

**GÖZENEKLİ PARTİKÜLLERDE KÜTLE AKTARIMININ
KONFOKAL TARAMALI LAZER MİKROSKOPİSİ İLE
İNCELENMESİ VE DİFÜZYON KATSAYISININ
SAPTANMASI**

**THE INVESTIGATION OF MASS TRANSFER IN POROUS
PARTICLES BY CONFOCAL LASER SCANNING
MICROSCOPY AND DETERMINATION OF DIFFUSION
COEFFICIENT**

ÜMİT VOLKAN UÇAK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan :.....
Prof. Dr. Serap Şenel

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Erdoğan Alper

Üye :.....
Prof. Dr. Zakir M. O. Rzayev

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

THE INVESTIGATION OF MASS TRANSFER IN POROUS PARTICLES BY CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY AND DETERMINATION OF DIFFUSION COEFFICIENT

Ümit Volkan UÇAK

ABSTRACT

In this thesis, monodisperse and porous poly(polyethyleneglycol methacrylate-divinylbenzene) (PEGMA-DVB) particles were synthesized in the polymeric form following with staged polymerization technique as HPLC column materials.

In the HPLC study newly synthesized poly(polyethyleneglycol methacrylate-divinylbenzene) monodispersed and porous particles and fluorescent labeled proteins (BSA, Bovine Serum Albumin) were used. Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) was used to determine the concentration profile of protein inside the particle and the effective diffusion coefficient determination was thus improved. The unsteady-state diffusion coefficients are modelled and necessary partial differential equations constants are determined using optimization techniques. The diffusion parameters of fluorescent tagged proteins inside the particle was found in the order 10^{-11} cm²/s. The functional dependence of diffusion coefficient on protein concentration was also found to be parabolic.

Key words : Mass transfer, Effective diffusion coefficient, Laser Scanning Confocal Microscope, HPLC, PEGMA.

Adviser : Prof. Dr. Erdoğan Alper, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

Co-Adviser : Prof. Dr. Ali Tuncel, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminde yardımcı olan, tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Erdoğan Alper'e, ve Sayın Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e,

Attığım her adımda arkamda olan ve daima yanımda olduklarını hissettiğim sevgili annem Nesime Uçak'a, biricik ablama ve moral kaynağım Furkan Tuğra'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ü.Volkan UÇAK

Nisan 2008

GÖZENEKLİ PARTİKÜLLERDE KÜTLE AKTARIMININ KONFOKAL TARAMALI LASER MİKROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ VE DİFÜZYON KATSAYISININ SAPTANMASI

Ümit Volkan UÇAK

ÖZ

Tez kapsamında, eş boyutlu ve gözenekli HPLC kolon materyalleri polimerik formda sentezlenmiştir. Sentezlerde basamaklı polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu kapsamda monodispers ve gözenekli formda divinilbenzen bazlı poli(polietilenglikol metakrilat-divinilbenzen) (PEGMA-DVB) partikülleri elde edilmiştir.

Protein ayırımı için HPLC kolon dolgu materyali olarak sentezlenen poli(polietilen glikol metakrilat-co-divinil benzen) bazlı monodispers ve gözenekli partiküllerde model protein olarak bir floresan ajan olan FITC ile işaretlenen albumin (BSA, Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Yatışkın olmayan difüzyon prosesinde partikül içi protein derişim profili, farklı zaman değerleri için Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM) kullanılarak elde edilmiştir. Etkin difüzyon katsayısı tayini yöntemi bu sayede geliştirilmiştir. Teoride protein moleküllerinin yatışkın olmayan difüzyonu modellenmiş ve elde edilen kısmi diferansiyel denklemdeki katsayılar optimizasyon yöntemiyle bulunmuştur. Flüoresan işaretli albumin için poli(polietilen glikol metakrilat-co-divinil benzen) partiküller içerisinde difüzyon parametresi 10^{-11} cm²/s mertebesinde hesaplanmış ve etkin difüzyon katsayısının ortalama albumin derişimine parabolik bir fonksiyonla bağlı olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Kütle transferi, Etkin difüzyon katsayısı, Eş-boyutlu partikül, Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop, HPLC, PEGMA.

Danışman : Prof. Dr. Erdoğan Alper, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Eş Danışman : Prof. Dr. Ali Tuncel, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu.....	3
2.2. Fonksiyonel Gruplu Monodispers Partikül Sentezi.....	5
2.3 Monodispers Gözenekli Partikül Eldesine Yönelik Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Yöntemleri.....	6
2.4 Difüzyon Denklikleri.....	9
2.5 Taramalı Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM)	12
2.5.1 Konfokal Mikroskobinin ilkeleri	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	15
3.1. Basamaklı Polimerizasyon Yöntemi ile Monodispers ve Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	15
3.1.1 Çıkış Lateksinin Üretim	16
3.1.1.1 Materyal.....	16
3.1.1.2 Polimerizasyon Yöntemi.....	16
3.1.1.3 Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu.....	18
3.1.2 Monodispers Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	18
3.1.2.1 Materyal.....	18
3.1.2.2 Çıkış Lateksinin Diluent ve Monomer Fazı ile Şişirilmesi.....	19
3.1.2.3 Monomer Fazının Çıkış Partikülleri İçerisinde Polimerizasyonu.....	20

3.1.2.4	Monodispers Gözenekli Partiküllerin Yıkanması ve Ekstraksiyonu.....	20
3.2	Deney Planı.....	21
3.3	Sentezlenen Monodispers Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu.	21
3.3.1	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) ile Karakterizasyon.....	21
3.3.2	BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile Karakterizasyon.....	22
3.4	Model Proteinin Floresan Ajan ile İşaretlenmesi.....	22
3.5	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta Etkin Difüzyon Katsayısı Tayini.....	23
4.	DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI.....	24
4.1	Monodispers ve Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	24
4.2	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Partikül İçi Derişim Profili Tayini.....	29
4.3	Etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	34
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	39
6.	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	40
EK.1	MATLAB Program Dosyası.....	42
EK.2.	Partikül B ve Partikül C'ye ait Derişim Profilleri.....	43
EK.3.	Partikül B ve Partikül C'ye ait Etkin Difüzyon Katsayıları.....	46
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM).....	16
Şekil 2.2. CLSM'de görüntü oluşumunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 3.1. Monomer ve çapraz bağlayıcının molekül formülleri.....	21
Şekil 4.1. Sentezlenen partiküllerin boy ve boy dağılımının özelliklerini gösteren SEM fotoğrafları.....	25
Şekil 4.2. Sentezlenen partiküllerin detaylı yüzey yapısını gösteren SEM fotoğrafları	26
Şekil 4.3. Sentezlenen partiküllere ait SEC yöntemi ile belirlenen gözenek boy dağılım eğrileri.	27
Şekil 4.4. BET ile elde edilen DVB bazlı partiküllere ait gözenek dağılım grafikleri.....	28
Şekil 4.5. PEGMA-DVB partiküllerine ait CLSM görüntüsü.....	29
Şekil 4.6. PEGMA-DVB partiküllerine ait intensite profilleri.....	30
Şekil 4.7. PEGMA-DVB Partikül A : t=180s' de partikül içi konsantrasyon profili.....	31
Şekil 4.8. PEGMA-DVB Partikül A : t=190s' de partikül içi konsantrasyon profili.....	31
Şekil 4.9. PEGMA-DVB Partikül A : t=200s' de partikül içi konsantrasyon profili.....	32
Şekil 4.10. PEGMA-DVB Partikül A : t=210s 'de partikül içi konsantrasyon profili.....	32
Şekil 4.11. PEGMA-DVB Partikül A : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi partikül iç profil fonksiyonunun değişimi.....	33
Şekil 4.12. PEGMA-DVB Partikül B : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi profil fonksiyonunun değişimi.....	33
Şekil 4.13. PEGMA-DVB Partikül C : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi profil fonksiyonunun değişimi.....	34
Şekil 4.14. PEGMA-DVB Partikül A: t=180s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	35
Şekil 4.15. PEGMA-DVB Partikül A: t=190s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	35
Şekil 4.16. PEGMA-DVB Partikül A: t=200s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	36

Şekil 4.17. PEGMA-DVB Partikül A: $t=210s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	36
Şekil 4.18. PEGMA-DVB Partikül A: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi.....	37
Şekil 4.19. PEGMA-DVB Partikül B: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi.....	37
Şekil 4.20. PEGMA-DVB Partikül C: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi.....	38
Şekil 4.21. PEGMA-DVB Partikül B : $t=180s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	43
Şekil 4.22. PEGMA-DVB Partikül B : $t=190s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	43
Şekil 4.23. PEGMA-DVB Partikül B : $t=200s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	43
Şekil 4.24. PEGMA-DVB Partikül B : $t=210s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	44
Şekil 4.25. PEGMA-DVB Partikül C : $t=180s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	44
Şekil 4.26. PEGMA-DVB Partikül C : $t=190s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	44
Şekil 4.27. PEGMA-DVB Partikül C : $t=200s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	45
Şekil 4.28. PEGMA-DVB Partikül C : $t=210s'$ de partikül içi konsantrasyon profili.....	45
Şekil 4.29. PEGMA-DVB Partikül B: $t=180s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	46
Şekil 4.30. PEGMA-DVB Partikül B: $t=190s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	46
Şekil 4.31. PEGMA-DVB Partikül B: $t=200s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	46
Şekil 4.32. PEGMA-DVB Partikül B: $t=210s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	47
Şekil 4.33. PEGMA-DVB Partikül C: $t=180s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	47
Şekil 4.34. PEGMA-DVB Partikül C: $t=190s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	47

hesaplanması.....	47
Şekil 4.35. PEGMA-DVB Partikül C: $t=200s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	48
Şekil 4.36. PEGMA-DVB Partikül C: $t=210s$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Monodispers formda polistiren çıkış lateksi sentezi için Dispersiyon polimerizasyonu koşulları	17
Çizelge 3.2. DVB bazlı HPLC kolon dolgu materyali sentez koşulları	21
Çizelge 4.1. Çıkış lateks partiküllerinin özellikleri.....	24
Çizelge 4.2. Sentezlenen partiküllerin ortalama boy, boy dağılımı ve SEC ile Belirlenen gözeneklilik özellikleri.....	25
Çizelge 4.3. BET ile elde edilen gözeneklilik özellikleri.....	28
Çizelge 4.4. PEGMA-DVB partikülleri için belirtilen zamanlarda partikül içi ortalama konsantrasyon ve etkin difüzyon katsayıları.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AcN	Asetonitril
AIBN	2-2-azobisisobütironitril
CV	Değişim Katsayısı
DVB	Divinilbenzen
BPO	Benzoil peroksit
Et-OH	Etil alkol
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IAA	İzoamilalkol
LCSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
Poli(HEMA-DVB)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-divinilbenzen)
Poli(PEGMA-DVB)	Poli(polietilenglikolmetakrilat-divinilbenzen)
Poli(HEMA-EDM)	Poli(2-hidroksietilmetakrilat-etilenglikoldimetakrilat)
Poli(PEGMA-EDM)	Poli(polietilenglikolmetakrilat- etilenglikoldimetakrilat)
PS	Polistiren
PVA	Polivinil alkol
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
THF	Tetrahidrofuran
Dn	Sayıcı Ortalama Partikül Çapı

1. GİRİŞ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) uygulamalarında, ayırmanın gerçekleştirildiği kolonlarda dolgu materyali olarak silika veya polimerik yapıda mikropartiküller kullanılmaktadır. Polimerik partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenme kolaylığı, partikülün türevlendirme proseslerinin daha çeşitli ve kolay olması, geniş pH aralığında stabil olabilme gibi avantajlara sahip olmasından dolayı araştırmalar polimerik partiküller üzerinde yoğunlaşmıştır. Ticari olarak üretilen polimerik kolon dolgu materyalleri, 1 ile 10 µm arasında değişen ortalama boyuta ve farklı gözenek yapısına sahip partiküllerdir. Ancak kromatografik performans açısından henüz istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Günümüzde genellikle ticari olarak üretilen HPLC kolonları polidispers (boy dağılımlı) formda üretilen ve dolayısı ile belirli bir boy dağılımına sahip gözenekli partiküllerden oluşmaktadır. Bu durum kolonların kromatografik performanslarını düşürmektedir. Polidispers partiküller ile hazırlanmış HPLC kolonlarında monodispers formda partiküller içeren kolonlara göre daha düşük çözünürlük değerleri (ardışık piklerin birbirinden ayrılma ölçüsünü gösteren parametre) ve teorik tabaka sayısı değerleri elde edilmiştir (Elingsen et al., 1990; Wang et al., 1994; Galia et al., 1994; Svec et al., 1996). Özellikle 1990'lı yıllardan itibaren HPLC uygulamalarında "yeni nesil kolon materyali olarak, monodispers yapıdaki gözenekli partiküllerin kullanımı gündeme gelmiştir. Yeni nesil kromatografik dolgu materyalleri olarak tanımlanan monodispers gözenekli partiküller varlığında ise, kolonda oluşan düzenli akış profili nedeniyle yüksek kromatografik ayırma yeteneği elde edilebilmektedir. Bu partiküllerin üretim yöntemi genellikle "çok basamaklı polimerizasyon" adı altında toplanmaktadır (Elingsen et al., 1990; Wang et al., 1994; Galia et al., 1994; Svec et al., 1996). Bu küreler farklı fonksiyonel gruplar içerecek şekilde sentezlenebilmektedir.

Tez kapsamında fonksiyonel hidroksil grup taşıyan, farklı yüzey polaritelerine sahip, polar, eş boyutlu ve gözenekli formda poli(polietilenglikolmetakrilat-divinilbenzen) (PEGMA-DVB), HPLC kolon dolgu materyalleri polimerik formda sentezlenmiştir. HPLC uygulamalarında ayrılacak analitlerin, kolon materyali

olarak kullanılan katı ortamlarda etkin difüzyon katsayısının belirlenmesi, kolonun ayırma davranışının tanımlanması için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmada ters faz sıvı kromatografisinde, protein ayırımı için kolon materyali olarak kullanılan monodispers ve gözenekli formdaki poli(polietilen glikol metakrilat-co-divinil benzen) partiküllerde model protein olarak albumin seçilerek, albuminin etkin difüzyon katsayısı belirlenmiştir. Bu amaçla lazer taramalı konfokal mikroskop kullanımına dayalı bir etkin difüzyon katsayısı tayin yöntemi geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Mikron boyutunda monodispers polimerik partiküllerin üretimi için kullanılan dispersiyon polimerizasyonu, monomerin organik bir dağıtma ortamı içerisinde çözünmesi ile yürütülen bir polimerizasyon yöntemidir [Corner,1981; Almong ve Levy, 1982; Cawse, 1997]. Bu polimerizasyon yöntemi ile 1-10 µm aralığında eşboyutlu polimerik partiküller elde edilebilmektedir. Bu yöntemde kullanılan başlatıcı, monomer fazı içinde çözünebilir özelliğine sahiptir. Başlangıçta tek fazlı olan polimerizasyon sistemi, katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı sıvı yapıya ulaşmaktadır. Günümüze kadar değişik başlatıcılar, monomer ve dağıtma sistemleri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda;

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

sonuç partikül boy ve boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü üzerinde etkili faktörler olarak belirlenmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcılar monomer fazında çözünebilmektedir. Polimerizasyon sisteminde başlatıcı miktarının artırılması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında artış olduğu saptanmıştır. Başlatıcı derişiminin artırılması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalinin oluşmasıyla açıklanmaktadır [Ober ve Hair,1987; Tuncel ve arkadaşları, 1993]. 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 ve Hair, 1987; Tuncel et al.,1993].

