeri 5 M NaOH ile 8.5 olarak ayarlanmış ve 15 mL'lik adsorpsiyon ortamlarından 5'er mL, A_0 değerlerini okumak için ayrılmıştır. Kalan her 10 mL'lik adsorpsiyon ortamı ile 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküller etkileştirilmiştir.

Partiküller ile etkileşen adsorpsiyon ortamının pH değeri değişeceği için, adsorpsiyon başlatılmadan pH değerleri kontrol edilmiş ve tekrar 8.5 değerine ayarlanmıştır. Son olarak, adsorpsiyon şişeleri oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak, adsorpsiyonun olması sağlanmıştır. 1 saat sonunda manyetik karıştırıcıdan alınan adsorpsiyon şişelerindeki partiküllü adsorpsiyon ortamı 10 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerden alınan süpernatant tekrar 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek içerisinde kalan partiküllerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Son olarak süpernatant tüplerden süzülerek alınmış ve A_f değerlerini okumak için saklanmıştır.

RNA için, 258 nm ve AA için 260 nm'de A_0 ve A_f değerleri 2'nin altında bir absorbans değeri verecek şekilde aynı oranlarda HEPES tamponu ile seyreltilerek UV cihazında (SHIMADZU, UV-Visible Spectrophotometer UV-1601, Japonya) süzülerek okunmuştur. Okunan A_0 ve A_f değerlerinden, 1 g partikülün adsorpladığı adsorbat miktarını yani adsorplama kapasitesini belirlemek için Eş.3.7 kullanılmıştır.

$$Q = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times \frac{C_0 \times V}{m_a} \quad (3.7.)$$

Denklemdaki Q (mg adsorbat/g adsorban) değeri adsorplama kapasitesini, C_0 (mg adsorbat/mL) değeri başlangıç adsorbat derişimi, V (mL) adsorpsiyon hacmini, m_a (g) adsorban kütlesini, A_0 ve A_f değerleri sırasıyla adsorpsiyondan önce ve sonra okunan absorbands değerlerini göstermektedir. Her derişimdeki Q değerleri hesaplanarak; adsorbat derişimlerine karşı (C_0 (mg adsorbat/mL)), adsorplama kapasiteleri (Q (mg adsorbat/g adsorban)) için çizilen grafikte, eğrinin platoya erdiği derişim değeri, RNA ve AA adsorpsiyonu için en uygun adsorbat derişimi olarak belirlenmiştir.

3.4.1.2. pH etkisi

pH etkisi deneyleri için 250 mL distile su içerisinde 3 g HEPES çözünerek 0.05 M HEPES tamponu hazırlanmıştır. pH etkisi deneyleri için hazırlanan tampon çözeltisi 8 eşit hacme ayrılarak; pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9 ve 10 olarak 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltisi ile ayarlanmıştır. RNA ve AA için; derişim etkisi deneylerinde elde edilen optimum derişimlerde, adsorpsiyon ortamı 15'er mL olarak 8 adet adsorpsiyon şişesinde hazırlanmıştır. Her bir pH değeri için 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü kullanılmıştır.

8 farklı pH değeri için 8 tane santrifüj tüpüne 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü koyularak, pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9 ve 10 olan HEPES tamponu ile yaklaşık 5 kere 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjleme-dekantasyon işlemi yapılarak, partiküller içindeki kirlilik giderilmiştir. RNA için 258 nm, AA için 260 nm'de partiküllerin tampon çözelti ile yıkanmasından sonra okunan absorbands değeri 0.05'in altına düşürülmüştür.

Her pH değeri için 20 mL'lik adsorpsiyon şişelerine pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9 ve 10 olan 15'er mL HEPES tamponu konularak, optimum derişim değeri için gereken RNA ve AA tampon içinde çözülmüş ve pH değerleri tekrar kontrol edilmiştir. Böylelikle pH değerleri 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9 ve 10 olan sabit derişimlerdeki adsorpsiyon ortamları hazırlanmıştır. 15 mL'lik adsorpsiyon ortamlarından 5'er mL A_0 değerlerini okumak için ayrılmıştır. Kalan her 10 mL'lik adsorpsiyon ortamı ile 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri etkileştirilmiştir.

Partiküller ile etkileşen adsorpsiyon ortamının pH değeri kontrol edilmiştir. Son olarak, adsorpsiyon şişeleri oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak, adsorpsiyonun olması sağlanmıştır. 1 saat sonunda manyetik karıştırıcıdan alınan adsorpsiyon şişelerindeki partiküllü adsorpsiyon ortamı 10 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerden alınan süpernatant tekrar 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek içerisindeki partiküllerden arındırılmıştır.

Son olarak, süpernatant tüplerden süzülerek alınmış ve A_f değerlerini okumak için saklanmıştır. RNA için, 258 nm ve AA için 260 nm'de A_o ve A_f değerleri 2'nin altında bir absorbans değeri verecek şekilde aynı oranlarda HEPES tamponu ile seyreltilerek UV cihazında süzülerek okunmuştur. Okunan A_o ve A_f değerlerinden, 1 g partikülün adsorplama kapasitesini belirlemek için Eş.3.7 kullanılmıştır. Her pH değerindeki Q değerleri hesaplanarak; pH değerlerine karşı adsorplama kapasiteleri (Q (mg adsorbat/g adsorban)) için çizilen grafikte, RNA ve AA adsorpsiyon ve desorpsiyonu için en uygun pH değerleri belirlenmiştir.

3.4.1.3. Adsorban derişimi etkisi

Adsorban derişimi etkisi deneyleri için 250 mL distile su içerisinde 3 g HEPES çözünerek 0.05 M HEPES tamponu hazırlanmıştır. Adsorban derişimi etkisi deneyleri için hazırlanan HEPES tamponunun pH değeri, 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltisi ile pH etkisi deneylerinde adsorpsiyon için bulunan en uygun değerlere ayarlanmıştır. Derişim etkisi deneylerinde elde edilen en uygun derişimlerde, adsorpsiyon ortamı 15'er mL olarak adsorpsiyon şişesinde hazırlanmıştır. Adsorban etkisi deneyleri için sabit derişimde ve belli bir pH değerinde; 0.01, 0.0175, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.3 g olmak üzere farklı miktarlarda adsorban olarak APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü kullanılmıştır.

Santrifüj tüplerine, 0.01, 0.0175, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.3 g olmak üzere farklı miktarlarda adsorban koyularak, optimum pH değerindeki HEPES tamponu ile yaklaşık 5 kere 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjleme-dekantasyon işlemi yapılarak, partiküller içindeki kirlilik giderilmiştir. Partiküllerin tampon çözelti ile yıkanmasından sonra, RNA için 258 nm, AA için 260 nm'de okunan absorbans değeri 0.05'in altına düşürülmüş ve partiküllere adsorpsiyon ortamı tanıtılarak kirlilik giderilmiştir.

Her adsorban miktarı için 20 mL'lik adsorpsiyon şişelerine, 15'er mL optimum pH değerindeki HEPES tamponu koyulmuş ve optimum derişim değeri için gereken RNA ve AA tampon içinde çözülmüş ve pH değerleri tekrar kontrol edilmiştir. Böylelikle belli bir pH değerine sahip, sabit derişimlerdeki adsorpsiyon ortamları hazırlanmıştır. 15 mL'lik adsorpsiyon ortamlarından 5'er mL A_0 değerlerini okumak için ayrılmıştır. Kalan her 10 mL'lik adsorpsiyon ortamları ile 0.01, 0.0175, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.3 g adsorban sırasıyla etkileştirilmiştir.

Partiküller ile etkileşen adsorpsiyon ortamlarının pH değerleri değışeceği için, adsorpsiyon başlatılmadan pH değerleri kontrol edilmiştir. Son olarak, adsorpsiyon şişeleri oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak, adsorpsiyonun olması sağlanmıştır. 1 saat sonunda manyetik karıştırıcıdan alınan adsorpsiyon şişelerindeki partiküllü adsorpsiyon ortamı, 10 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerden alınan süpernatant tekrar 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek süpernatant tüplerden süzülerek alınmıştır.

RNA için, 258 nm ve AA için 260 nm'de A_0 ve A_f değerleri 2'nin altında bir absorbans değeri verecek şekilde aynı oranlarda HEPES tamponu ile seyreltilerek UV cihazında süzülerek okunmuştur. Okunan A_0 ve A_f değerlerinden, 1 g partikülün adsorplama kapasitesini belirlemek için Eş.3.7 kullanılmıştır. Farklı adsorban miktarlarındaki Q değerleri hesaplanarak; adsorban miktarlarına (m_a (g adsorban)) karşı adsorplama kapasiteleri (Q (mg adsorbat/g adsorban)) için çizilen grafikte, RNA ve AA adsorpsiyonu için en uygun adsorban miktarları belirlenmiştir.

3.4.1.4. Adsorpsiyon hızı

Zaman etkisi deneyleri için 200 mL distile su içerisinde 2.4 g HEPES çözünerek 0.05 M HEPES tamponu hazırlanmıştır. Zaman etkisi deneyleri için hazırlanan HEPES tamponunun pH değeri, 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltisi ile pH etkisi deneylerinde adsorpsiyon için bulunan optimum değerlere ayarlanmıştır. derişim etkisi deneylerinde elde edilen optimum derişimlerde, adsorpsiyon ortamı 45 mL olarak 50 mL'lik bir adsorpsiyon şişesinde hazırlanmıştır. Zaman etkisi deneyleri için sabit derişimde ve belli bir pH değerinde, 0.2 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü adsorban olarak kullanılmıştır.