Dispersiyon polimerizasyonunda ortalama boy ve boy dağılımı 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 sonuç partiküllerinin 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,1997]. Artan monomer/dağıtma ortamı oranı ile ortalama partikül boyutu genelde artış gösterir. Ancak bu oranın aşırı artışı ile sonuç partiküllerde önemli oranda boy dağılımı meydana gelmektedir [Lok and Ober,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,1997].

Dispersiyon polimerizasyonuna sıcaklığın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda 55-80⁰C aralığında artan polimerizasyon sıcaklığı ile ortalama partikül boyutu ve boy dağılımında artış olduğu gözlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerinin meydana gelen polimerin molekül ağırlığında önemli bir azalmaya sebep olduğu saptanmıştır [Ober ve Hair,1985]. 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 tutulur. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğın bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olur.

2.2. Fonksiyonel Gruplu Monodispers Partikül Sentezi

Eş boyutlu polimerik partiküllerin yüzeyinde fonksiyonel grupların varlığı partiküllerin türevlendirilmesini gerektiren uygulamalarda, örneğin ligand bağlanması veya biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için gereklidir. Genel olarak inert polimerik yüzeyleri türevlendirmek zordur. Literatürde eş boyutlu ve fonksiyonel polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili çeşitli kopolimerizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Bu partiküllerin sentezi genellikle stiren gibi hidrofobik ve apolar bir monomer ile fonksiyonel grup içeren polar bir komonomerin kopolimerizasyonu ile gerçekleşir. Bu tip kopolimerizasyonlarda genellikle akrilat bazlı fonksiyonel komonomerler kullanılmaktadır. Karboksil, hidroksil, amin, amid, aldehit veya klorometil fonksiyonel grupları sonuç ürünün monodispersitesi korunarak polimerik kürelerin yüzeyine bağlanabilir (Tseng et al., 1986; Smigol et al., 1992; Smigol et al., 1993; Tuncel et al., 1994; Çamlı et al., 2002). Kopolimerizasyon metodunun seçiminde monomer ve komonomerin polaritesi ve reaktivitesi önemli rol oynar.

Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak stiren monomeri çeşitli fonksiyonel monomerler ile kopolimerize edilmiştir. Bu polimerizasyonlarda etanol dağıtma ortamı, azobisizobütironitril ve polivinilpirolidon sırasıyla başlatıcı ve stabilizör olarak kullanılmıştır (Tseng et al., 1986). Bu komonomerlere örnek olarak; metil metakrilat, metakrilik asit, akrilamid, hidroksietilakrilat, dimetilaminoetilmetakrilat ve polidimetilsiloksan verilebilir. Böylece tek basamaklı proses ile 2.4-3.7 µm boyut aralığında eş boyutlu mikroküreler elde edilmiştir. Sonuçlar partiküllerin ortalama boy ve boy dağılımının komonomer türü ile değiştiğini göstermiştir. Bu sonuç partikül oluşum basamağında komonomer ile stiren arasındaki ikincil stabilizör oluşumuyla açıklanmıştır.

Başka bir çalışmada çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile monodispers makrogözenekli ve fonksiyonel gruplar taşıyan partiküller üretilmiştir (Çamlı et al., 2002). Bu yöntemde lineer polistiren dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Monodispers özellikteki çıkış lateksi fonksiyonel komonomer, monomer ve başlatıcı içeren bir organik faz ile oda sıcaklığında ve emülsiyon ortamında şişirilmektedir. Bu basamakta monodispersitenin korunması için organik faz/çıkış partikülü oranı yeterince düşük tutulmalıdır. İkinci basamakta

şışmış durumda olan çıkış partiküllerinin içerisinde fonksiyonel gruba sahip komonomerin polimerizasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu basamakta kopolimerizasyon reaksiyonu sırasında yeni partikül oluşumuna izin verilmez ve sonuç ürünün monodispersitesi korunmuş olur. Polimerizasyon sırasında fonksiyonel gruba sahip monomerin mikroküre yapısına girdiği saptanmıştır. Burada kullanılan fonksiyonel monomerin su içindeki çözünürlüğü azaldıkça elde edilen partiküllerin gözenek boyutunda da bir azalma olduğu gözlenmiştir.

2.3 Monodispers Gözenekli Partikül Eldesine Yönelik Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Yöntemleri

Büyük boyutlu ve çapraz bağlı formda gözenekli monodispers polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili ilk çalışmalar Ugelstad tarafından yapılmıştır [Ellingsen et al., 1990]. Bu çalışmada 1-100 µm boyut aralığındaki gözenekli eşboyutlu partiküller, stirenin emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Elde edilen polistiren partiküller ilk önce dodesil klorür ya da dibütil ftalat 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.

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

1. Monodispers çıkış lateksinin sentezi
2. Lateksin porojen ve monomer karışımıyla şişirilmesi
3. Monomer karışımının 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

Bu yöntemde 8.7 µm boyutunda çok basamaklı emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen polistiren partiküller, monodispers makrogözenekli partiküllerin eldesi amacıyla çıkış materyali olarak seçilmiştir. Birinci basamakta çıkış lateksi, stiren, divinilbenzen ve n-heptan içeren organik faz ile sulu emülsiyon ortamında şişirilmiştir. 2,2-azobis-2-metilbütironitril bu organik fazda çözülerek, ikinci kademe polimerizasyonunda başlatıcı olarak kullanılmıştır. Organik fazın sulu ortamda dağıtılması amacıyla, polivinilprolidon, aerosol-MA ve Polywet KX-3 dağıtıcılarını içeren bir emülsiyon yapıcı madde sistemi kullanılmıştır. Partiküllerin ikinci basamak polimerizasyonu sonucunda kremleşmeleri ve koagüle olmalarını engellemek için şişirme oranı düşük tutulmuştur. Oda sıcaklığında ve çalkalamalı sistemde gerçekleştirilen organik faz ile şişirme işlemini ikinci basamak polimerizasyon işlemi takip etmiştir. Polimerizasyon, azot atmosferinde ve 70°C sıcaklıkta yapılmıştır. Monodispers polimerik partiküller, metilen klorür ile ekstrakte edilerek gözenekli formda elde edilmiştir.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen gözenekli yapının oluşumu şu şekilde açıklanmıştır [Cheng et al., 1992]. İlk basamakta stiren, divinilbenzen ve inert diluent ile partiküller şişirilmiştir. Ancak divinilbenzen stirene göre reaktivite oranı daha yüksek bir monomerdir. Bu nedenle divinilbenzenin polimerizasyonu stiren polimerizasyonuna göre daha hızlı olmaktadır. Polimerizasyon sırasında inert diluent içerisinde yavaş gerçekleşmekte olan lineer polistiren oluşumu yanında, daha hızlı olarak çapraz bağlanma derecesi yüksek ve ağırlıklı olarak divinilbenzen içeren zincirler meydana gelmektedir. Bu çapraz bağlı zincirlerin yoğunluğunun artması ile birlikte partiküller, içinde buldukları diluent ortamında giderek çözünmez hale gelmektedir. Bu durum şişmiş durumdaki partikül yapısı içinde kopolimerce ve diluentçe zengin olmak üzere iki ayrı fazın oluşmasına neden olmaktadır. Şişmiş durumdaki partiküllerde büyüyen çapraz bağlı zincirlerden dolayı ilk aşamada agregasyon oluşmakta ve böylece diluent ortamından faz ayrılması başlamaktadır. Bu işlem oluşan agregatların diluent ortamı içerisinde jel formunda küçük mikroküreler oluşturmasıyla devam etmektedir. İlerleyen dönüşümle birlikte, oluşan çapraz bağlanma derecesi yüksek mikroküreler, diluent ve lineer polistireni içeren partiküller içerisinde sabit hale gelmektedir. Bu aşamada monovinil içeriği daha yüksek olan polimer zincirleri oluşmakta ve bu zincirler çapraz bağ yoğunluğu yüksek mikrokürelerin birbirlerine

bağlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, küçük mikroküreler arasındaki boşluklar diluent ve lineer polistiren tarafından doldurulmakta ve bu yapı oluşan gözenekli matrisin temelini teşkil etmektedir. Ekstarksiyon ile inert diluent ve lineer polistiren uzaklaştırılması sonucunda makrogözenekli yapı elde edilmektedir.

İki basamaklı polimerizasyon yöntemi kullanılarak monodispers ve büyük boyutlu partiküllerin çapraz bağlı formda elde edilmesi amacıyla bir diğer yöntem Okubo ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [Okubo ve Nagakawa,1992]. Dinamik şişme 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. Şişirme ortamına bir enjeksiyon pompası kullanılarak sürekli olarak sabit hızla su beslemesi yapılmaktadır. Böylece dağıtma ortamının polaritesi zamanla artırılmaktadır. Divinilbenzenin dağıtma ortamından ayrılarak monodispers partiküllerin geçişi sağlanmaktadır. Dinamik şişme yönteminde su besleme hızı ayarlanarak monodispersite korunmak suretiyle partiküllerin divinilbenzenle şişmeleri sağlanmaktadır. Şişirme işlemi sonrasında ikinci basamak polimerizasyonunda divinilbenzen partiküller içinde polimerleştirilmekte ve 4.3 µm boyutunda ve çapraz bağlı partiküller elde edilmektedir. Başlatıcı olarak benzoil peroksit ve stabilizör olarak polivinil alkol kullanılmaktadır. Polimerizasyon 70°C sıcaklıkta 24 saat süreyle ve çalkalamalı reaktörlerde gerçekleşmektedir.

Kromatografik uygulamaya yönelik makrogözenekli monodispers partiküllerin sentezi için bir başka yöntem de Frechet ve arkadaşları tarafından önerilmiştir [Wang et al., 1994; Galia 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 dibütil ftalat ile oda sıcaklığında şişirilir. İkinci basamak şişirme işleminde ise öncelikle hacimce %50 stiren ve %50 divinilbenzen içeren monomer karışımı dibütil ftalat ile birlikte yine lauril sülfatın sulu çözeltisinde dağıtılır. Bu monomer karışımının içerisinde repolimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit de vardır. İlk basamak şişme işleminde elde edilen ve dibütil ftalat içeren polimerik partiküller ikinci basamakta hazırlanan emülsiyon ile tekrar oda sıcaklığında etkileştirilir. 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 diluent varlığında partiküller içinde polimerizasyonu ile 7.4 µm boyutundaki monodispers partiküller çapraz bağlı formda sentezlenmiştir. Partiküller toluen ile ekstrakte edilmiş ve gözenekli yapının oluşması sağlanmıştır.

Sentezlenen monodispers makrogözenekli partiküllerin monodispersitesini ölçmek için sayıca ortalama partikül çapları ve standart sapma değerleri “Eş. 2.1.” ve “Eş.2.2.” de sırasıyla verilmektedir. Değişim katsayısı (Coefficient of Variation, CV) değerleri de “Eş.2.3.” de gösterilen formül ile hesaplanmaktadır.

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (2.1)$$

$$SD = \sqrt{\sum N_i (D_i - D_n)^2 / (\sum N_i - 1)} \quad (2.2)$$

$$\%CV = SD / D_n \quad (2.3)$$

Burada;

D_n ; sayıca ortalama partikül çapı, SD ; standart sapma, CV ; değişim katsayısı, N_i ; partikül sayısı, D_i ; i no’lu partikül çapını ifade etmektedir.

2.4 Difüzyon Denklikleri

İzotropik anlamda difüzyonun matematiksel teoremi, bölgenin birim alanına doğru difüzleneren maddenin transfer hızının, bölgede normal olarak ölçülmüş derişim değeri ile orantısal olduğu kabullenilen teze dayanmaktadır. Bu durum, daha önceki yıllarda Fourier (1822) tarafından elde edilen ısı iletiminin matematiksel denkleminin kabulünden yararlanarak difüzyonu ilk olarak niceliksel temellere oturtan Fick (1855) tarafından fark edilmiştir.

$$J_A = -D_{AB} \nabla C_A \quad (2.4)$$

Bu denklemde J_A bölgenin birim alanında transfer hızını, C difüzlünen içeriğin derişimini ve D_{AB} difüzyon katsayısını göstermektedir.

Küresel koordinatlar (r, θ, ϕ) ele alınarak difüzyon denklemi çözülecek olursa,

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \left\{ \frac{\partial}{\partial r} \left(Dr^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(D \sin \theta \frac{\partial C}{\partial \theta} \right) + \frac{D}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 C}{\partial \phi^2} \right\} \quad (2.5)$$

elde edilir.

Eğer durumu difüzyonun dairesel olduğu durumlar ile sınırlandırırız, sabit difüzyon katsayısı için difüzyon denklemi şöyle şekillenmektedir.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right). \quad (2.6)$$

Aşağıdaki transformasyon yapılırsa,

$$u = Cr, \quad (2.7)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial r^2}. \quad (2.8)$$

“Eş.2.8.” elde edildikten sonra bu denklem değişken durumda, yüzey derişimi sabit: başlangıç dağılımı $F(r)$ ve sınır koşulları;

$$u = 0, \quad r = 0, \quad t > 0, \quad (2.9)$$

$$u = aC_0, \quad r = a, \quad t > 0, \quad (2.10)$$

$$u = rf(r), \quad t = 0, \quad 0 < r < a, \quad (2.11)$$

Burada C_0 küresel yüzeydeki sabit derişimi, a ise kürenin yarıçapını göstermektedir.

Başlangıçta her yerde benzer C_1 derişimi var ve yüzey derişimi C_0 'de sabit olarak sağlanıyor ise değişkenlere ayırma yöntemi ve fourier serileri kullanılarak “Eş.2.8.” çözümlenirse “Eş.2.13.” elde edilir.

$$\frac{C - C_1}{C_0 - C_1} = 1 + \frac{2a}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin \frac{n\pi r}{a} \exp(-Dn^2\pi^2 t / a^2). \quad (2.12)$$

Limit $r \rightarrow 0$, merkezdeki derişim ifade edilirse

$$\frac{C - C_1}{C_0 - C_1} = 1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-Dn^2\pi^2 t / a^2) \quad (2.13)$$

Kısa zamanlar için uygun çözüm ise

$$\frac{C - C_1}{C_0 - C_1} = \frac{a}{r} \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)a - r}{2\sqrt{(Dt)}} - \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)a + r}{2\sqrt{(Dt)}} \right\} \quad (2.14)$$

şeklinde verilir.

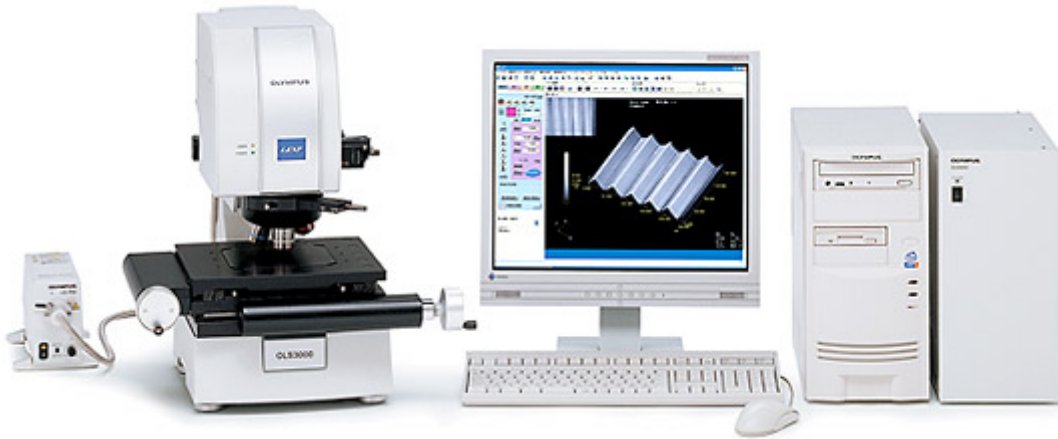
Parçacık içi ortalama konsantrasyon $\langle C \rangle$, "Eş.2.16." da gösterildiği üzere hesaplanır.

$$C / C_0 = f(r) \quad (2.15)$$

$$\langle C \rangle = \frac{\int_0^R f(r) 4\pi r^2 dr}{\int_0^R 4\pi r^2 dr} \quad (2.16)$$

2.5 Taramalı Konfokal Lazer Mikroskobu (CLSM)

1980'li yılların başında bulunmuş konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM), sağladığı avantajları ile günümüzde kullanımı yaygınlaşmaya başlayan bir yöntemdir (Shepperd and Shotton, 1997). Konfokal Mikroskop bir optik mikroskop sistemi olup aydınlatma kaynağı olarak pankromatik görünür ışınlar yerine monokromatik lazer ışınlarını kullanır. Nokta ışık, nokta tarama, nokta algılama ile Üçlü Eş Odaklama ortaya koyar. Lazer ışınları, cismi sadece bir düzlemde odaklar (nokta ışık), bu odaktan geri yansıyan flüoresan yayılım, foton olarak çok küçük bir delikten geçirilerek (nokta tarama), detektör tarafından algılanır (nokta algılama). Gelen sinyaller elektrik sinyallerine ve daha sonra da sayısal hale çevrilerek bilgisayarda görüntülenir. Gelişmiş yazılımlar sayesinde görüntü toplama, işleme ve depolama sağlanmaktadır. Konfokal Mikroskopta tek boyutlu çizgi tarama, iki boyutlu alan tarama, üç boyutlu uzaysal tarama ve dört boyutlu zaman içinde tarama yapılmaktadır. Mikroskobun en önemli özelliği odak-dışı görüntülerin ortadan kaldırarak belli bir kalınlığı olan net görüntüler ortaya koymasındır. Optik kesit olarak bilinen bir incelikte görüntü ve farklı derinliklerdeki düzlemlerden flüoresan görüntülerin seri kesitleri bilgisayar tarafından kaydedilir ve bunların kombine edilmesi ile üçboyutlu görüntü elde edilebilir. Zaman değişimlerini kaydeder ve kesintisiz izleme yapılabilir.

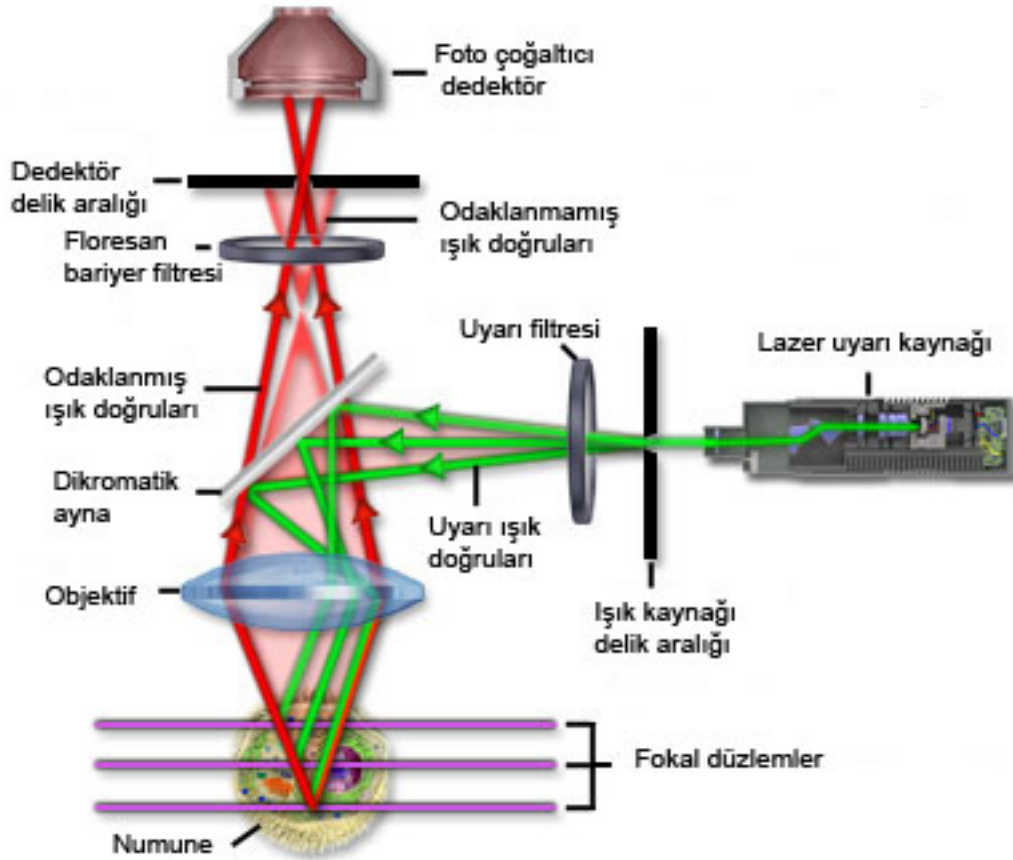


Şekil 2.1 Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM)

Kullanılan lazer kaynağı sayesinde preparat üzerinde yapılan hızlı tarama, flüoresanın daha geç solmasını sağlamakta ve daha uzun inceleme süresi vermektedir. Ayrıca optik kesit halinde görüntü elde edilerek, odak düzleminin altındaki ve üstündeki moleküllerden kaynaklanan flüoresan görüntülerin süperpoze olması engellenmektedir.

2.5.1 Konfokal Mikroskobinin ilkeleri

Konfokal Lazer taramalı Mikroskobun çalışma prensibi Şekil 2.2.' de gösterilmiştir. Lazer sistemi (uyarma kaynağı) tarafından yayılan uygun ışık, numune üzerindeki tarama noktası ile eşlenik düzlemde yer alan bir delik aralığından (konfokal) ve detektör önünde yer alan delikten (foto çoğaltıcı tüp) geçmektedir.



Şekil 2.2 CLSM'de görüntü oluşumunun şematik gösterimi

Lazer, dikromatik aynadan yansıdığından ve numune üzerinde belirlenmiş bir odak noktasında tarandığından, numune üzerindeki noktalardan (aynı odak noktaları)

geçen ikincil ışınım, dikromatik ayna aracılığı ile geri dönerler ve detektör delik aralığında konfokal nokta olarak odaklanırlar.

Objektif odak aralığının altında ya da üzerinde oluşan ışınımın önemli bir bölümü, delik aralığı ile konfokal (şekilde odaklanmamış ışık doğruları olarak belirtilmiştir) değildir ve delik aralığında genişlemiş boş diskler olarak şekillenirler. Odaklanmamış ışınım yayılımlarının sadece küçük bir bölümü delik aralığından geçtiğinden, bu ikincil ışığın büyük bir kısmı foto çoğaltıcı tarafından tespit edilemez ve sonuçlanan resme katkı sağlamaz. Dikromatik ayna, bariyer filtresi ve uyarı filtresi, geniş alan floresan mikroskobunda benzer bileşenler üzerinde benzer özellikler sergiler. Konfokal mikroskobunda objektifte yeniden odaklanma işlemi, geçme ve yayılma noktalarını detektör ve kaynak ışığı delik noktaları ile birlikte değiştirmektedir.

Yukarıda da ele alındığı gibi, konfokal ışınım mikroskobu çoklu lazer geçirme kaynağı, optik ve elektronik bileşenlerden oluşan bir tarama kafası, elektronik detektörler (genel olarak foto çoğaltıcılar) ve hedef tespiti, işlem, analiz ve resimlerin gösterilmesi için bir bilgisayardan oluşmaktadır.

Tarama kafası konfokal sistemin merkezinde yer almaktadır ve son resmi oluşturmak için gerekli olan numunedan alınan foton sinyallerin toplanmasını sağladığı gibi aynı zamanda taramaların pikselleştirilmesi işlevini de görmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, farklı polaritede ve gözenek yapısında, eş boyutlu HPLC kolon dolgu materyallerinin sentezini ve kromatografik performanslarının test edilmesini içermektedir. Çalışmaların ilk kısmında “çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu” yöntemi ile eş boyutlu, makro gözenek yapısına sahip partikül sentezlenmiştir. Bu kapsamda hidroksil gruplu, monodispers ve gözenekli formda, poli(polietilenglikolmetakrilat-divinilbenzen) (PEGMA-DVB), partikülleri elde edilmiştir. Partiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscope, SEM, Jeol JEM 1200EX, Tokyo, Japonya), BET (Nova 2200e Quantochrome) yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm sistemi ile karakterizasyonları yapılmıştır.

Çalışmaların İkinci kısmında, Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopunda üzerinde çalışmaların yürütüleceği model proteinin floresan ajan ile işaretlenmesi gerçekleştirilmiş, son kısımda ise Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta etkin difüzyon katsayısı tayini yapılmıştır.

Aşağıda polimerik partiküllerin üretim, karakterizasyon ve transfer parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler detaylı olarak verilmektedir.

3.1. Basamaklı Polimerizasyon Yöntemi ile Monodispers ve Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyon

Basamaklı polimerizasyon yönteminin İlk basamağı olarak polistiren çıkış lateksi, dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Daha sonra bu partiküller, eş boyutlu ve gözenekli yapı elde etmek amacıyla şişme işlemine tabi tutulmuştur. Şişme işleminde, polistiren partiküller, düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan, yüzey gerilimini azaltan bir polar ajan, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıyı içeren monomer fazı ile şişirilmiştir. Kullanılan organik ajanın seçimi üretilen çıkış lateksini (polistiren) çözebilme özelliği göz önünde tutularak yapılmıştır. Şişme basamağından sonra monomer fazının partikül içerisinde polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen partiküllerin ekstraksiyonu ile monodispers yapıda gözenekli poli(PEGMA-DVB) sonuç partikülleri elde edilmiştir.

Çalışmalarımızda monodispers ve gözenekli partiküllerin basamaklı polimerizasyon yöntemi ile sentezinde monodispers formda polistiren (PS) çıkış lateksi sentezlenmiştir. Stiren monomerinin dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak polimerleştirilmesi sonucunda istenilen boyutta çıkış lateksi elde edilmiştir. Çıkış lateksinin üretim yöntemi aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

3.1.1 Çıkış Lateksinin Üretimi

3.1.1.1 Materyal

Çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyonu ile üretiminde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (Et-OH, Merck A.G., Almanya) ve 2-metoksietanol (HPLC grade, Met-OH, Aldrich Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak 2-2'-azobisisobütironitril (AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere) kullanılmıştır. AIBN kullanılmadan önce kristalize edilmiştir. Sterik stabilizör olarak da polivinilprolidon K-30 (Mr:40000, PVP K-30, Sigma Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Monomer olarak kullanılan stiren (S, Yarpet, Kocaeli, Türkiye) vakumda distile edilip saflaştırılmış ve polimerizasyonda kullanılıncaya kadar buzdolabında bekletilmiştir.

3.1.1.2. Polimerizasyon Yöntemi

Monodispers gözenekli partiküllerin üretiminin ilk basamağında monodispers formda çıkış lateksi sentezlenmiştir. Stiren monomerinin dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak polimerleştirilmesi sonucunda 2 µm boyutunda monodispers çıkış lateksi elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Monodispers formda polistiren çıkış lateksi sentezi için dispersiyon polimerizasyonu koşulları

Kullanılan Kimyasallar	Miktarlar
Etanol (ml)	69
2-metoksietanol (ml)	48
PVP K-30 (g)	2.1
Stiren (ml)	20
AIBN (g)	0.44
Su (ml)	3
Polimerizasyon Koşulları	
Sıcaklık (°C)	70
Polimerizasyon Süresi (saat)	24
Çalkalama Hızı (cpm)	100

Sentezlerde kullanılan çıkış lateksinin sentez koşulları Çizelge. 3.1'de verilmektedir. Yöntemde öncelikle dispersiyon polimerizasyonu dağıtma ortamı hazırlanmaktadır. Bu amaçla tipik bir sentezde, 2.1 g PVP K-30, 69 mL Et-OH, 48 mL Met-OH ve 3 mL su içeren dağıtma ortamında çözülmetedir. Bu işlem sırasında ortam 500 mL hacme sahip ağzı sızdırmaz şekilde kapatılan bir cam reaktörde bulunmaktadır. Elde edilen dağıtma ortamına 20 mL stiren monomeri ve 0.44 g AIBN eklenmekte ve sonuç ortam AIBN'nin tam çözünmesini sağlayabilmek amacıyla yaklaşık 5 dakika süreyle ultrasonikasyona maruz bırakılmaktadır. Bu işlem 200 W gücünde bir ultrasonik su banyosunda (sonikatörde) (Bransonic 200, İngiltere), ve oda sıcaklığında yürütülmektedir. Ağzı kapatılmış durumdaki cam

reaktör oda sıcaklığında bir çalkalamalı su banyosuna (Gallenkamp, ABD) yerleştirilmekte ve 100 cpm çalkalama hızı ile polimerizasyon sıcaklığı olan 70°C değerine ısıtılmaktadır. Polimerizasyon işlemi 24 saat süre ile belirtilen sıcaklık ve çalkalama hızında yapılmaktadır.

Polimerizasyon sonrasında reaktör içeriği oda sıcaklığına soğuduktan sonra 5000 rpm'de yaklaşık 5 dakika süreyle santrifüjlenmektedir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılmakta ve 10 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine distile-diyonize su eklenerek, partiküller bir baget yardımıyla sulu ortamda dispers edilmektedir. Elde edilen yeni dispersiyonla santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez yinelenmekte ve son santrifüj basamağında çöken partiküller yaklaşık 100 ml su içerisinde, cam baget ile karıştırma ve takiben 1-2 dakika süreyle sonikasyon ile dispers edilmektedir. Bu işlem ile ortalama partikül boyutu yaklaşık 2 µm olan monodispers polistiren çıkış lateks partikülleri elde edilmektedir.

3.1.1.3 Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

Çıkış lateksinin ortalama boy ve boy dağılımının hesaplanması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, JEOL JEM 1200 EX, Tokyo Japonya) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Çıkış lateksinin ortalama molekül ağırlığı HPLC'de SEC yöntemiyle bulunmuştur. Çıkış lateksinin partikül içeriği ise gravimetrik analiz yöntemiyle bulunmuştur. Bu amaçla sulu ortamda bulunan polistiren partiküller, vakum etüvünde 70°C'de 24 saat boyunca kurutulmuş ve alınan belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği tartım yoluyla belirlenmiştir.

3.1.2. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Hidroksil gruplu monodispers ve gözenekli partiküllerin sentezi için "çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu" yöntemi kullanılmış ve bu yöntem ayrıntıları ile aşağıda anlatılmıştır.

3.1.2.1. Materyal

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminde organik ajan yani diluent olarak toluen (HPLC grade, Aldrich Chemical Co., ABD), yüzey gerilimini azaltıcı madde olarak, izoamillalkol (IAA, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve anyonik emülsiyon

yapıcı madde olarak da sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma Chemicals. Co., ABD) kullanılmıştır. Polimerizasyonlarda monomer olarak 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA, Aldrich Chemicals Co., ABD), polietilenglikolmetakrilat (PEGMA, Aldrich Chemicals Co., ABD); çapraz bağlayıcı monomer olarak ise divinilbenzen (DVB, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve etilenglikoldimetakrilat (EDM, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmadan önce kurutulmuştur. Polimerizasyonlarda stabilizör olarak polivinilalkol (PVA, Mr: 87000-146000, %87 hidrolize, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır. Bütün deneylerde distile-deiyonize su kullanılmıştır.