0.2 g adsorban, optimum pH değerindeki HEPES tamponu ile yaklaşık 5 kere 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjleme-dekantasyon işlemleri yapılarak, partiküller içindeki kirlilik giderilmiştir. RNA için 258 nm, AA için 228 nm'de partiküllerin tampon çözeltisi ile yıkanmasından sonra okunan absorban değeri 0.05'in altına düşürülmüş ve partiküllere adsorpsiyon ortamı tanıtılarak kirlilik giderilmiştir. 45 mL'lik adsorpsiyon ortamından 5 mL A_0 değerini okumak için ayrılır. Kalan 40 mL'lik adsorpsiyon ortamları ile 0.2 g adsorban etkileştirilir. Partiküller ile etkileşen adsorpsiyon ortamının pH değeri değişeceği için, adsorpsiyon başlatılmadan pH değerleri kontrol edilmiştir. Son olarak, adsorpsiyon şişeleri oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de karıştırılarak adsorpsiyon başlatılmıştır.

10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 ve 150. dakikalarda manyetik karıştırıcıda karışmakta olan adsorpsiyon şişesinden alınan 3 mL hacimdeki partiküllü adsorpsiyon ortamı, 10 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüpteki süpernatanttan 1 mL alınmış ve tekrar 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek içerisindeki partiküllerin tekrar çökmesi sağlanmıştır.

Son olarak süpernatant, santrifüj tüpünden süzülerek alınmıştır. RNA için 258 nm, AA için 228 nm A_0 ve A_f değerleri 2'nin altında bir absorban değeri verecek şekilde aynı oranlarda HEPES tamponu ile seyreltilerek UV cihazında süzülerek okunmuştur. Okunan A_0 ve A_f değerlerinden, 1 g partikülün adsorplama kapasitesini belirlemek için Eş.3.7 kullanılmıştır. Farklı zaman aralıklarındaki Q değerleri hesaplanarak; zamana (t (dk.)) karşı adsorplama kapasiteleri (Q (mg adsorbat/g adsorban)) için çizilen grafikte, RNA ve AA adsorpsiyonu için en uygun zaman belirlenmiştir.

3.4.2. Ribonükleik asit ve askorbik asit desorpsiyonu deneyleri

RNA ve AA için yapılan adsorpsiyon deneyleri ile adsorpsiyonun yapılabileceği en uygun adsorbat derişimi, pH değeri, adsorban miktarı ve zaman belirlenmiştir. RNA ve AA desorpsiyonu için 250 mL distile su içerisinde 3 g HEPES çözünerek 0.05 M HEPES tamponu hazırlanmıştır. Desorpsiyon için, pH etkisi deneyinde en düşük adsorpsiyon kapasitesi değerini veren ve çalışılan adsorbatın yapısını olumsuz etkilemeyen bir pH değeri seçilmiştir.

Hazırlanan HEPES tamponunun pH değeri, 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltisi ile desorpsiyon için seçilen pH değerine ayarlanmıştır. Böylece desorpsiyon ortamı uygun pH değerindeki HEPES tamponu olarak hazırlanmıştır.

Değişim etkisi deneylerinde, adsorpsiyon yapıldıktan sonra santrifüj tüplerine alınan adsorbanların üzerindeki süpernatant dekantasyon işlemi ile alınmıştır. Her bir santrifüj tüpündeki adsorban, 10 mL'lik desorpsiyon ortamı olan HEPES tamponu ile 20 mL'lik desorpsiyon şişelerine alınmıştır. Partiküller ile etkileşen desorpsiyon ortamının pH değeri değişeceği için, desorpsiyon başlatılmadan pH değerleri kontrol edilmiştir. Son olarak, desorpsiyon şişeleri oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak, desorpsiyonun olması sağlanmıştır.

Değişim etkisi deneylerinde 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg adsorbat/mL derişimlerinde yapılan adsorpsiyonların, desorpsiyonları yapılmıştır. 1 saat sonunda manyetik karıştırıcıdan alınan desorpsiyon şişelerindeki partiküllü desorpsiyon ortamı 10 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatant alınmış ve tekrar 5000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek içerisindeki partiküllerin tekrar çökmesi sağlanmıştır. Son olarak süpernatant tüplerden süzülerek alınmıştır.

RNA ve AA'nın desorpsiyonu için, A_f değerleri sırasıyla 258 nm ve 267 nm'de 2'nin altında bir absorbans değeri verecek şekilde, derişim etkisi deneylerindeki A_0 değerleri ile aynı oranlarda HEPES tamponu ile seyreltilerek UV cihazında süzülerek okunmuştur. RNA ve AA'nın derişim etkisi deneyinde, adsorbat derişimlerine (C_0 (mg adsorbat/mL) karşı, adsorpsiyondan önce okunan absorbans değerlerinin (A_0) grafiği çizilmiştir. Çizilen bu grafikten, desorpsiyon deneylerinde elde edilen A_f değerleri kullanılarak C_f değerlerine ulaşılmıştır.

Daha sonra, Eş.3.8 kullanılarak desorpsiyon miktarı yani desorplanan adsorbat miktarı hesaplanmıştır.

$$Q_d = C_f \times V \quad (3.8.)$$

Denklemdaki Q_d (mg adsorbat) değeri desorpsiyon miktarı, C_f (mg adsorbat/mL) değeri desorpsiyon ortamının desorpsiyondan sonraki adsorbat derişimi, V (mL) desorpsiyon hacmini göstermektedir. Her derişimdeki Q_d değerleri hesaplanmış,

% desorpsiyon değerinin hesaplanabilmesi için, derişim etkisi deneylerindeki adsorpsiyon miktarı Eş.3.9 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q_a = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times (C_0 \times V) \quad (3.9.)$$

Denklemdaki Q_a (mg adsorbat) değeri adsorpsiyon miktarı, A_0 ve A_f değerleri sırasıyla adsorpsiyondan önce ve sonra okunan absorbans değerlerini, C_0 (mg adsorbat/mL) değeri başlangıç adsorbat derişimi, V (mL) adsorpsiyon hacmini göstermektedir. Her derişimdeki Q_a değerleri ve Eş.3.10 kullanılarak her adsorbat derişimi için % desorpsiyon değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{Q_d}{Q_a} \times 100 \quad (3.10.)$$

Hesaplamalardan sonra, her adsorbat derişimine (C_0 (mg adsorbat/mL)) karşı, % desorpsiyon değerlerinin grafiği çizilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Poli(CMS-co-DVB) partikülleri çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Çalışma için reaktif klorometil grubunun seçilmesinin nedeni, grubun kolaylıkla türevlendirilebilir karakterde olmasıdır. Mevcut çalışmaların çoğunda klorometil fonksiyonel grubuna sahip partiküller genelde 4-klorometilstiren monomerinden çıkılarak sentezlenmektedir.

Sentezlenen poli(CMS-co-DVB) partiküllerine tek basamaklı nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile 3-aminofenilboronik asit bağlanmıştır. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri kesikli sistemde boronat afinite kromatografisi yoluyla diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla ribonükleik asit ve askorbik asit model molekül olarak denenmiştir. Kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri ile sentezlenen yapının diol grubu içeren farklı moleküller için izolasyon yeteneği belirlenmiştir.

4.1. Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu

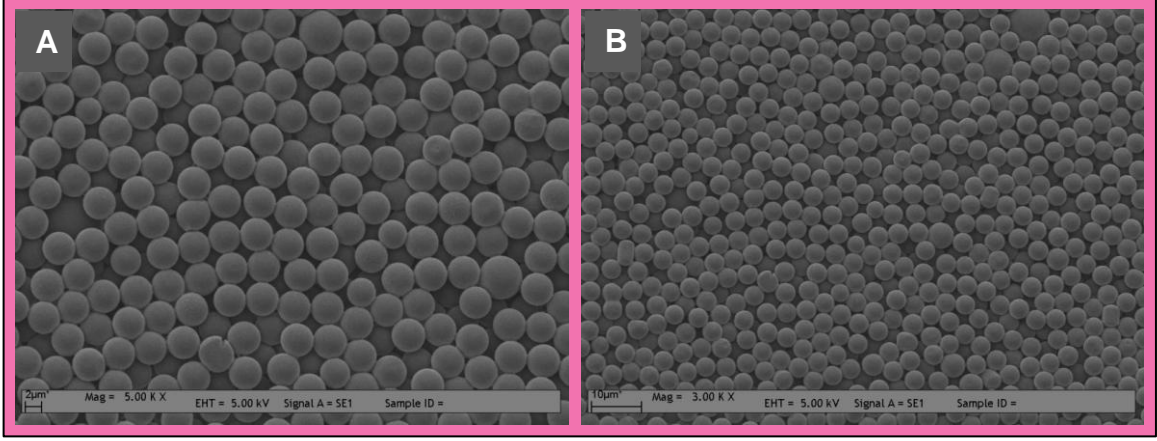
4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu, SEM

Reaktif formda monodispers poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküllerin sentezi için çıkış lateksi olarak kullanılan polistiren partiküllerin özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen PS partiküller, 3.31 μm boyutunda ve monodispers formdadır. % CV değerinin, % 10'un altında olması, çıkış lateksinin monodispers formda olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Polistiren partiküllerin boy ve boy dağılım özellikleri.