3.1.2.2. Çıkış Lateksinin Diluent ve Monomer Fazı ile Şişirilmesi

Monodispers formdaki çıkış partiküllerinin gözenekli olabilmesi yapısına gözenek oluşturucu ajanların eklenmesi ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla polistiren çıkış partiküllerinin içine düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan olan toluen eklenmiştir. Toluene, polistiren partiküllerin içine girerek zincirlerin gevşemesine (kısmen de olsa çözünmelerine) yani partiküllerin şişmesine neden olmaktadır. Ancak polistiren partiküllerin organik ajanla şişirilmesi sırasında monodispersitenin korunması gerekmektedir. Bu nedenle şişirme işlemi sırasında toluene, sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında sulu emülsiyon ortamında çıkış lateksi ile etkileştirilmiştir. Burada SDS misel yapısı oluşturarak, toluene'in emülsiyon ortamı içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Böylece partiküllerin aynı oranda şişmeleri yani monodispersitenin korunması sağlamaktadır.

Tipik bir basamaklı polimerizasyon yöntemi aşağıda örneklenmektedir. Sulu emülsiyon için, sürekli faz 0.3 g SDS'nin ve 0,35 g PVA'nın 120 mL distile su içerisinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Burada polivinil alkol sterik stabilizör olarak kullanılmakta ve polimerizasyon sırasında partikül-su ara yüzeyine yerleşerek, sonuç partikül yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır. Aynı sulu emülsiyon ortamına, düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan olarak 3 mL toluene, monomer olarak 2 mL PEGMA, 3 mL DVB çapraz bağlayıcı, yüzey gerilimini azaltıcı madde olarak 0.5 mL IAA ve 0.16 g BPO eklenmiştir. Bu karışım, 30 dakika boyunca ultrasonikasyona tabi tutularak dispers edilmiştir. Elde edilen sonuç emülsiyonuna 0.25 g polistiren çıkış partikülü eklenmiş ve karışım bir

manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında 400 rpm hızında 24 saat süreyle yapılmış ve diluent karışımı ile monomer fazın çıkış partiküllerine transferi sağlanmıştır.

3.1.2.3. Monomer Fazının Çıkış Partikülleri İçerisinde Polimerizasyonu

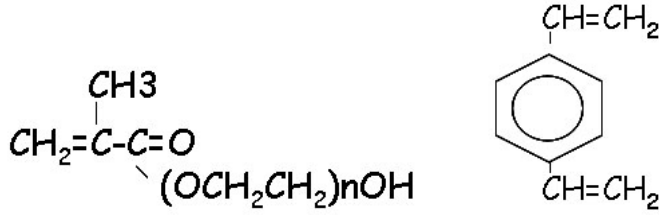
Elde edilen dispersiyon, 60 mL toplam hacme sahip sızdırmaz özellikteki cam reaktöre aktarılmıştır. Ağız sıkıca kapatılan pyrex cam reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Mermert, Almanya) oda sıcaklığında yerleştirilmiş ve çalkalama hızı 120 cpm değerine ayarlanarak ısıtma işlemi başlatılmıştır. Kullanılan çalkalamalı su banyosu 40 dakikalık süre içerisinde polimerizasyon sıcaklığı olarak belirlenen 70°C değerine ulaşmıştır. Polimerizasyon işlemi bu sıcaklıkta 24 saat süre ile ve 120 cpm çalkalama hızında yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda çalkalamalı su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığına soğutulmuştur.

3.1.2.4. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Yıkınması ve Ekstraksiyonu

Polimerizasyon sonucunda ana ürün olarak elde edilen monodispers makrogözenekli partiküllerin dağıtma ortamından ve polimerizasyon yan ürünlerinden ayrılması gerekmektedir. Partiküllerin ortamda bulunan ve sürekli fazda oluşan yaklaşık 1µm partikül boyutuna sahip yan üründen ayrılması amacıyla bir seri santrifüjleme, dekantasyon işlemi uygulanmıştır. Santrifüjleme işlemi önce distile su ardından da etanol ile yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında reaktörlerden alınan dispersiyon, 10 ml hacmindeki santrifüj tüplerine konulmuş 3000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda monodispers makrogözenekli partiküller çökmüş ve yaklaşık 1 µm boyutundaki yan ürün süpernatantın dekantasyonu ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüjleme-dekantasyon işlemine optik mikroskopta yapılan gözlemlerle küçük partikül fraksiyonları ortamdan tamamen uzaklaşana kadar devam edilmiştir. Daha sonra elde edilen eşboyutlu gözenekli partiküller etanol ortamında dispers edilmiş ve 5000 rpm hızında 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Partiküller içinde kalan organik ajanın ve lineer polistirenin ortamdan uzaklaştırılması için partiküller THF ile ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla partiküller 10 ml'lik santrifüj tüplerinde önce THF içine dispers edilmiş, 5000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant ortamdan

uzaklaştırılmıştır. 2 kez yinelenen santrifüj işleminin ardından partiküller yaklaşık 150 ml THF içine alınmıştır. Partiküller, THF ile çalkalayıcılı su banyosunda (Mammert, Almanya) 60°C’de 4 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon bitiminde partiküller oda sıcaklığında soğutulmuştur.

3.2. Deney Planı



Şekil 3.1 Polimerizasyonda kullanılan monomer ve çapraz bağlayıcının molekül formülleri; Polietilenglikolmetakrilat (PEGMA), Divinilbenzen(DVB)

Partiküllerin sentez koşulları Çizelge.3.2.’de ayrıntılı olarak özetlenmektedir.

Çizelge 3.2. DVB bazlı HPLC kolon dolgu materyali sentez koşulları

KOLON ADI	Çıkış Lateksi,(g)	Toluen (ml)	DVB (ml)	PEGMA (ml)	IAA (ml)	BPO (g)	PVA (g)
PEGMA-DVB	0.25	3	3	2	0.5	0.18	0.35

3.3. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) ile Karakterizasyon

Monodispers ve gözenekli partiküllerin boy ve boy dağılım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM, Jeol JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Aynı şekilde partikül yüzeyinde yer alan gözenek yapısının görüntülenmesinde SEM kullanılmıştır.

3.3.2. BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile Karakterizasyon

Partiküllerin yüzey alanı, ortalama gözenek boyutu, gözenek hacmi, gözenekliliği ve gözenek boyut dağılımı verileri Quantochrome, Nova 2200e model BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (BET) ile ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde öncelikle partiküller 90 °C'de 10 saat süre ile vakum altında kurutulmuştur. Ardından aletin özel hücrelerine yerleştirilen partiküllerden BET cihazında 90°C'de 3 saat süre ile vakumlama ile kalan nem tamamen uzaklaştırılır. Yaklaşık her bir örnekten 0,1 g miktar alınarak analizler tamamlanmıştır. Ölçümler sıvı azot içerisinde yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azotun buhar basıncından hesaplanması temeline göreler. Yüzey alanı ölçümlerinde BET adsorpsiyon izoterm yöntemi, ortalama gözenek çapı dağılımının bulunmasında BHJ metodu kullanılmıştır.

3.4. Model Proteinin Floresan Ajan İle İşaretlenmesi

Çalışmada model protein olarak BSA (Bovine Serum Albumin, Fraction V, MW: 67.000, Sigma Chem. Co. , Illinois, A.B.D.) kullanılmıştır. BSA'nın etkin difüzyon katsayısının belirlenmesi amacıyla partikül içerisinde radyal yöndeki derişim profilinin tayini gerekmektedir. BSA'nın derişiminin belirlenmesi amacıyla CLSM tarafından görülebilmesi için floresan formda olması gerekmektedir. Bu nedenle BSA, yaygın kullanılan bir floresan ajan olan floresin izotiyosiyanat (FITC, Sigma Chem. Co. A.B.D.) kullanılarak işaretlenmiştir. Bu amaçla 0.5 g BSA, % 10 aseton içeren 15 mL pH:9 sodyum karbonat tamponu içerisinde çözülmüş ve ortama 25 mg FITC eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Bağlanma reaksiyonu oda sıcaklığında ve ışıksız ortamda 24 saat süreyle 250 rpm karıştırma hızı ile gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işleminde sonucunda elde edilen çözelti "MW cut-off" değeri 12.000 olan selüloz asetat membran kullanılarak 48 saat süreyle saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminde sonunda çözültiden 1 mL örnek alınarak, BSA derişimi gravimetrik yolla belirlenmiştir.

3.5. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta Etkin Difüzyon Katsayısı Tayini

Floresan işaretli BSA'nın partiküller içerisindeki derişim profilinin belirlenmesi amacıyla lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılmıştır. Bu amaçla, CLSM sisteminde (Leica Microsystems, TCS SP2 AOBS) sisteminde poli(PEGMA-co-DVB) partiküllerin pH7 fosfat tamponu ortamında % 1 (w/w)' lik süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyona t=0 olarak tanımlanan anda, FITC işaretli BSA çözeltisinden yaklaşık 2 mL ilave edilerek, ortamda, 5 mg/mL BSA derişiminin eldesi sağlanmıştır. CLSM objektifi damlatma sonrası, hemen belirli bir bölgeye odaklanarak, z-tarama modunda çalıştırılmış ve seçilen partiküllerin belirtilen zaman değerlerinde sanal optik kesitleri otomatik olarak kaydedilmiştir. Belirli zaman değerlerinde alınan ve üç farklı partiküle ait optik kesit görüntüleri cihaz yazılımı aracılığı ile değerlendirilerek radyal yön için floresan intensite profilleri elde edilmiştir. Floresan intensite, ölçüldüğü noktadaki floresan ajan derişimi ile doğru orantılıdır. Bu prensip kullanılarak, floresan intensite profilleri yardımı ile albumin derişim profilleri elde edilmiş ve bu profiller değişkin durum difüzyon prosesini tanımlayan matematiksel model kullanılarak değerlendirilmiş ve albumine ait etkin difüzyon katsayısı değerleri farklı zaman değerlerinde hesaplanmıştır.

4.DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI

Bu çalışmada hidroksil grubu taşıyan, monodispers ve gözenekli formda poli(poli(etilenglikol metakrilat-divinilbenzen) (PEGMA-DVB) polimerik partikülleri sentezlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu ve BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı ile karakterizasyonlarının yapılmasının ardından Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobunda sanal optik kesit görüntülerinden elde edilen veri çiftlerinden partikül içi derişim profilleri, ortalama derişim ve etkin difüzyon katsayısı gibi kütle transfer parametre ve göstergeleri tespit edilmiş ve yorumlanmıştır.

4.1. Monodispers ve Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Partiküllerin sentezinde çıkış lateksi olarak 2 µm boyutunda polistiren (PS) partiküller kullanılmıştır. Çıkış lateks partiküllerinin özellikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Kullanılan PS partiküllerinin boy dağılımını gösteren değişim katsayısı (Coefficient of Variation, CV) değerine bakıldığında bu değerin % 5'in altında olduğu görölmektedir. Bu kullanılan partiküllerin dar boy dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.

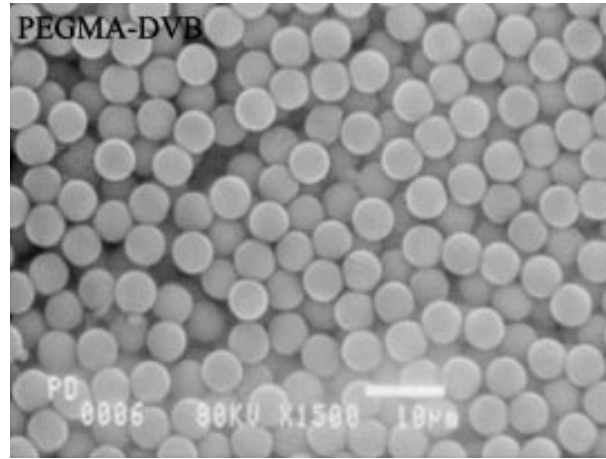
Çizelge 4.1. Çıkış lateks partiküllerinin özellikleri

Polimerizasyon Verimi (% w/w)	83
Ortalama Partikül Çapı (D_n, µm)	2.0
CV (Değişim katsayısı) (%)	2.1
Sayica Ortalama Mol. Ağırlığı (M_n)	6.0×10^4

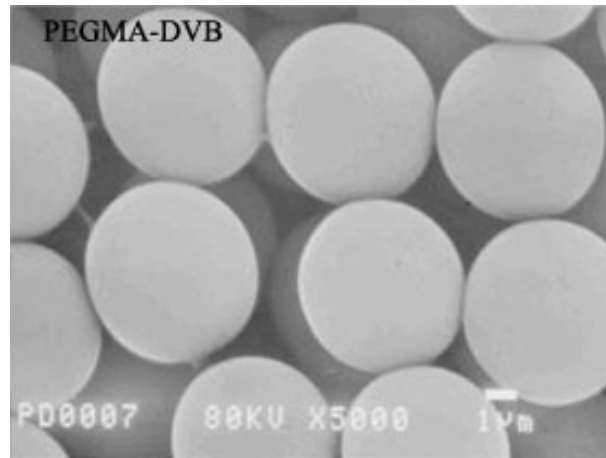
PEGMA-DVB partiküllere ait boy dağılımını gösteren taramalı elektron fotoğrafları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Bu fotoğraflara göre elde edilen ortalama çap ve CV değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.2'den göröldüğü üzere tüm partiküller monodispers formda sentezlenmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen partiküllerin ortalama boy, boy dağılımı ve SEC ile belirlenen gözeneklilik özellikleri

Partikül	Partikül Çapı (μm)	CV (%)	Ortalama Gözenek Çapı (nm)	Gözenek Hacmi (mL/g)	Gözeneklilik (% v/v)
PEGMA-DVB	5.0	1.55	15.1	0.86	60.3



Şekil 4.1. Sentezlenen partiküllerin boy ve boy dağılımının özelliklerini gösteren SEM fotoğrafları

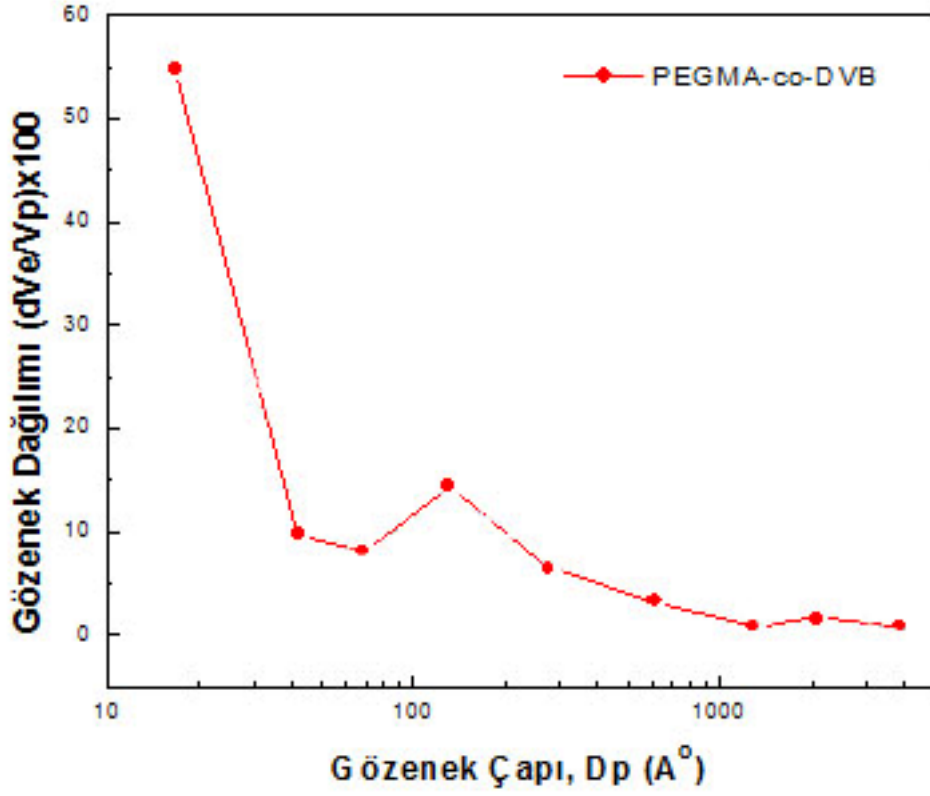


Şekil 4.2. Sentezlenen partiküllerin detaylı yüzey yapısını gösteren SEM fotoğrafları

Partiküllerin yüzey gözenek yapısını gösteren örnek SEM fotoğrafları Şekil 4.2.'de yer almaktadır. DVB bazlı partiküllerde, yüzey gözenek boyutunun SEM ile

gözlenemeyecek kadar küçük olduğu görülmektedir. Bilindiği üzere, polimerizasyon basamağında, gözenek yapısının oluşumunu sağlayan faz ayrımı, partiküllerin içerisinde çapraz bağlayıcının bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu proseste, oluşan polimer fazı, çapraz bağlanarak diluent içerisinde çözünmez forma gelmekte ve homojen partikül yapısı içerisinde ayrılmaktadır. Diluent ile çapraz bağlayıcının polarite yönünden farklı olması ve oluşan aşırı agregasyon ile çapraz bağlı polimer daha büyük bloklar halinde ortamdaki ayrılmakta ve bu durum krater tipi gözenek yapısının oluşumunu sağlamaktadır. Ancak her iki komponentin polarite yönünden birbirine yakın olması durumunda, (Toluen ve DVB gibi) diluentin polimeri çözme yeteneğinin fazla olmasından ötürü faz ayrımı zorlaşmakta ve oluşan polimer çok daha küçük bloklar halinde partikül içi homojen ortamdaki ayrılmaktadır. Bu ise DVB bazlı partiküllerde olduğu gibi SEM ile gözlenemeyecek kadar küçük gözenekli bir yapının oluşmasını sağlamaktadır.