Ortalama partikül çapı, D_p (μm)	3.31
Standart sapma, SD (μm)	0.207
% Değişim katsayısı, % CV	6.13

Polistiren partiküllerin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğrafları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

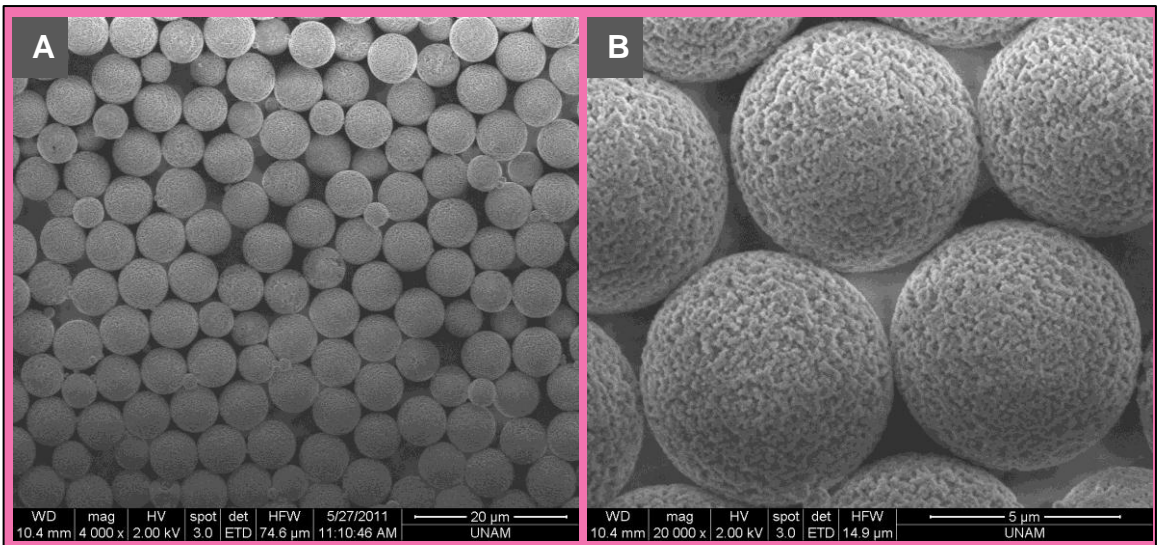


Şekil 4.1. Polistiren partiküllerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 5000X, (B) 3000X.

Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ortalama boy ve boy dağılımı Çizelge 4.2’de, taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğrafları ise Şekil 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özellikleri.

Partikül Özellikleri	PCMS
Ortalama partikül çapı, Dp (µm)	5.9
Standart sapma, SD (µm)	0.24
% Değişim katsayısı, % CV	4.06

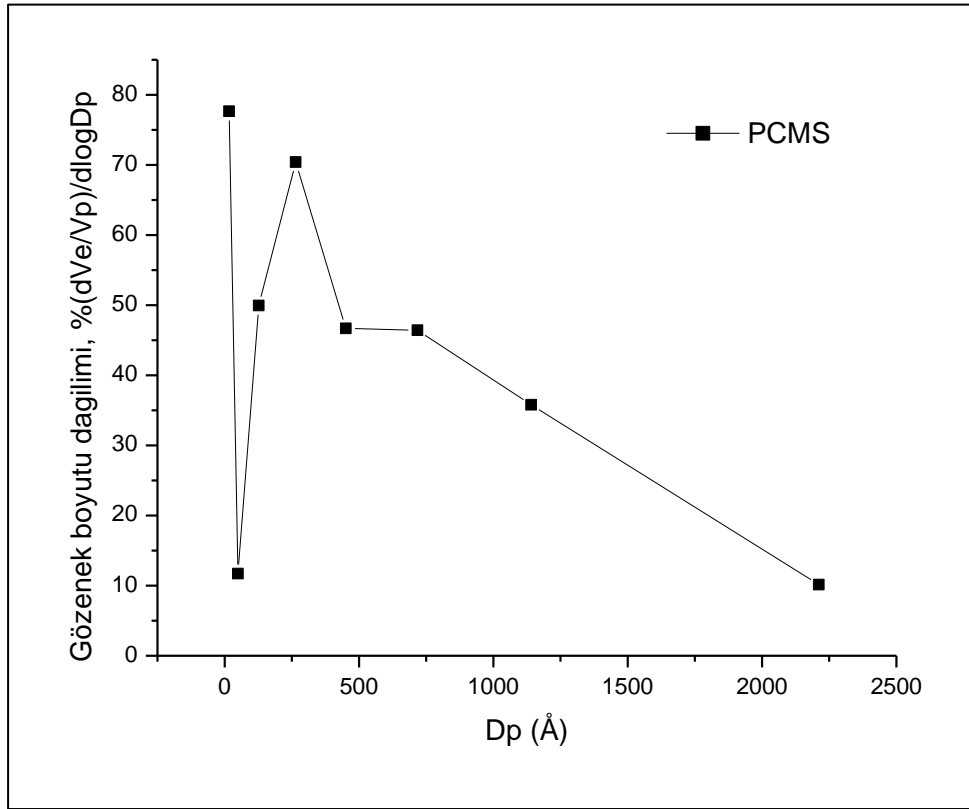


Şekil 4.2. Sentezlenen poli(CMS-co-DVB) partiküllerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 4000X, (B) 20000X.

Görüldüğü gibi poli(CMS-co-DVB) partiküller yaklaşık 6.0 μm boyutunda dar boy dağılımı ile sentezlenmiştir. Değişim katsayısının % 10'un altında olması ise partiküllerin monodispers karakterde olduğunu göstermektedir.

4.1.2. Ters-büyükölçü ayırma kromatografisi (ISEC) ve BET (Brunauer-Emmet-Teller) analizi

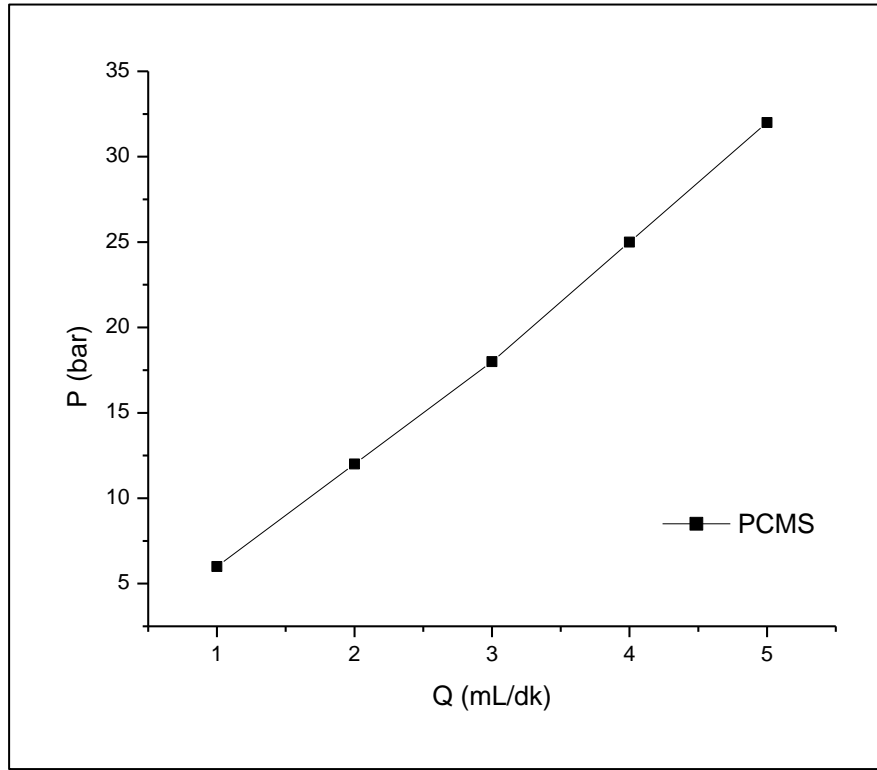
Sentezlenen partiküllerin gözeneklilik özellikleri ters-büyükölçü ayırma kromatografisi metodu ile HPLC'de tayin edilmiştir. Özgöl yüzey alanı değeri ise BET analizi ile belirlenmiştir. ISEC metodu ile elde edilen poli(CMS-co-DVB) partiküllerin gözenek boy dağılım eğrisi Şekil 4.3'te verilmektedir. Bu eğri yardımıyla hesaplanan gözeneklilik özellikleri ve BET analizi ile elde edilen özgöl yüzey alanı değeri Çizelge 4.3'te verilmektedir. Şekil 4.4'te ise poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kolondaki geri basınç-akış hızı grafiği verilmektedir.



Şekil 4.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin ISEC yöntemi ile belirlenen gözenek dağılımı grafiği.

Çizelge 4.3. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin gözeneklilik ve özgül yüzey alanı değerleri.

Partikül	ISEC		BET
	Ortalama Gözenek Çapı (nm)	Gözeneklilik (% v/v)	Yüzey Alanı (m ² /g)
PCMS	24	60	106.7



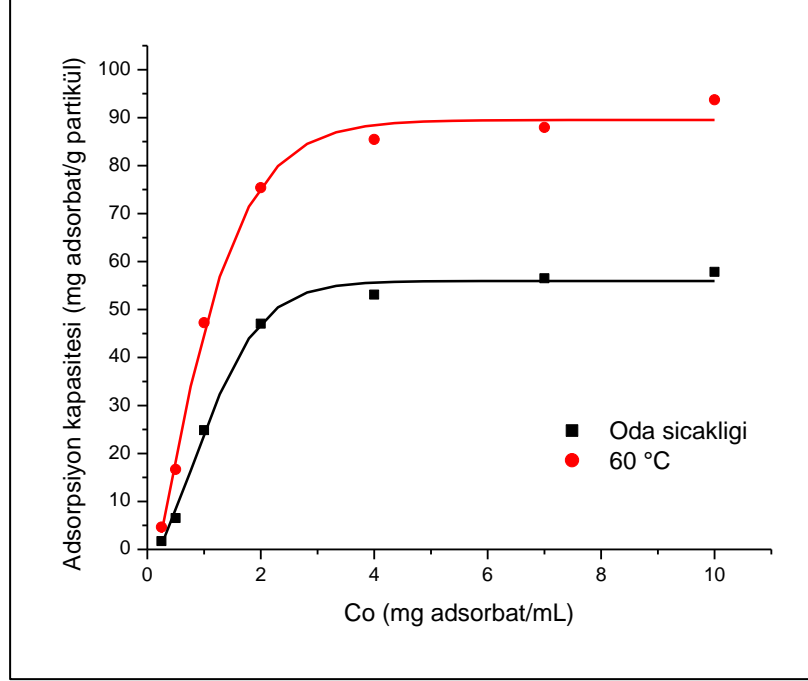
Şekil 4.4. Poli(CMS-co-DVB) partiküllerin kolondaki geri basınç-akış hızı grafiği. Mobil faz: Su, oda sıcaklığı.