SEC yöntemi ile elde edilen gözeneklilik özellikleri ise Çizelge 4.2.'de verilmiştir. SEC ile elde edilen gözenek dağılım eğrileri ise Şekil 4.3'de yer almaktadır. Çizelge.4.2. ve Şekil.4.3. incelenecek olursa SEM fotoğrafları ile yapılan yorumlara uyumlu bir tablonun elde edildiği görülmektedir.

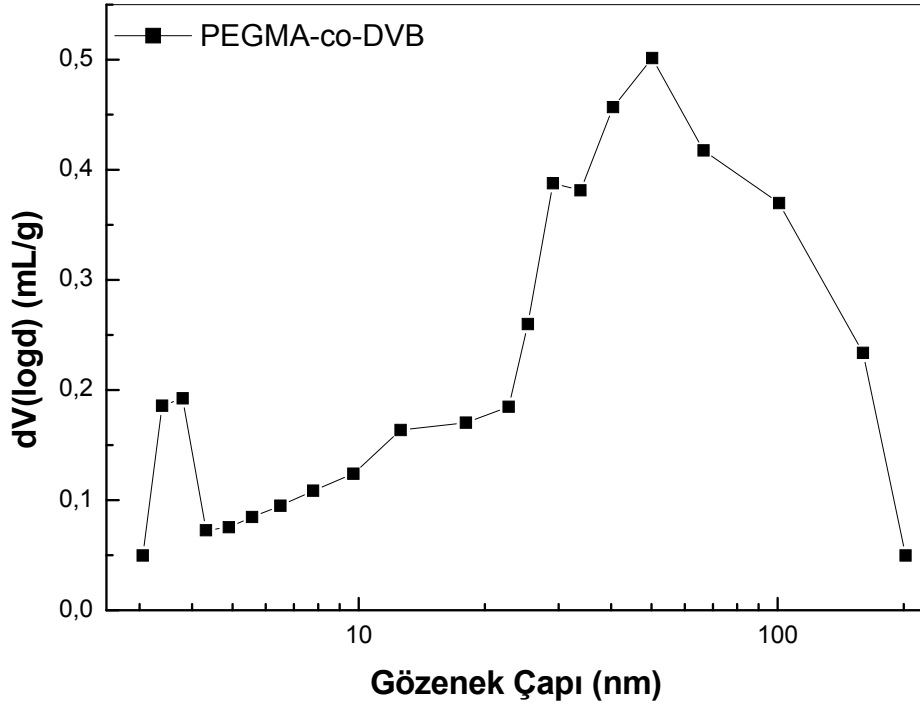


Şekil 4.3. Sentezlenen partiküllere ait SEC yöntemi ile belirlenen gözenek boy dağılım eğrileri.

SEC ile elde edilen bulgular, partiküllerin gözeneklilik özellikleri hakkında bir fikir verse de, SEC gözeneklilik ölçümünde dolaylı bir yöntem olarak bilinmektedir ve SEC ile ölçüm partiküllerin gerçek gözenek yapısını yansıtmayabilir. Bu nedenle BET cihazı kullanılarak, sentezlenen partiküllerin gözeneklilik özellikleri direkt olarak ölçülmüştür. BET ile elde edilen gözeneklilik özellikleri Çizelge 4.3.'de ve Şekil 4.4.'de verilmiştir. BET ile elde edilen sonuçlar fotoğraflardaki görüntülerle ve SEC'den elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Çizelge 4.3. BET ile elde edilen gözeneklilik özellikleri

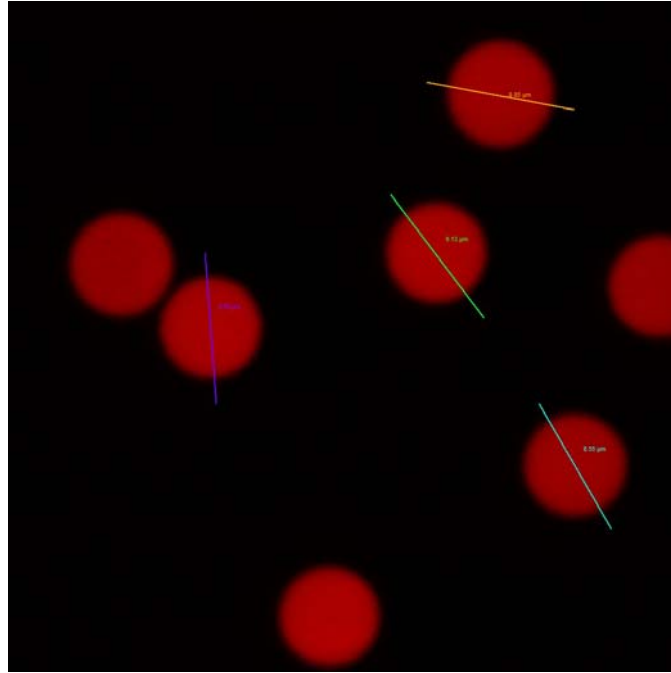
Partikül	Ortalama Gözenek Çapı (nm)	Gözenek Hacmi (mL/g)	Yüzey Alanı (m ² /g)
PEGMA-DVB	14.5	0.27	105.7



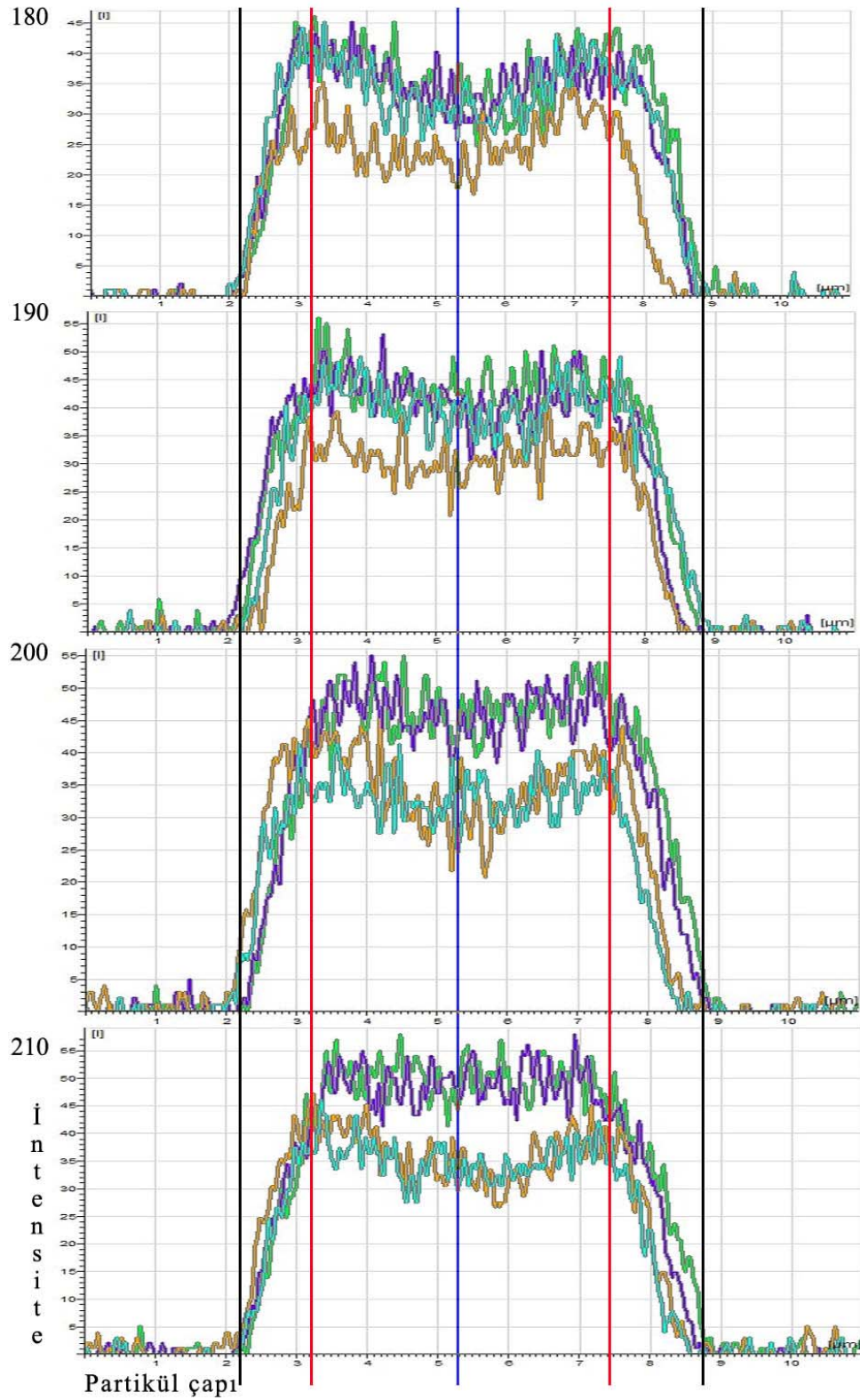
Şekil 4.4. BET ile elde edilen DVB bazlı partiküllere ait gözenek dağılım grafiği

4.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Partikül İçi Derişim Profili Tayini

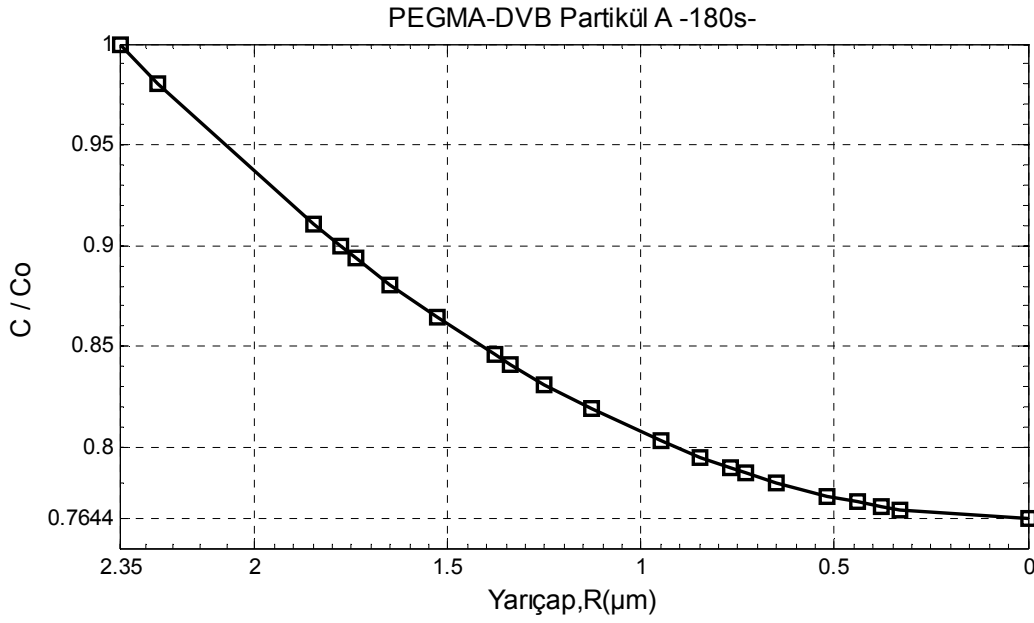
PEGMA-DVB mikropartiküllerinin konfokal lazer tarayıcı elektron mikrografisi, Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. PEGMA-DVB mikropartikülleri, pürüzsüz yüzeye ve gelişigüzel dağılmış küçük gözeneklere sahip küre şeklindedir. Mikropartiküller sulu çözeltiye daldırıldığında, difüzyon işleminin üç adımda tamamlandığı düşünülebilir. İlk olarak, floresanla işaretlenmiş albumin molekülleri çözülden mikropartiküllerin yüzeyine hareket eder. Ardından, işaretlenmiş albumin molekülleri polimer matriksin yüzeyine yayılır. Son olarak, partikül merkezine doğru net bir transportla birlikte mikropartiküllerin içine nüfuz eder. Polimerle bağlantılı büyük miktarda çözelti kullanılarak, mikropartiküllerin yüzeyindeki işaretlenmiş albumin konsantrasyonunun, tüm gözlem dönemi boyunca sabit olduğu düşünülebilir. Mikropartiküllerin içindeki işaretlenmiş albumin derişimi eğimi ($C/C_0 - r/a$) belirlenerek, Fick'in ikinci difüzyon kanununun çözümü, deneysel derişim profillerine uygun hale getirilebilir.



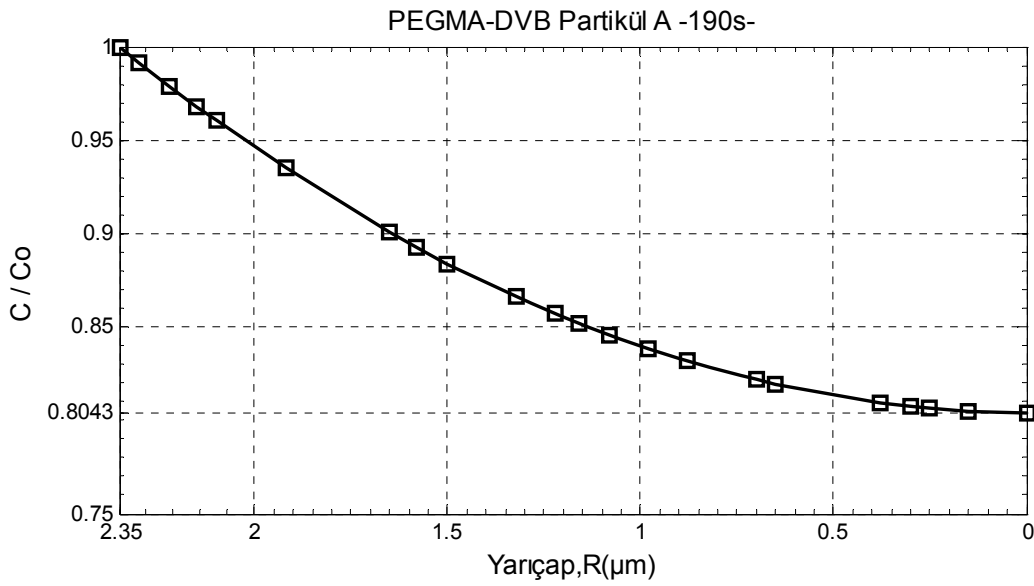
Şekil 4.5. PEGMA-DVB Partiküllerine ait CLSM görüntüsü: floresan ile işaretlenmiş albumin moleküllerinin partiküle difüzyon prosesinin başlamasıyla birlikte -z tarama modunda CLSM'den alınan sanal optik kesit görüntüleri.



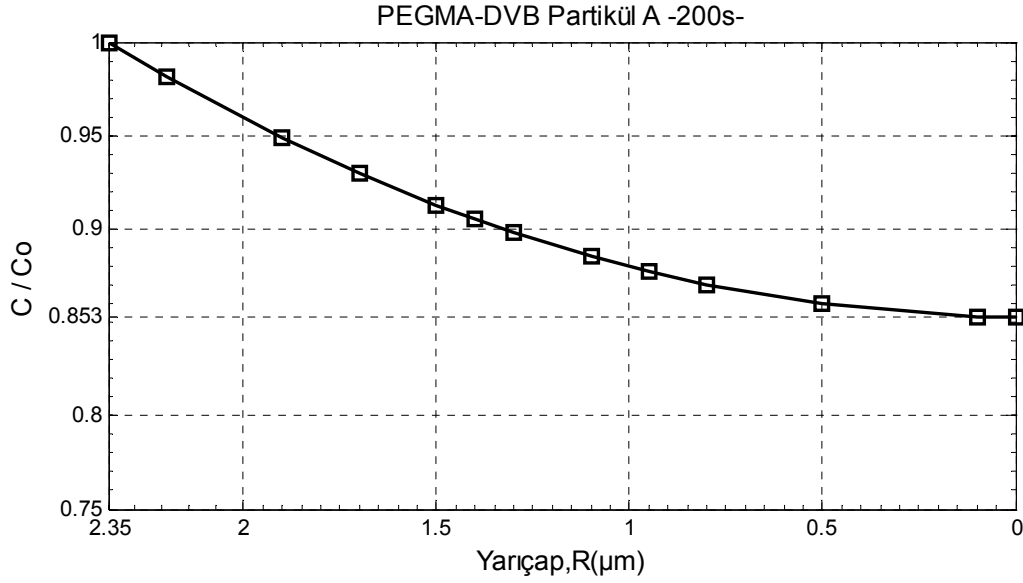
Şekil 4.6. PEGMA-DVB partiküllerine ait intensite profilleri: Sarı renk partikül A, mavi renk partikül B, mor renk ise partikül C.



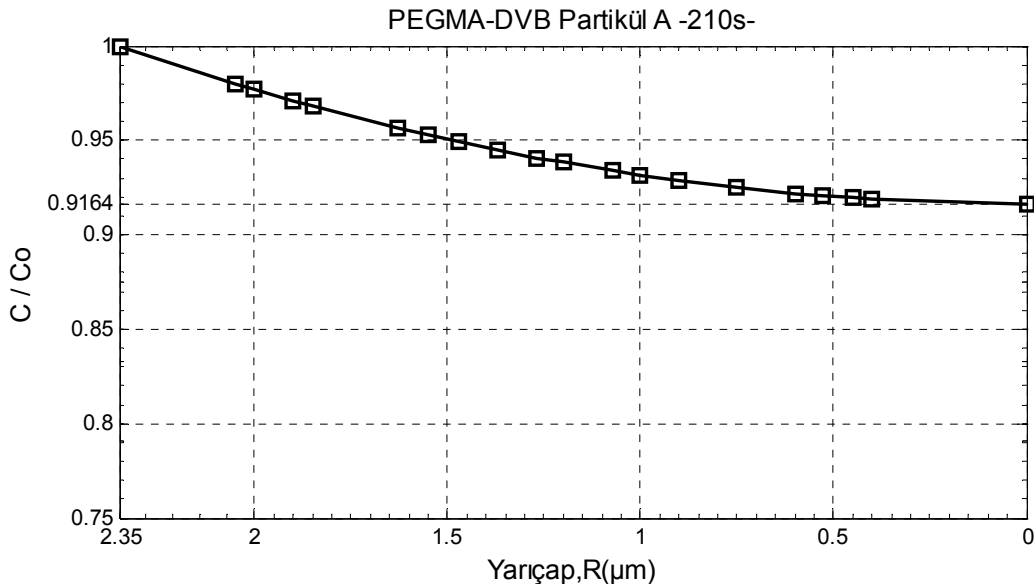
Şekil 4.7. PEGMA-DVB Partikül A : t=180s' de partikül içi konsantrasyon profili



Şekil 4.8. PEGMA-DVB Partikül A : t=190s' de partikül içi konsantrasyon profili

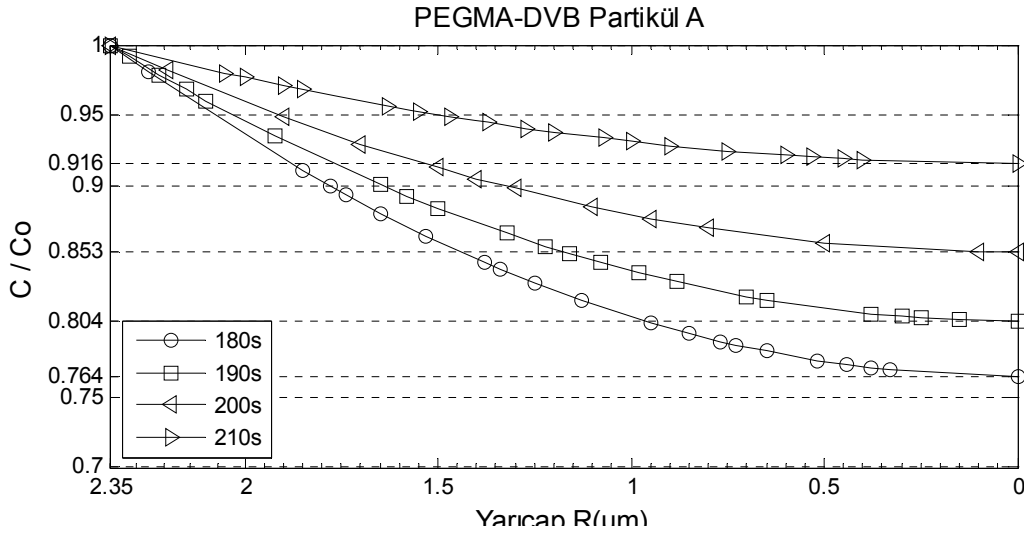


Şekil 4.9. PEGMA-DVB Partikül A : t=200s' de partikül içi konsantrasyon profili

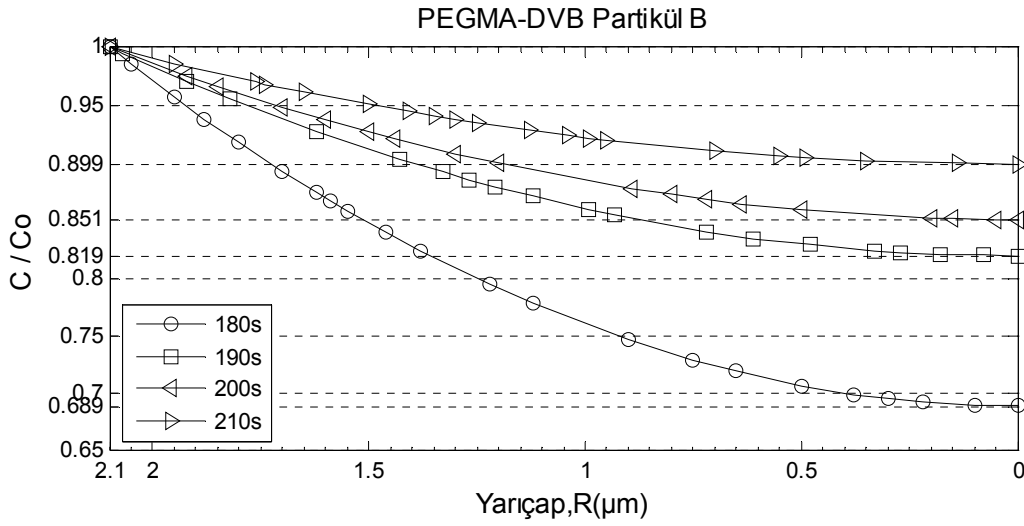


Şekil 4.10. PEGMA-DVB Partikül A : t=210s 'de partikül içi konsantrasyon profili

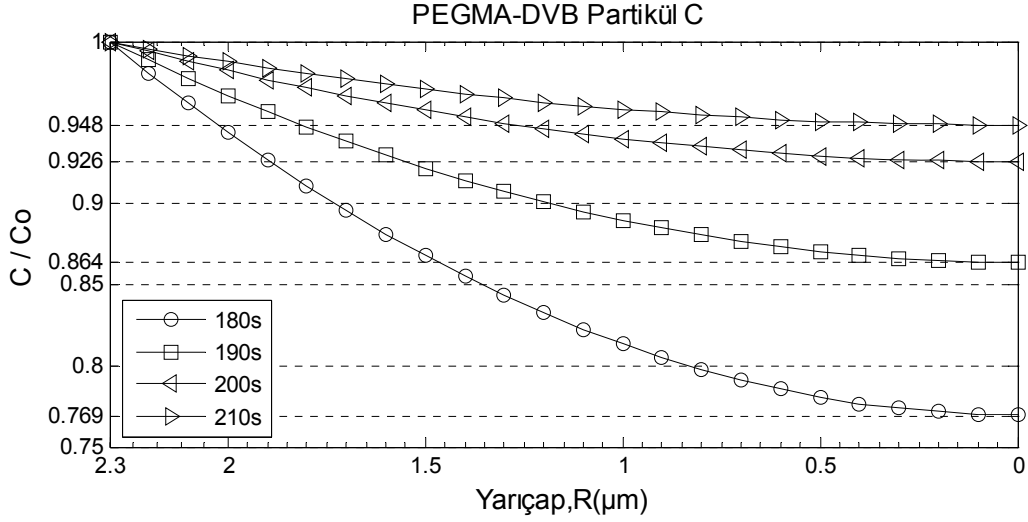
PEGMA-DVB Partikül A örneğinde olduğu gibi partikül B ve partikül C de aynı şekilde incelenmiştir. C / C_o değerleri partikül içi pozisyona karşı grafike edilmiş ve böylece derişim profili saptanmıştır. Partikül B ve partikül C ye ait zamanla değişen derişim profilleri zaman değişkeninin profil fonksiyonuna etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için toplu olarak tek bir grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.11. PEGMA-DVB Partikül A : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi profil fonksiyonunun değişimi.



Şekil 4.12. PEGMA-DVB Partikül B : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi profil fonksiyonunun değişimi.



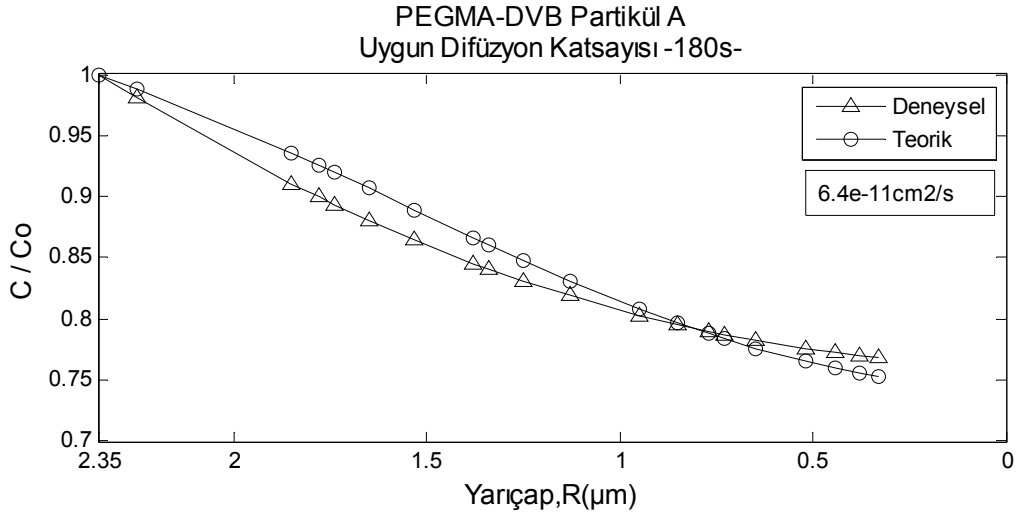
Şekil 4.13. PEGMA-DVB Partikül C : t=180s – 210s zaman aralığında partikül içi profil fonksiyonunun değişimi.

4.3. Etkin difüzyon katsayısının hesaplanması

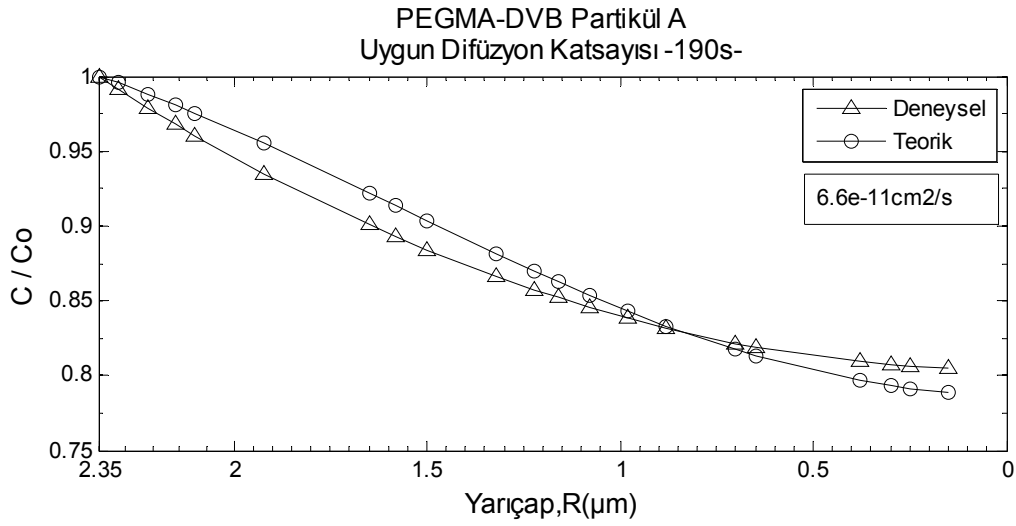
LSCM tarafından taranan resim, MATLAB R2007b yazılımı tarafından analiz edilmektedir. Partikül çapına karşı intensite değerleri partikül içi derişim profil fonksiyonunu elde etmek için kullanılır. Daha sonra deneysel veriler (C/Co - r/a çiftleri), MATLAB R2007b programında mikroküre yüzeyindeki konsantrasyon sabit kabul edilerek elde edilen Fick'in ikinci kanununun çözümüne dayandırılır.

$$\frac{C - C_1}{C_0 - C_1} = \frac{a}{r} \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)a - r}{2\sqrt{(Dt)}} - \operatorname{erfc} \frac{(2n+1)a + r}{2\sqrt{(Dt)}} \right\} \quad (2.14)$$

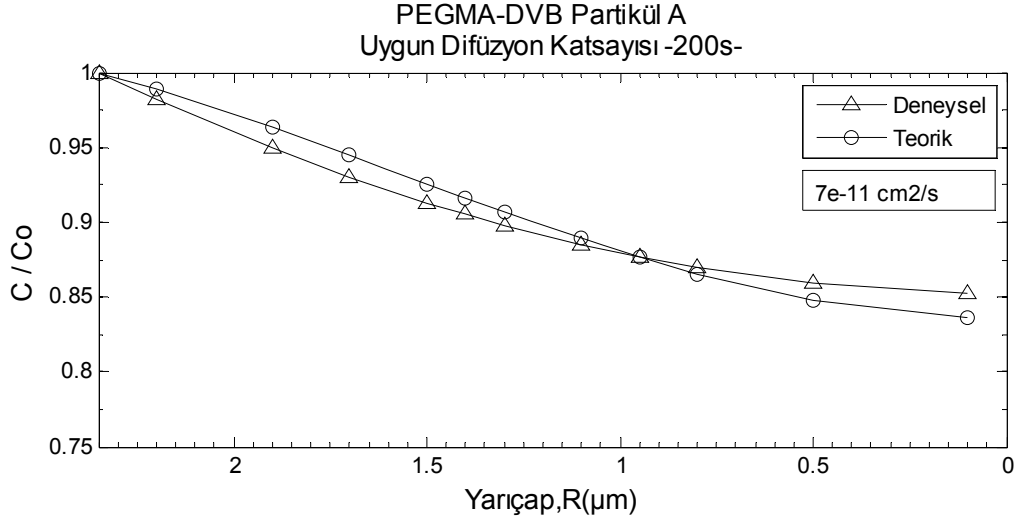
Bu denklemde t zaman, D polimer matriksteki etkin difüzyon katsayısını, C ve Co de sırasıyla polimer matriks içindeki ve yüzeydeki işaretlenmiş albumin derişimini göstermektedir. Yerleştirme D'nin değerlerini elde etmek için n = 12 değeri kullanılarak, doğrusal olmayan regresyonda en küçük karelere uyumlu olarak yürütülmüştür. n = 12 değerinden daha büyük değerler kullanmak D'nin yerleştirilmiş değerini değiştirmeyecektir. Aşağıdaki grafiklerde A, B ve C partiküllerinin belirtilen zamanlardaki etkin difüzyon katsayıları hesaplanmıştır.