4.2. APBA Bağlı Poli(CMS-co-DVB) Partiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. Sıcaklık etkisi

Poli(CMS-co-DVB) partiküller seçilerek, tek basamaklı nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile türevlendirilmiş ve ligand olarak 3-aminofenilboronik asit partiküllere bağlanmıştır. APBA bağlama işlemi oda sıcaklığı ve 60 °C'de yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda APBA bağlanan partiküllerin diol gruplu biyomolekül adsorpsiyonu yetenekleri, hedef molekül olarak alizarin kırmızısı (ASR) ve askorbik asit (AA)

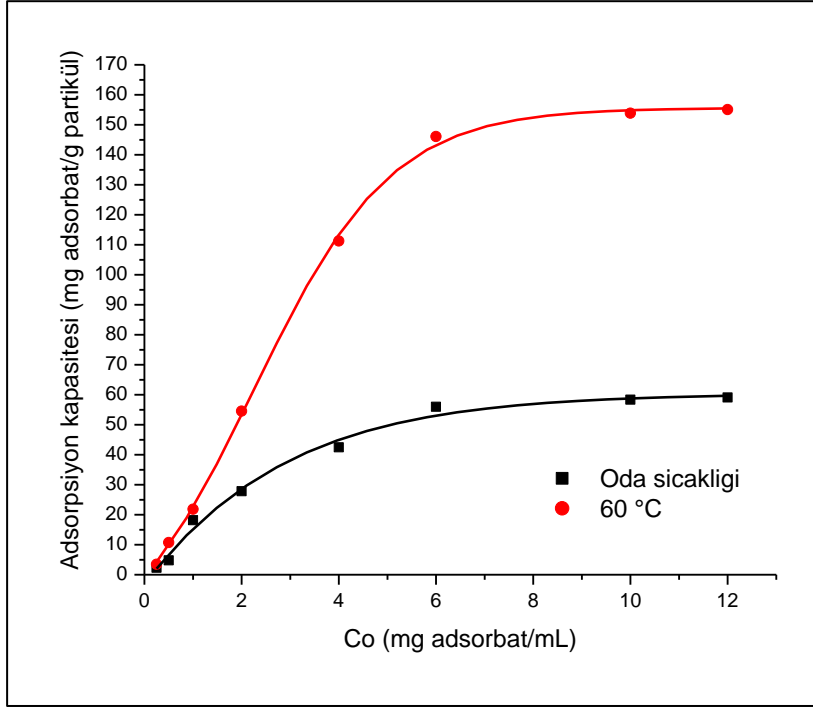
kullanılarak yapılan adsorpsiyon deneyleri ile ölçülmüştür. Şekil 4.5'te alizarin kırmızısı, Şekil 4.6'da ise askorbik asit için yapılan adsorpsiyon deneylerinde, APBA bağlanması için sıcaklık etkileri görülmektedir.



Şekil 4.5. Alizarin kırmızısı ile yapılan adsorpsiyon deneyindeki, 60 °C ve oda sıcaklığında bağlanan ligand için sıcaklık etkisi.

Alizarin kırmızısı için yapılan deneyde; Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, oda sıcaklığında APBA bağlanan partiküllerin denge adsorpsiyon kapasitesi 4 mg adsorbat/mL derişiminde 53 mg ASR/g partikül iken, 60 °C'de APBA bağlanan partiküllerin kapasitesi aynı adsorbat derişiminde 85 mg ASR/g partikül' dür. Dolayısıyla, 60 °C'de yapılan bağlama işlemi ile partiküllere daha yüksek miktarda APBA bağlandığı görülmektedir.

Benzer sonuç, askorbik asit için yapılan adsorpsiyon deneyinde gözlenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, oda sıcaklığında APBA bağlanan partiküllerin adsorplama kapasitesi 7 mg adsorbat/mL derişiminde 55 mg AA/g partikül iken, 60 °C'de APBA bağlanan partiküllerin adsorplama kapasitesi aynı adsorbat derişiminde 147 mg AA/g partikül' dür. Bu sebeple, bu çalışmada bütün adsorpsiyon çalışmaları, 60°C'de APBA bağlanmış poli(CMS-co-DVB) partiküller üzerinden yürütülmüştür. APBA bağlı partiküllerin karakterizasyonu potansiyometrik titrasyon ile yapılmıştır.

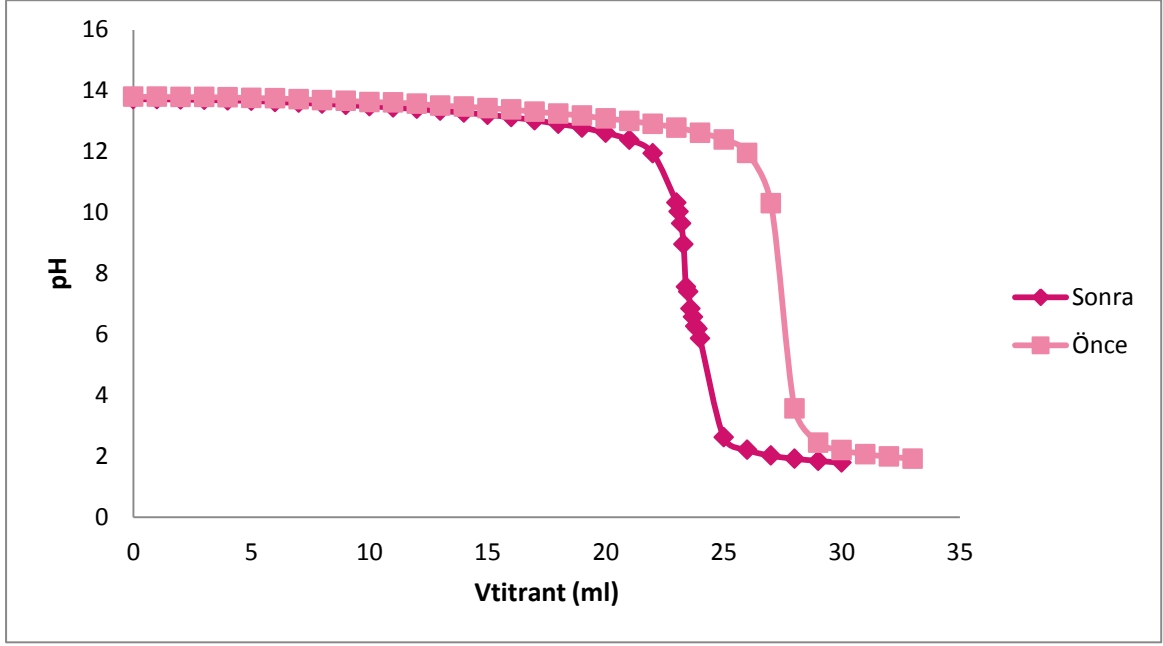


Şekil 4.6. Askorbik asit ile yapılan adsorpsiyon deneyindeki, 60 °C ve oda sıcaklığında bağlanan ligand için sıcaklık etkisi.

4.2.2. Potansiyometrik titrasyon

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin potansiyometrik titrasyonu ile partiküllere bağlanan APBA miktarı tayin edilmiştir. Bu amaçla, 20 mL 0.5 M NaOH çözeltisi, 1 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikül ile etkileştirilmiştir. Etkileşim öncesi ve sonrası, çözelti 0.1 M HCl çözeltisi ile titre edilerek; eklenen titrant hacmine karşı pH değişimi grafiği çizilmiştir. Şekil 4.7'de, etkileşim öncesi ve sonrası için çizilen potansiyometrik titrasyon grafikleri görülmektedir.

Partiküller ile etkileştirilmeden önce yapılan titrasyonda eş değerlik noktasına 27.5 mL titrant hacminin eklenmesi ile ulaşılmıştır. Aynı derişimdeki NaOH çözeltisi ile 2 saat etkileştirilen 1 gram poli(CMS-co-DVB) partiküllerine bağlanmış olan APBA, NaOH çözeltisindeki OH⁻ iyonları ile etkileşerek tetrahedral bir yapıya sahip olur ve NaOH çözeltisindeki OH⁻ iyonlarının azalmasına sebep olur. Dolayısı ile APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri ile etkileşmiş olan NaOH çözeltisinin titrasyonu sonucunda, OH⁻ iyonlarının azalması sebebiyle, titrant hacminde azalma olmuştur ve eşdeğerlik noktasına 23.5 mL titrant hacminin eklenmesi ile ulaşılmıştır.



Şekil 4.7. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküller ile NaOH çözeltisinin etkileşim öncesi ve sonrası potansiyometrik titrasyon eğrileri.

Şekil 4.7'den görüldüğü gibi iki eğri için elde edilen eşdeğerlik noktası değerleri arasında 4 mL'lik bir fark bulunmaktadır. Bu fark partiküllere bağlı APBA tarafından harcanan NaOH'a karşılık gelmektedir. Bu fark değeri kullanılarak partiküllere bağlanan APBA miktarı 75 mg APBA/g partikül olarak belirlenmiştir.

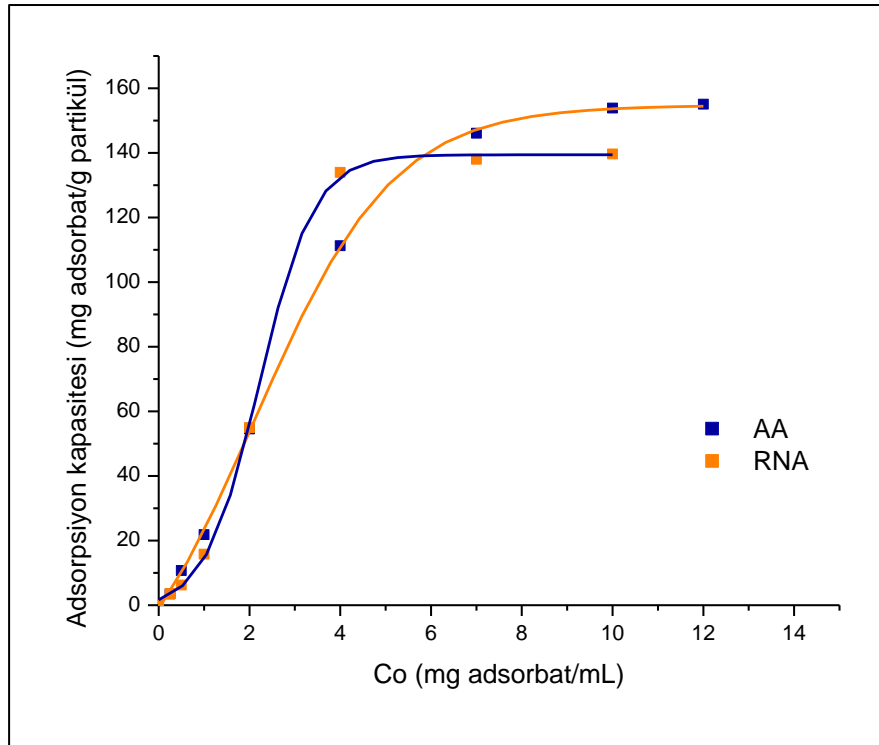
4.3. Kesikli Sistemde Ribonükleik Asit ve Askorbik Asit Adsorpsiyon Çalışmaları

3-aminofenilboronik asit bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri boronat afinite kromatografisi yoluyla, diol gruplu molekül olarak askorbik asit (AA) ve ribonükleik asit (RNA) izolasyonunda kullanılmıştır. Bu çalışmada yapılan adsorpsiyon deneylerinde; diol gruplu moleküle özgü, adsorpsiyona etki eden parametrelerin en uygun değerleri belirlenmiştir.

İlk olarak adsorbat derişiminin partiküllerin adsorpsiyon kapasitesine etkisi, daha sonra sırasıyla pH, zaman ve adsorban derişimi etkileri, RNA ve AA için yapılan deneyler ile belirlenmiştir. Adsorpsiyona etki eden parametrelerin etkileri RNA ve AA için aynı grafik üzerinde verilmiş ve karşılaştırılmıştır.

4.3.1. Derişim etkisi

Diol gruplu moleküllerin derişimi etkisi; 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin 10 mL adsorpsiyon ortamı içerisinde yani 5 mg adsorban/mL adsorban derişimi ile, pH 8.5 değerinde, 60 dk. etkileştirilmesi ile ölçümlenmiştir. Bu amaçla çalışılan adsorbat derişimleri RNA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7 ve 10 mg RNA/mL, AA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg AA/mL olarak seçilmiştir.

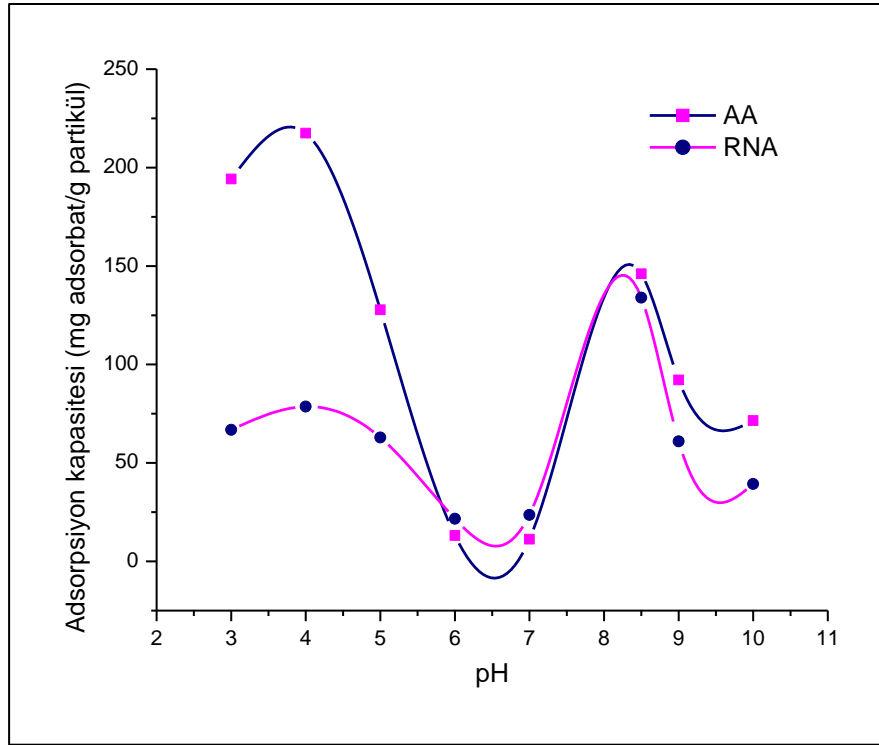


Şekil 4.8. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu üzerindeki diol gruplu moleküllerin başlangıç derişimi etkisi.

Şekil 4.8'de, diol gruplu moleküllerin başlangıç derişiminin partiküllerin adsorpsiyon kapasitesine etkisi görülmektedir. RNA ve AA izotermelerinden görüldüğü gibi her iki tür diol gruplu molekül için sırasıyla 4 mg adsorbat/mL ve 7 mg adsorbat/mL başlangıç derişim değerinden sonra maksimum denge adsorpsiyon kapasitesi değerine ulaşılmıştır. Maksimum denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri, yaklaşık olarak RNA ve AA için sırasıyla 134 ve 147 mg adsorbat/g partikül olarak belirlenmiştir. Bu değerler, APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin diol gruplu molekül adsorpsiyon kapasitelerinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

4.3.2. pH etkisi

Diol gruplu moleküllerin pH etkisi, 0.05 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin; pH 3, 4, 5, 6, 7, 8.5, 9 ve 10 değerlerinde, 10 mL adsorpsiyon ortamı içerisinde, 60 dk. etkileştirilmesi ile ölçümlenmiştir. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin diol gruplu biyomolekül adsorpsiyonuna pH etkisi, RNA ve AA için başlangıç derişimi sırasıyla 4 mg RNA/mL ve 7 mg AA/mL değerinde tutularak incelenmiştir.

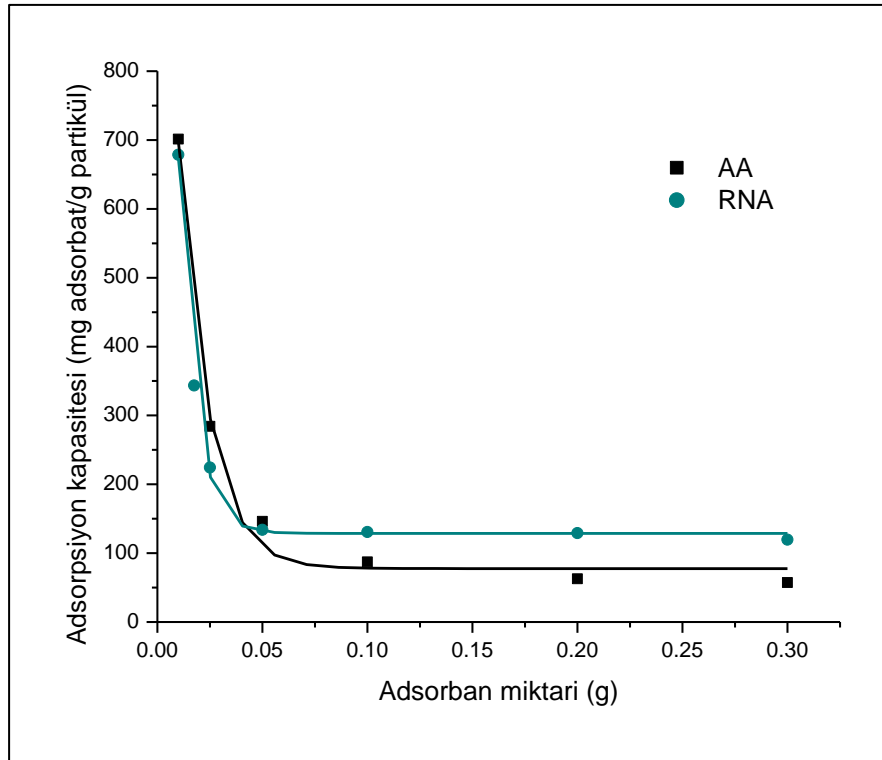


Şekil 4.9. Ribonükleik asit ve askorbik asit adsorpsiyonu üzerindeki pH etkisi.