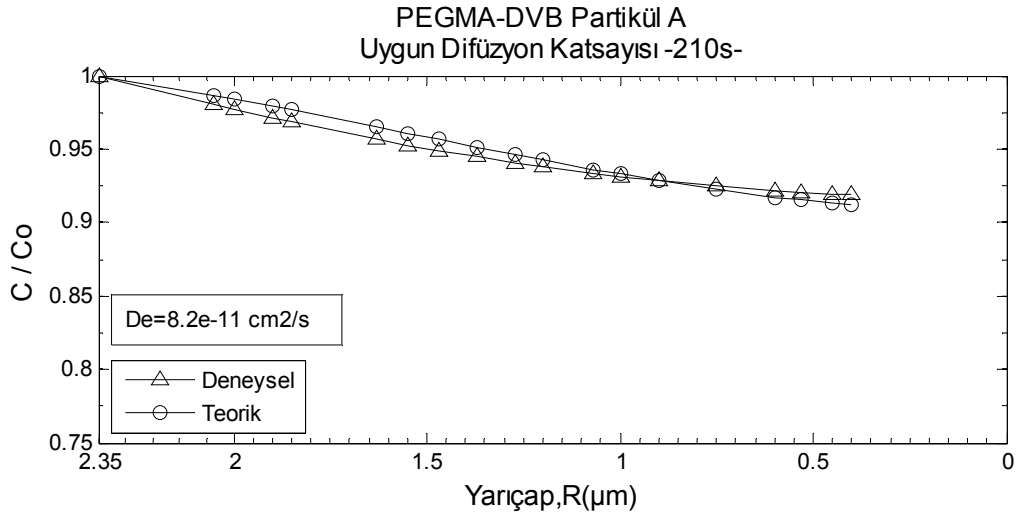
Şekil 4.14. PEGMA-DVB Partikül A: $t=180\text{s}$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



Şekil 4.15. PEGMA-DVB Partikül A: $t=190\text{s}$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



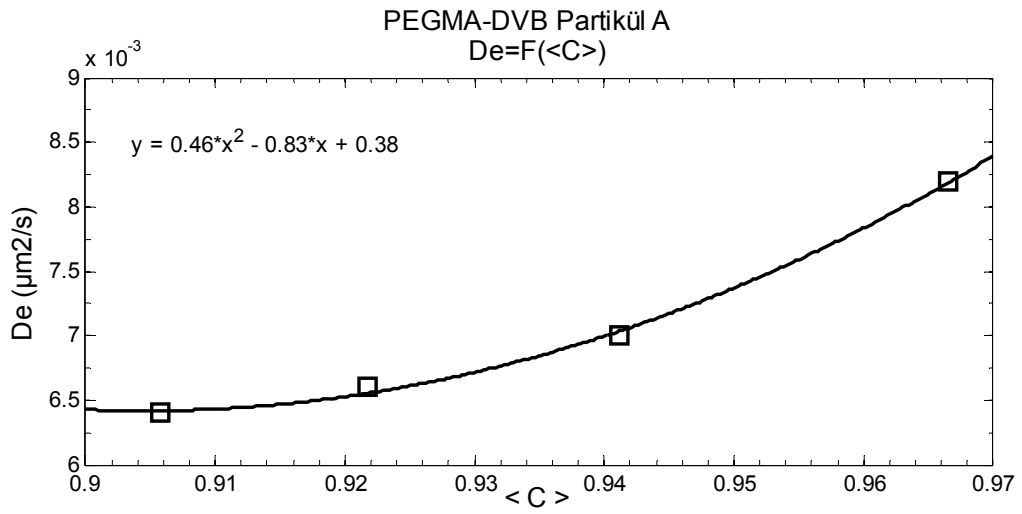
Şekil 4.16. PEGMA-DVB Partikül A: t=200s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



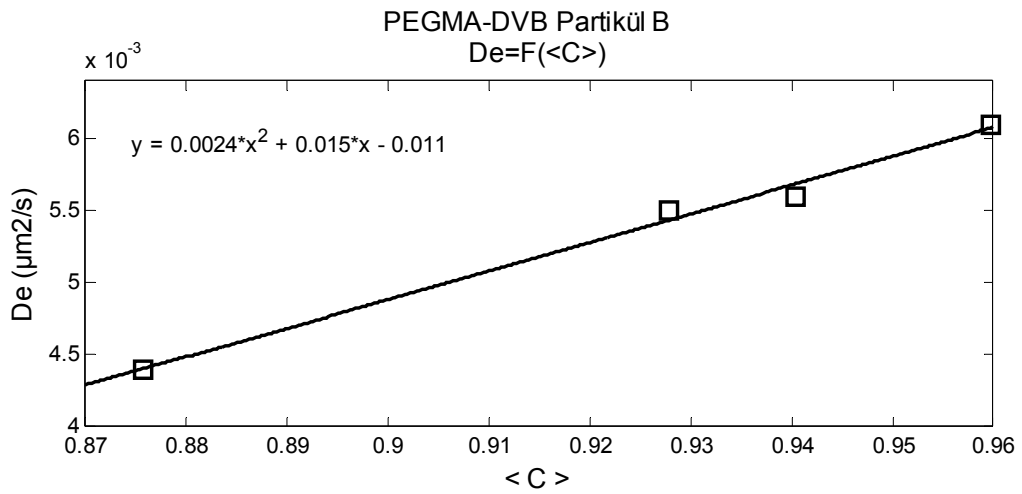
Şekil 4.17. PEGMA-DVB Partikül A: t=210s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması

Çizelge 4.3 PEGMA-DVB partikülleri için belirtilen zamanlarda partikül içi ortalama konsantrasyon ve etkin difüzyon katsayıları

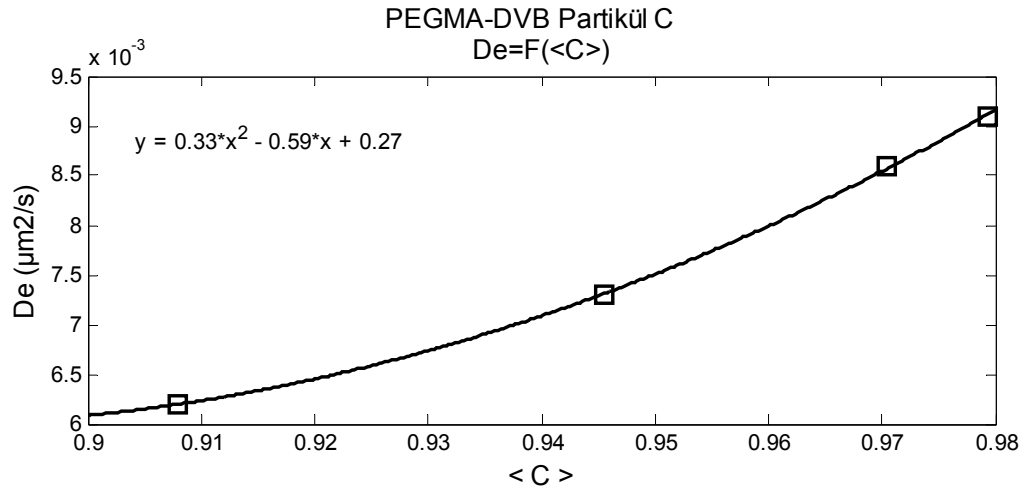
PEGMA-DVB Zaman (s)	Partikül A		Partikül B		Partikül C	
	De($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	<C>	De($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	<C>	De($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	<C>
180s	0.0064	0.9057	0.0044	0.8757	0.0062	0.9079
190s	0.0066	0.9217	0.0055	0.9278	0.0073	0.9456
200s	0.007	0.9412	0.0056	0.9403	0.0086	0.9704
210s	0.0082	0.9666	0.0061	0.9597	0.0091	0.9794



Şekil 4.18. PEGMA-DVB Partikül A: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi



Şekil 4.19. PEGMA-DVB Partikül B: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi



Şekil 4.20. PEGMA-DVB Partikül C: Yatışkın olmayan durumda ortalama konsantrasyona karşı etkin difüzyon katsayısının değişimi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada protein ayrımı için yüksek performanslı sıvı kromatografisinde kolon dolgu materyali olarak kullanılan poli(polietilen glikol metakrilat-co-divinil benzen) bazlı monodispers ve gözenekli partiküllerde model protein olarak albumin kullanımıyla etkin difüzyon katsayısı tayini yapılmıştır. Bu amaçla bir difüzyon katsayısı tayin yöntemi geliştirilmiştir.
- Etkin difüzyon katsayısı tayininin yapılabilmesi için floresan işaretli albumin kullanılarak, değişkin durum difüzyon prosesinde partikül içi protein derişim profili, farklı zaman değerleri için CLSM kullanılarak tayin edilmiştir.
- Floresan işaretli albumin için poli(polietilen glikol metakrilat-co-divinil benzen) partiküller içerisinde etkin difüzyon katsayısının 10^{-11} cm²/s mertebesinde olduğu görülmüştür.
- Albuminin etkin difüzyon katsayısının partikül içerisindeki ortalama albumin derişiminin fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. Etkin difüzyon katsayısı, ortalama albumin derişimine parabolik bir ifade ile bağlanmıştır.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Bailey, J. E., Ollis, D. F., 1986, Applied enzyme catalysis. In: Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Ed., New York, NY, McGraw-Hill, pp. 157-227.

Almog, Y., Levy, M., Effect of Initiator on the Molecular Weight Distribution In Dispersion Polymerization of Styrene, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 18, 1-11, (1980).

Camli T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., Functional, Uniform, and Macroporous Latex Particles: Preparation, Electron Microscopic Characterization, and Nonspecific Protein Adsorption Properties, Journal of Applied Polymer Science, 84, 414, (2002).

Cawse, J. L., Lovell P. A., El-Aasser, M. S., Dispersion Polymerization, Emulsion Polymerization & Emulsion Polymers, Chichester, Wiley, (1997), pp:743-761.

Cheng, C. M., Micale, J., Vanderhoff, W., El-Aasser, M.S., monodisperse Porous Particles: Formation of the Porous Structure, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed., 30, 235-244, (1992a).

Cheng, C. M., Vanderhoff, W., El-Aasser, M.S., Synthesis and Characterization of Monodisperse Porous Polymer Particles, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed., 30, 245-256, (1992b).

Corner, T., Polyelectrolyte Stabilized Lattices: Preparation, Colloids and Surfaces, 119-129, (1981).

Ellingsten, T., Aune, O., Ugelstad, J., Hagen, S., Monosized Stationary Phases For Chromatography, Journal of Chromatography, 535, 147-161, (1990).

Galia, M., Svec, F., Frechet, J. M. J., Monodisperse 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 as a Porogen, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 32, 2169-2175, (1994).

Lok, K. P., Ober, C. K., Particle Size Control In Dispersion Polymerization of Styrene, Canadian Journal of Chemical Engineering, 63, 209-216, (1985).

Ober C.K., Hair M.L., The effect of Temperature and Initiator Levels on The Dispersion Polymerization of Polystyrene, *J. of Polym. Sci. :Chem. Ed.*, 25, 1395, (1987).

Ober C.K., Hair M.L., Monodispersed, micron-sized Polystyrene Particles by Dispersion Polymerization, *J. of Polym. Sci.*, 23, 103-108, (1985).

Okuba, M., Nakagawa, T., Studies on Suspension and Emulsion, Preparation of Micron Size Monodispers Polymer Particles Having Highly Crosslinked Structures and Vinyl Groups By Seeded Polymerization of Divinylbenzene Using the Dynamic Swelling Method, *Colloids and Polymer Science*, 270,853-858, (1992).

Paine, A. J., Luymes, W., Mc Nulty, J., Dispersion Polymerization of Styrene In Polar Solvents: Influence of Reaction Parameters On Particle Size and Molecular Weight in Poly(N-Vinylpyrrolidone) Stabilized Reactions, *Macromolecules*, 23, 3104-3108, (1990).

Shepperd CJR., Shotton D.M., *Confocal Laser Scanning Microscopy*, BIOS Scientific Publishers, London, (1997)

Svec, F., Frechet, J. M. J., New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis, *Science*, 273, 205-211, (1996).

Tseng C. M., Lu Y.Y., El Aasser M.S., Vanderhoff J.W., Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerisation in Alcohol, *Polymeric Materials Science and Engineering*, 54, 362-366, (1986).

Tuncel A., Electron Microscopic Observation of Uniform Macroporous Particles: II. Effect of Divinylbenzene Concentration, *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 2291-2302, (1999).

Tuncel A., Tuncel, M., Salih, B., Electron Microscopic Observation of Uniform Macroporous Particles: I. Effects of Seed Latex Type and Diluent, *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 2271-2290, (1999).

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

EK.1

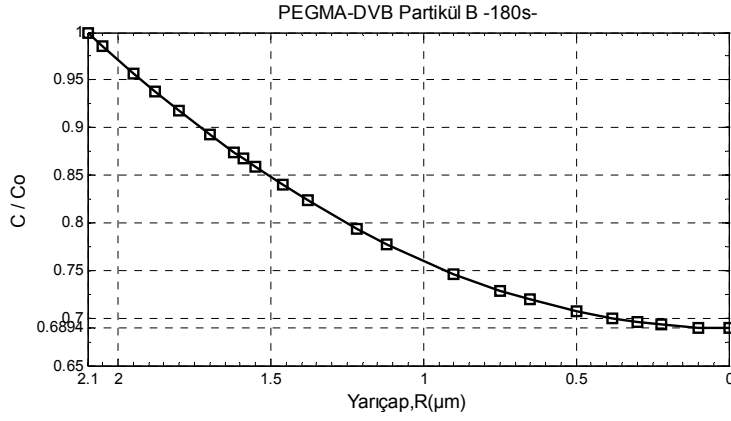
MATLAB Programming File

PEGMA-DVB Partikül A'nın t=180s' de uygun difüzyon katsayısının bulunması için yazılan en küçük kareler regrasyonu programı.