RNA ve AA için pH'ın denge adsorpsiyon kapasitesine etkisini gösteren Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi adsorpsiyon eğrisinde her iki türdeki molekül için iki ayrı maksimum gözlenmektedir. pH 4 değerinde gözlenen maksimum, büyük olasılıkla elektrostatik çekim kuvveti ile gerçekleşen adsorpsiyon ile ilgilidir. RNA veya AA'da oluşan protonlanma ve protonlanmış grupların, hidrofobik trigonal formadaki anyonik boronik asit ile etkileşimi bu adsorpsiyonun nedeni olabilir. pH 8.5 değerinde gözlenen diğer maksimum ise klasik boronat afinite kromatografisi etkileşim mekanizması ile açıklanabilir. pH 8.5 değerinde, APBA için hidrofilik tetrahedral formun oluşumu ve bu formun diol grubu ile etkileşmeye yatkın oluşu pH 8.5 değerinde adsorpsiyon maksimumu gözlenmesine neden olmaktadır.

4.3.3. Adsorban derişimi etkisi

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin diol gruplu biyomolekül adsorpsiyonuna adsorban derişimi etkisi, RNA ve AA başlangıç derişimi sırasıyla 4 mg RNA/mL ve 7 mg AA/mL değerinde tutularak incelenmiştir. pH 8.5 değerinde, 0.01, 0.0175, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.3 g APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülü içeren 10 mL adsorpsiyon ortamında, yani 1, 1.75, 2.5, 5, 10, 20 ve 30 mg adsorban/mL, adsorban derişimleri ile adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır.

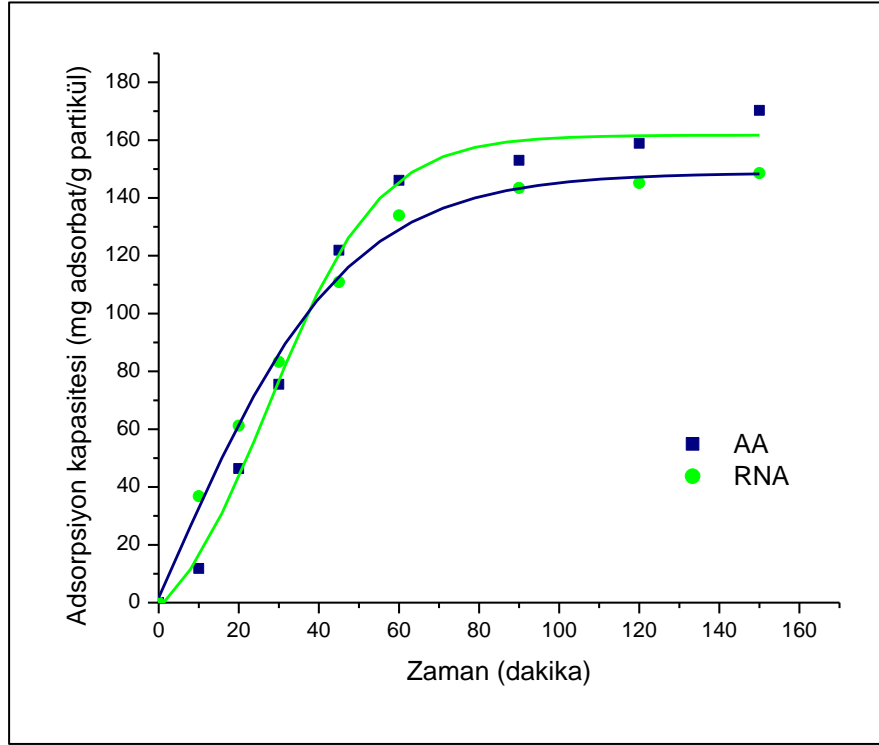


Şekil 4.10. Ribonükleik asit ve askorbik asit için adsorban derişiminin, denge adsorpsiyon kapasitesine etkisi.

RNA ve AA için adsorban derişiminin denge adsorpsiyon kapasitesine etkisi Şekil 4.10'de verilmektedir. Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi her iki diol gruplu molekül için 10 mL adsorpsiyon hacminde 0.05 g adsorban kütlesinden başlayarak, denge adsorpsiyon kapasitesi değeri değişim göstermemiştir. 5 mg adsorban/mL adsorban derişimi ile denge adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır. Bu nedenle adsorpsiyon değişkenlerinin etkilerinin incelenmesi için yapılan diğer deneylerde, 0.05 g sorbent kütlesi değeri kullanılmıştır.

4.3.4. Adsorpsiyon hızı

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin diol gruplu biyomolekül adsorpsiyonuna adsorpsiyon süresinin etkisi, RNA ve AA başlangıç derişimi sırasıyla 4 mg RNA/mL ve 7 mg AA/mL değerinde tutularak incelenmiştir. Bu deneylerde adsorban derişimi 5 mg partikül/mL ve pH 8.5 değerinde tutulmuştur.



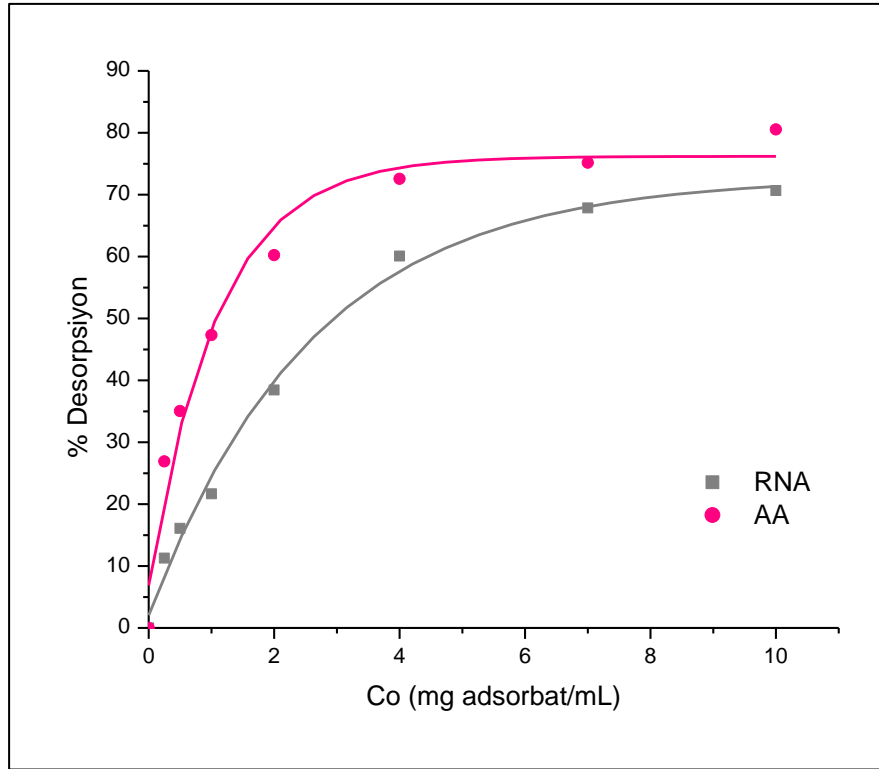
Şekil 4.11. Ribonükleik asit ve askorbik asit için adsorpsiyon süresinin, denge adsorpsiyon kapasitesine etkisi.

RNA ve AA için adsorpsiyon süresinin, adsorpsiyon kapasitesine etkisi Şekil 4.11'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi kullanılan her iki diol gruplu molekül için yaklaşık 60 dakikalık adsorpsiyon süresi ile denge adsorpsiyon kapasitesi değerine ulaşılmaktadır. Bu durum aynı zamanda adsorpsiyon deneylerinde kullanılan 60 dakikalık adsorpsiyon süresinin yeterli olduğunu göstermektedir.

5 mg partikül/mL adsorban derişimi, pH 8.5 değerindeki adsorpsiyon ortamı ve 60 dakika adsorpsiyon süresi sonucunda, RNA'nın 4 mg RNA/mL ve AA'nın 7 mg AA/mL başlangıç derişimi ile, sırasıyla 134 mg RNA/g partikül ve 147 mg AA/g partikül değerlerindeki adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmıştır.

4.3.5. Desorpsiyon davranışı

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllere, adsorplanmış diol gruplu biyomoleküllerin desorpsiyon davranışının incelenmesi amacıyla öncelikle farklı başlangıç derişimleri ile RNA ve AA için adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla çalışılan adsorbat derişimleri RNA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7 ve 10 mg RNA/mL, AA için; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 10 ve 12 mg AA/mL olarak seçilmiştir ve bu başlangıç derişimlerindeki desorpsiyon davranışı incelenmiştir. Bu deneylerde adsorban derişimi 5 mg adsorban/mL değerinde tutulmuştur. Biyomolekül adsorplanmış partiküllerin desorpsiyon davranışı RNA için pH 6, AA için pH 7 değerinde tutularak incelenmiştir. Bu değerler, derişim etkisi deneylerindeki minimum denge adsorpsiyon kapasitelerinin elde edildiği pH değerleridir.



Şekil 4.12. Ribonükleik asit ve askorbik asit için % desorpsiyon değerleri.

RNA ve AA için desorpsiyon davranışı Şekil 4.12'de verilmektedir. Şekil 4.12'den görüldüğü gibi diol gruplu molekül başlangıç derişiminin 4.0 mg adsorbat/mL veya üzerinde olduğu adsorpsiyon deneyleri sonrasında RNA için % 65, AA için % 75 civarında desorpsiyon verimi elde edilmiştir. Bu değerler, sentezlenen borik asit gruplu polimerik adsorban ile diol gruplu biyomolekül izolasyonunun başarıyla yapılabileceğini göstermektedir.

4.4. Ribonükleik Asit ve Askorbik Asit İzolasyon Koşulları

Bu çalışmada, APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri kullanılarak boronat afinite kromatografisi yoluyla, kesikli sistemde yürütülen adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri ile ribonükleik asit ve askorbik asit izolasyonunun başarıyla yapılabileceği görülmüştür. RNA ve AA için yapılan deneylerde, adsorpsiyon kapasiteleri üzerindeki diol gruplu biyomoleküllerin başlangıç derişimi etkisi, pH etkisi, adsorban derişimi etkisi ve adsorpsiyon süresi belirlenmiştir. RNA ve AA adsorpsiyonu için, adsorpsiyon kapasitelerine etki eden parametrelerin en uygun değerleri ve maksimum denge adsorpsiyon kapasiteleri Çizelge.4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. RNA ve AA için denge adsorpsiyon kapasiteleri üzerine etki eden parametreler ve adsorpsiyon için belirlenen en uygun değerler.

	RNA	AA
Derişim (mg adsorbat/mL)	4	7
pH	8.5	8.5
Adsorban derişimi (mg adsorban/mL)	0.05	0.05
Zaman (dk)	60	60
Maksimum denge adsorpsiyon kapasitesi (mg adsorbat/g partikül)	134	147

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, APBA bağlı poli(CMS-co-DVB)partikülleri ile RNA ve AA adsorpsiyonu için sırasıyla, 4 ve 7 mg adsorbat/mL başlangıç derişimi, pH 8.5 değerinde 10 mL adsorpsiyon ortamı, 5 mg adsorban/mL adsorban derişimi ve 60 dakika adsorpsiyon süresi en uygun değerler olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi adsorplanan diol gruplu moleküllerin % desorpsiyon değerleri; RNA için % 65, AA için % 75 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5. RNA ve AA için % desorpsiyon değerleri.

	RNA	AA
% Desorpsiyon	65	75

4.5. İzoterm Analizleri

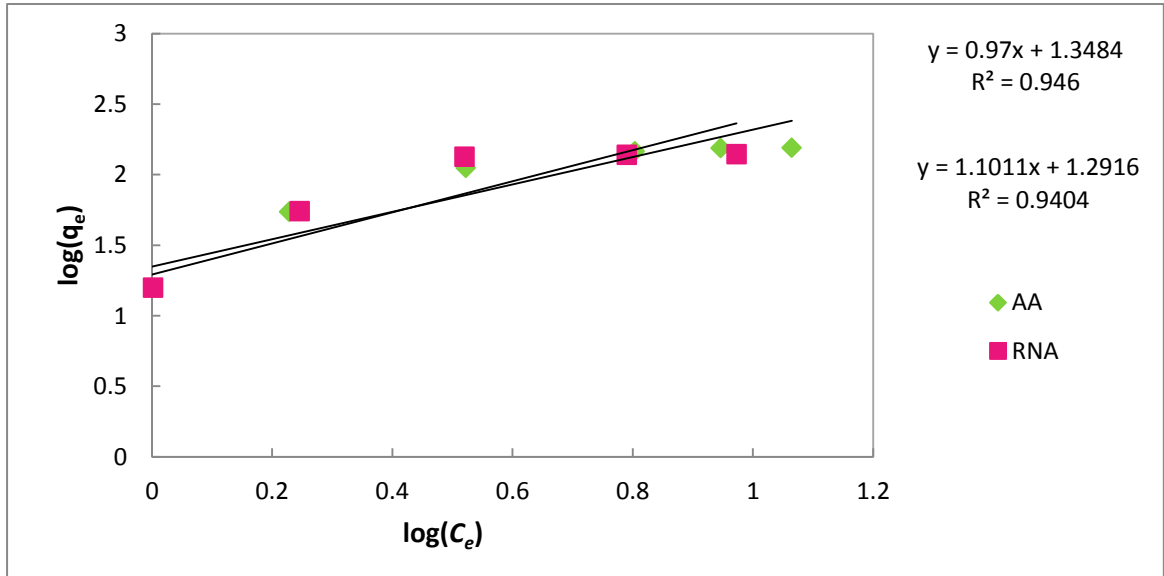
Sabit sıcaklıkta adsorplanmış bir maddenin miktarı ve denge çözeltisindeki derişimi arasındaki ilişki adsorpsiyon izotermi olarak adlandırılır. Bu çalışmada Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon izotermi, deneysel verileri değerlendirmek için kullanılmıştır. İzoterm eşitliklerinin deneysel verilere uygulanabilirliği korelasyon katsayıları kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.5.1. Freundlich modeli

Freundlich izotermi deneysel bir eşitliktir ve düşük konsantrasyonlar için iyi sonuçlar vermektedir. Bu eşitliğin logaritmik formu daha önce Eş.2.3'te verilmiştir. Çizelge 4.6'da APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Freundlich modelinin parametreleri, Şekil 4.13'te ise Freundlich izotermi verilmiştir.

Çizelge 4.6. Freundlich modelinin parametreleri.

Freundlich modeli				
Adsorbat	$\log(K_f)$	K_f	$1/n$	r
RNA	1.2916	19.57041	1.1011	0.9404
AA	1.3484	22.30489	0.97	0.9460



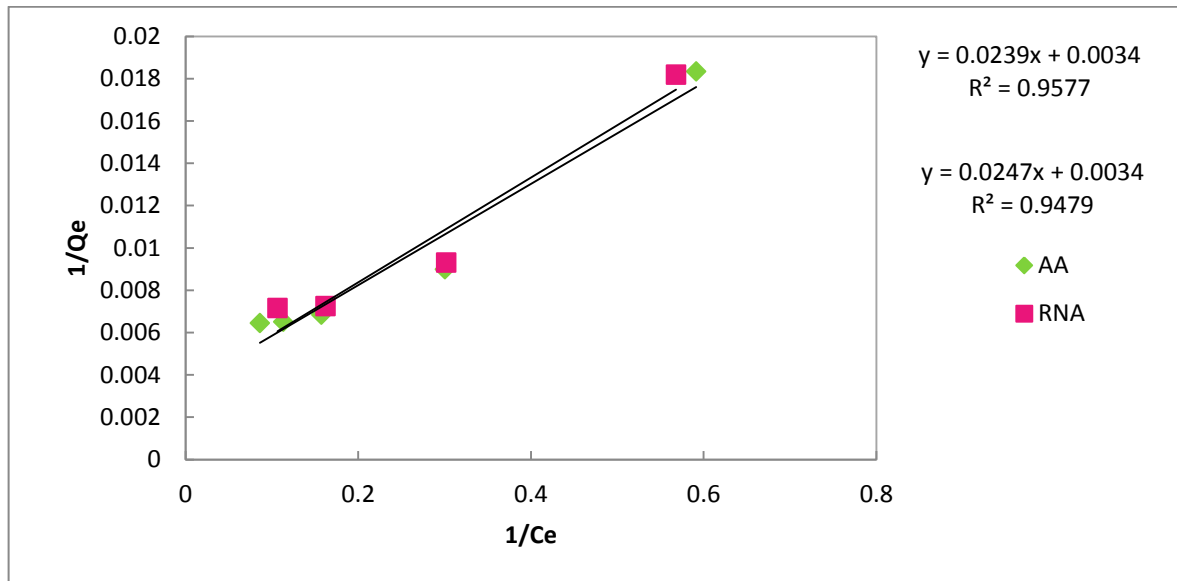
Şekil 4.13. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Freundlich izotermi.

4.5.2. Langmuir modeli

Langmuir izotermi deneysel bir eşitliktir ve katı yüzeyinde bir adsorbata tek tabaka adsorpsiyonu ile sınırlıdır. Bu eşitlik daha önce Eş.2.10'da verilmiştir. Çizelge 4.7'de APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Langmuir modelinin parametreleri, Şekil 4.14'te ise Langmuir izotermi verilmiştir.

Çizelge 4.7. Langmuir modelinin parametreleri.

Langmuir modeli					
Adsorbat	$1/q_m m$	$1/q_m$	q_m	m	r
RNA	0.0247	0.0034	294.12	7.3	0.9479
AA	0.0439	0.0034	294.12	12.9	0.9577



Şekil 4.14. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partiküllerin RNA ve AA adsorpsiyonu için Langmuir izotermi.

APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri ile RNA ve AA adsorpsiyonundaki deneysel veriler ve adsorpsiyon modeli arasındaki korelasyon katsayıları, Langmuir eşitliği ile daha yüksek tutarlılık göstermiştir.

5. SONUÇLAR

- Dispersiyon polimerizasyonu ile 3.3 µm boyutundaki, monodispers Polistiren partiküller sentezlenmiş ve poli(CMS-co-DVB) partiküllerin sentezinde çıkış lateksi olarak kullanılmıştır.
- Reaktif formda, hidrofobik, monodispers ve gözenekli, yaklaşık 6 µm boyutundaki poli(CMS-co-DVB) partikülleri “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” ile sentezlenmiştir.
- Sentezlenen poli(CMS-co-DVB) partiküllere, bazik ortamda nükleofilik yer değiştirme tepkimesi ile tek basamakta 3-aminofenilboronik asit (APBA) bağlanmıştır. APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri boronat afinite kromatografisinde destek malzemesi olarak kullanılmıştır.
- APBA bağlı poli(CMS-co-DVB) partikülleri ile boronat afinite kromatografisi yoluyla kesikli sitemde yürütülen adsorpsiyon desorpsiyon deneyleri ile diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Hedef molekül olarak seçilen ribonükleik asit (RNA) ve askorbik asit (AA) adsorpsiyon deneylerinde; denge adsorpsiyon kapasiteleri üzerindeki; adsorbat başlangıç derişimi, pH, adsorban derişimi ve zaman etkileri incelenmiştir.
- RNA için, 4 mg RNA/mL başlangıç derişimi, pH 8.5 değerindeki adsorpsiyon ortamı, 5 mg/mL adsorban derişimi ile 60 dakika adsorpsiyon süresi en uygun adsorpsiyon koşulları olarak bulunmuştur. AA için, 7 mg/mL başlangıç derişimi, pH 8.5 değerindeki adsorpsiyon ortamı, 5 mg/mL adsorban derişimi ile 60 dakika adsorpsiyon süresi en uygun adsorpsiyon parametreleri olarak bulunmuştur.
- RNA ve AA için, maksimum denge adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 134 mg RNA/g polimer ve 147 mg AA/g polimer olarak bulunmuştur. Bu değerler diol boronik asit etkileşiminin maksimum olduğu pH 8.5 değerinde elde edilmiştir.

- RNA ve AA için maksimum desorpsiyon oranları, başlangıç derişiminin 4.0 mg adsorbat/mL veya üzerinde olduğu adsorpsiyon deneyleri sonrasında sırasıyla % 65 ve % 75 olarak bulunmuştur. Bu değerler deriştirilen adsorbanın, boronat afinite kromatografisi yöntemiyle biyomolekül izolasyonunda başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir.
- RNA ve AA izolasyonu için yapılan deneylerdeki adsorpsiyon sonuçları Langmuir modeli ile uyumluluk göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Almong, Y., and M. Levy. "Effect of Initiator on the Molecular Weight Distribution in Dispersion Polimerization of Styrene." *Journal f Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1980: 18, 1-11.
- Altınışik, M. *Spektroskopik Analiz Yöntemleri*. Aydın: ADÜTP Biyokimya Anabilim Dalı, 2004.
- Bailon, Bailon, George K. Ehrlich, Wen-Jian Fung, and Wolfgang Berthold, "Affinity Chromatografy Methods and Protocols." *Methods in Molecular Biology* (Humana Press), no. 147 (2000): 119-123.
- Barret, K. E. J. *Dispersion Polymerization in Organic Media*. New York: John Wiley & Sons, 1975.
- Cawse, J. L., P. A. Lovell, and M. S. El-Aasser. "Dispersion Polimerization." In *Emulsion Polimerization & Emulsion Polymers*, 743-761. Chichester: Wiley, 1997.
- Cazes, Jack, ed. *Encyclopedia of Chromatography*. Vol. III. New York: CRC Press, 2010.
- Cheng, C. M., J. Micale, W. Vanderhoff, and M. S. El-Aasser. "Monodisperse Porous Particles: Formation of the Porous Structure." *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed.* 30 (1992a): 235-244.
- Cheng, C. M., W. Vanderhoff, and M. S. El-Aasser. "Synthesis and Characterization of the Monodisperse Porous Particles." *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed.* 30 (1992b): 245-256.
- Corner, T. "Polyelectrolyle Stabilized Lattices: Preparation." In *Colloids and Surfaces*, 119-129. 1981.
- Crittenden, Barry, and W John Thomas. *Adsorption Technology & Design*. Boston: A division of Reed Education and Professional Publishing Ltd, 2004.
- Cuatrecasas, P., M. Wilchek, and C. B. Anfinsen. "Selective Enzyme Purification by Affinity Chromatography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61 (1968): 636-643.
- Çelebi, B. "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi için İmmobilize Enzim Reaktörlerinin Geliştirilmesi ve Kinetik Karakterizasyonu." Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 16-17.
- Davies, Michael B. "Reactions of L-ascorbic Acid with Transition Metal Complexes." *Polyhedron* 11, no. 3 (1992): 285-321.
- Doğan, M. "Sulu Ortamda Perlitin Yüzey Yükünün ve Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi." Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2001.
- Ellingsten, T., O. Aune, J. Ugelstad, and S. Hagen. "Monosized Stationary Phases For Chromatography." *Journal of Chromatography*, 1990: 147-161.

- Ferreira, A., M. Bigan, and D. Blondeau. "Optimization of a Polymeric HPLC Phase: Influence of the Polymerization Conditions on the Pore Structure of Macroporous Beads." *Reactive and Functional Polymers* 56, no. 2 (2003): 123-136.
- Fersht, Alan. *Structure and Mechanism in Protein Science, A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.
- Fried, Joel R. *Polymer Science & Technology*. New Jersey: Prentice Hall Professional Technical Reference, 2003.
- Galila, M., F. Svec, and J. M. Frechet. "Monodispers Polymer Beads as Packing Material for High Performance Chromatography: Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in the Presence of Linear Polystyrene." *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1994: 32, 2169-2175.
- Gjerde, Douglas T., Lee Hoang, and Hornby David. "RNA Purification and Analysis." (WILEY-VCH) 2009: 18-22,80-82.
- Hosoya, K., M. Teramachi, N. Tanaka, A. Kobayashi, T. Kanda, and Y. Ohtsu. "Preparation Strategy for Uniformly Sized, Polymer-Beads HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency." *1. Copolymerization Technique, Anal. Chem.* 73 (2001): 5852.
- Hunter, J. *Introduction to Modern Colloid Science*. New York: Oxford University Press, 1999.
- Kalay, B. "Sulu Çözeltilerden Bakır İyonunun Kaolinit Yüzeyine Adsorpsiyonu." Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2006, 21-25.
- Khandphur, R. S. *Handbook of Analytical Instruments*. New Delhi: Tata McGraw Hill, 2008.
- Lok, K. P., and C. K. Ober. "Partical Size Control in Dispersion Polymerization of Styrene." *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 1985: 63, 209-216.
- Metcalf, L., and H. P. Eddy. *Waste Water Engineering*. New York: McGraw-Hill, 1972.
- Meyer, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fifth Edition. St. Gallen: John Wiley & Sons Ltd., 2010.
- Mota, José Paulo, and Svetlana Lyubchik, . *Recent Advances in Adsorption Processes for Environmental Protection and Security*. Kyiv: Springer, The NATO Science for Peace and Security Programme, 2006.
- Ober, C. K., and M. L. Hair. "Monodispersed Micron-Sized Polystyrene Particles by Dispersion Polymerization." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1985: 23, 103-108.

- Okuba, M., and T. Nakagawa. "Studies on Suspension and Emulsion, Preparation of Micron Size Monodisperse Polymer Particles Having Highly Crosslinked Structures and Vinyl Groups by Seeded Polymerization of Divinylbenzene Using the Swelling Method." *Colloids and Polymer Science* 270 (1992): 853-858.
- Özdemir, Y. "Katyonik Boyar Maddelerin Sepiyolit Yüzeyine Adsorpsiyonu." Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2005.
- Paine, A. J., W. Luymes, and J. Mc Nulty. "Dispersion Polymerization of Styrene in Polar Solvents: Influence of Reaction Parameters on Particle Size and Molecular Weight in Poly(N-Vinylpyrrolidone) Stabilized Reactions." *Macromolecules*, 1990: 23, 3104-3108.
- Polimer Teknolojisine Giriş* Ankara İnkilap Kitapevi 1987
- Sarıkaya, Y. *Fizikokimya*. Ankara: Gazi Kitabevi, 1997.
- Sarıkaya, Yüksel. *Fizikokimya*. Ankara: Gazi Kitabevi, 1997.
- Skoog, D. A., D. M. West, and F. J. Holler. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. USA: Saunders College Publishing, 1999.
- Svec, F., and J. M. J. Frechet. "New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis." (Science) 273, no. 205-211 (1996).
- The Effect of Temperature and Initiator Levels on the Dispersion Polymerization of Polystyrene *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 25:1987-1395
- Tuncel, A., and H. Çiçek. "Uniform Latex Particles." In *Handbook of Engineering Polymeric Materials*, by N. Cheremissinoff. New York: Marcel-Dekker Inc., 1997.
- Tuncel, A., R. Kahraman, and E. Pişkin. "Monosize Polystyrene Microbeads by Dispersion Polymerization." *Journal of Applied Science*, 1993: 50, 303-319.
- Türkyılmaz, A. "Sepiyolit'in Elektrokinetik Özellikleri ve Bakır Adsorpsiyonu." Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2005.
- Ugelstad, John, Kari Herder Kaggerud, Arvid Berge, and T. Ellingsen. "Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation." *Advances in Colloid and Interface Science* 13, no. 1-2 (1980).
- Üneri, Saadet. "Kolloit Kimyası." 82-83, 91-95. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1969.
- Ünsal, E. "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Farklı Polaritelere Sahip, Fonksiyonel Gruplu Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi Ve Kromatografik

Karakterizasyonu." Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006, 16-24.

Wang, Q. C., F. Svec, and J. M.J. Frechet. "Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodisperse Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens." *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 32 (1994): 2577-2588.

Wilcheck, M., and T. Miron. "Activation of Sepharose with N,N' -disuccinimidyl Carbonate." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 11, no. 3 (1985): 191-193.

Wilchek, M., K. L. Knudsen, and T. Miron. "Improved Method for Preparing N-Hydroxysuccinimide Ester-Containing Polymers for Affinity Chromatography." *Bioconjugate Chem.* 5, no. 5 (1994): 491-492.

Yıldıoğan, Bilge. "Aspartam İçeren Havalandırılmış özeltide L-Askorbik Asidin Bakır(II) ve Demir(III) Katalizli Oksidasyon Kinetiğinin İncelenmesi." Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı – Soyadı

Özlem Özkul

Doğum Yılı

1986

Doğum Yeri

Ordu

Eğitim Durumu

Lise

Özel Altınay Anadolu Lisesi

Lisans

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Lisan

İngilizce

Çok iyi

Almanca

Orta

e-posta

ozkulozlem@hotmail.com