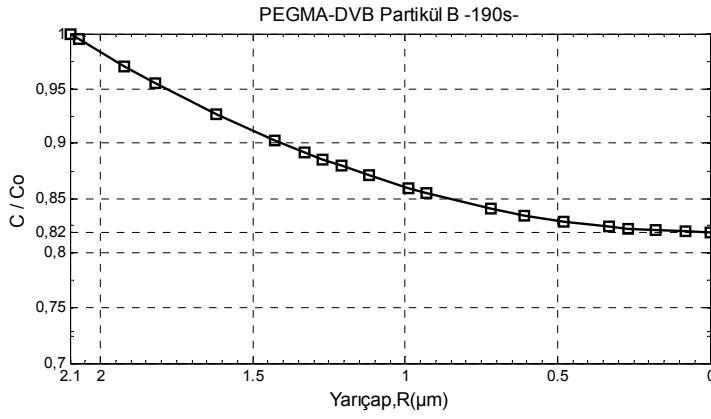
```
expradius=[0.33, 0.38, 0.44, 0.52, 0.65, 0.73, 0.77,...
    0.85, 0.95, 1.13, 1.25, 1.34, 1.38, 1.53, 1.65, 1.74, 1.78, 1.85,
    2.25, 2.35];

expconcc = [0.76906, 0.77058, 0.77267, 0.77595, 0.78244, 0.78715, 0.78971,
    0.79524, 0.80292,...
    0.81889, 0.83107, 0.84101, 0.84566, 0.86428, 0.88056, 0.89357,
    0.89958, 0.91042, 0.98038, 1];
a= 2.35; % um
t=180; % s
D_ilk = 5e-5;
D_son = 5e-3;
hD = 5e-4;
D=D_ilk;
h = waitbar(0, 'Islem Devam Ediyor, ');
N=length(expradius);
rms=1000;
TS = ((D_son-D_ilk)/hD +1);
for k = 1 : TS
    waitbar(k/TS)
for i=1:length(expradius)
    r(i)=expradius(i);
    summation=0;
    for n=0:12
        summation = summation + erfc(((2*n+1)-
(r(i)/a))/(2*(D*t/a^2)^(1/2))) -
erfc(((2*n+1)+(r(i)/a))/(2*(D*t/a^2)^(1/2)));
    end
    cc0(i) = (1/(r(i)/a))*summation;
end
for i=1:N
    dif(i)= (abs(cc0(i)-expconcc(i)))^2;
end
rms_error= (sum(dif)/N)^0.5;
if rms_error <= rms
    rms = rms_error;
    D_temp = D;
else
    rms=rms;
end
D =D + hD;
end
D = D_temp; % En uygun D değeri
close(h)
clc
'En uygun D değeri = ',disp (D)
'RMS (Root Mean Square) = ',disp (rms)
plot(expradius,expconcc, 'b')
hold on
plot(r, cc0, 'r')
```

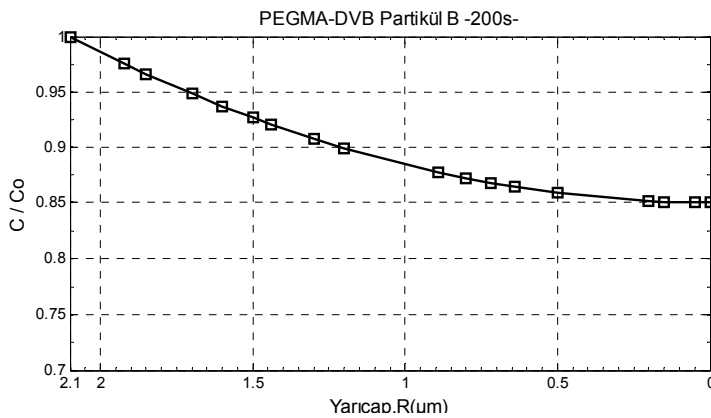
EK.2 Partikül B ve Partikül C'ye ait Derişim Profilleri



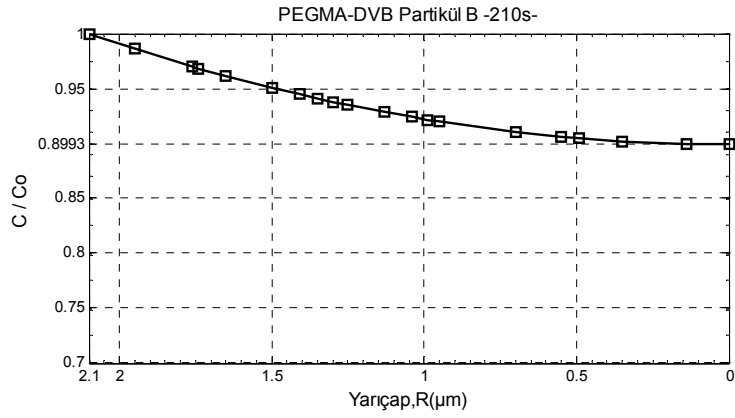
Şekil 4.21. PEGMA-DVB Partikül B : t=180s' de partikül içi konsantrasyon profili



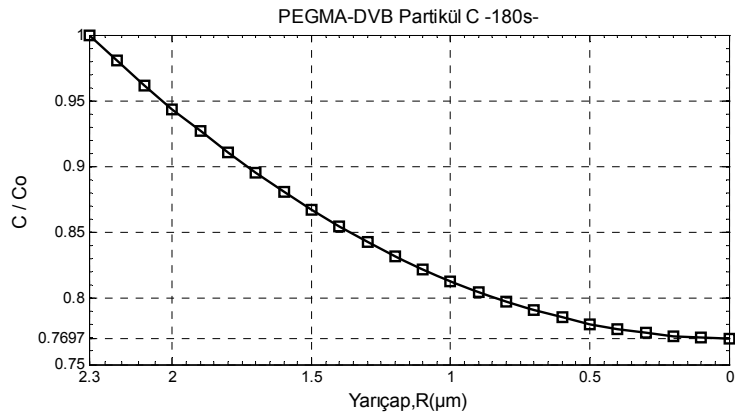
Şekil 4.22. PEGMA-DVB Partikül B : t=190s' de partikül içi konsantrasyon profili



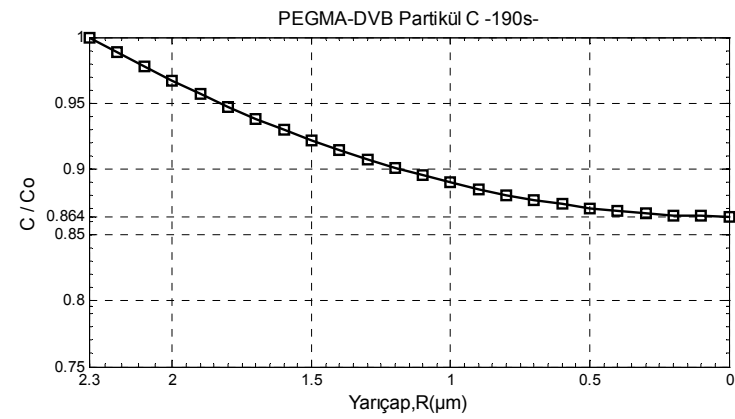
Şekil 4.23. PEGMA-DVB Partikül B : t=200s' de partikül içi konsantrasyon profili



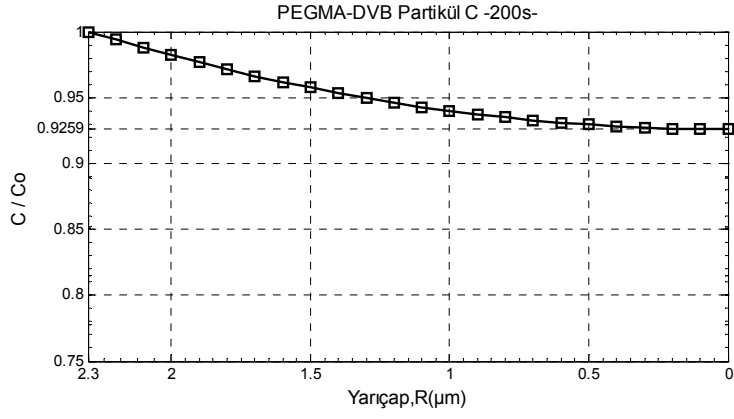
Şekil 4.24. PEGMA-DVB Partikül B : t=210s' de partikül içi konsantrasyon profili



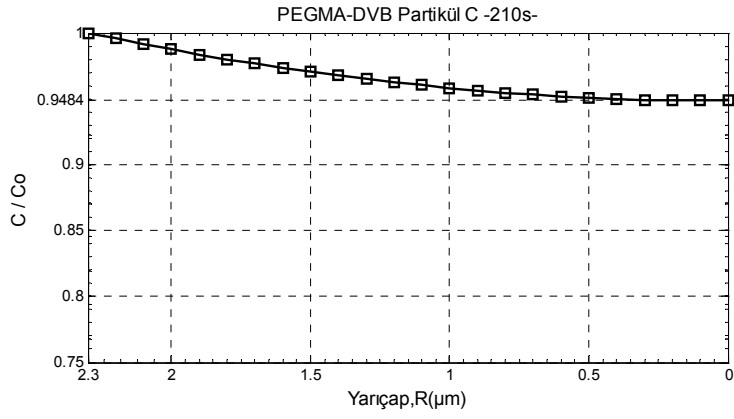
Şekil 4.25. PEGMA-DVB Partikül C : t=180s' de partikül içi konsantrasyon profili



Şekil 4.26. PEGMA-DVB Partikül C : t=190s' de partikül içi konsantrasyon profili



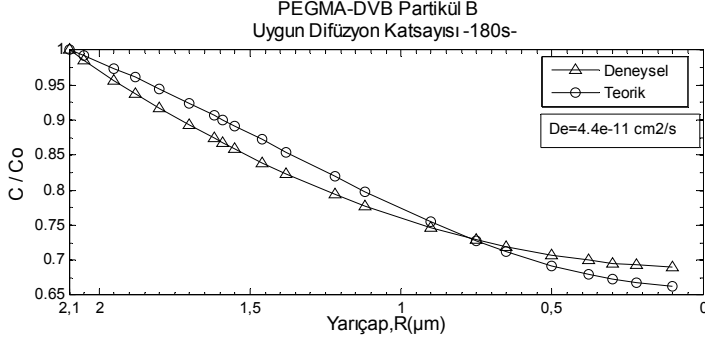
Şekil 4.27. PEGMA-DVB Partikül C : t=200s' de partikül içi konsantrasyon profili



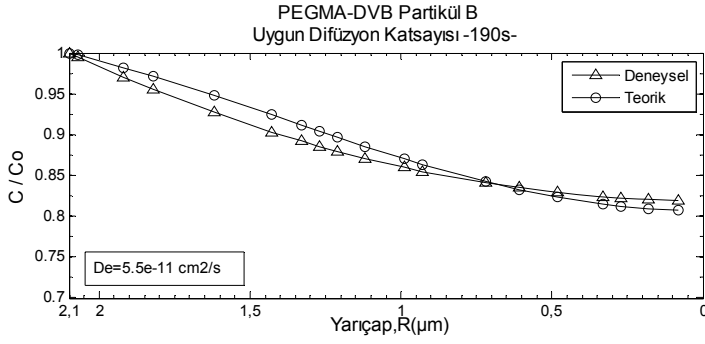
Şekil 4.28. PEGMA-DVB Partikül C : t=210s' de partikül içi konsantrasyon profili

EK.3

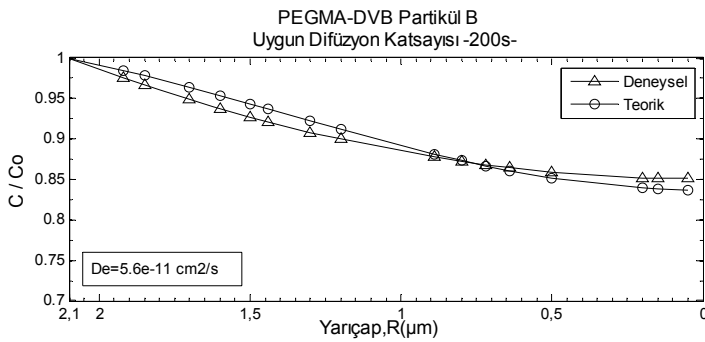
Partikül B ve Partikül C'ye ait Etkin Difüzyon Katsayıları



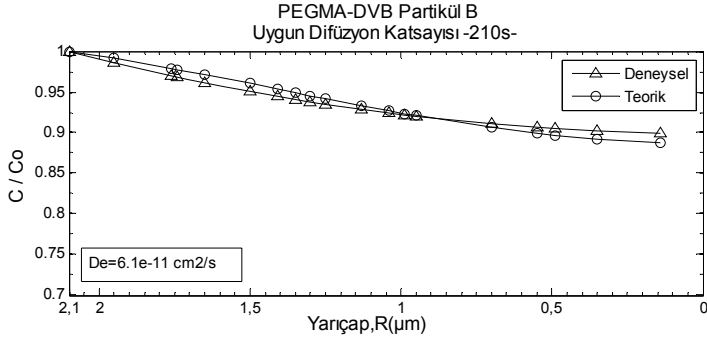
Şekil 4.29. PEGMA-DVB Partikül B: t=180s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



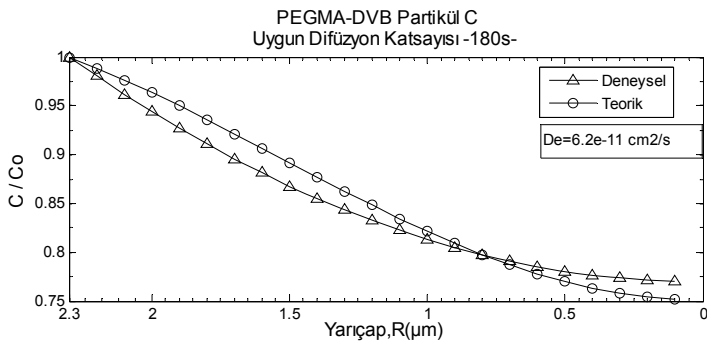
Şekil 4.30. PEGMA-DVB Partikül B: t=190s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



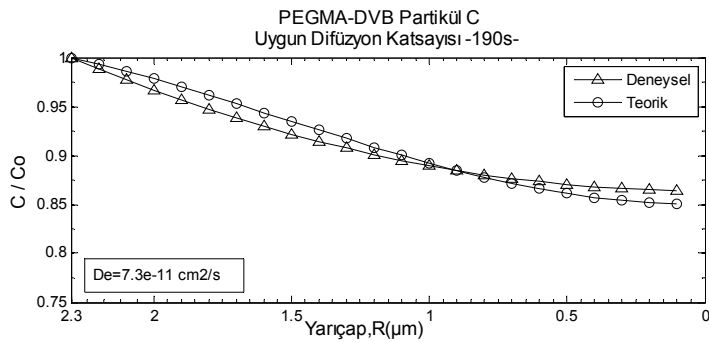
Şekil 4.31. PEGMA-DVB Partikül B: t=200s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



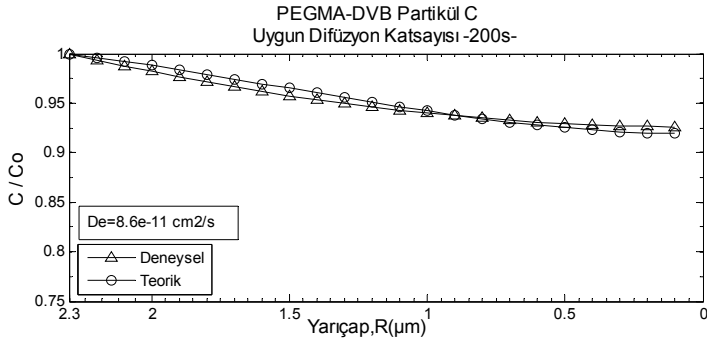
Şekil 4.32. PEGMA-DVB Partikül B: t=210s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



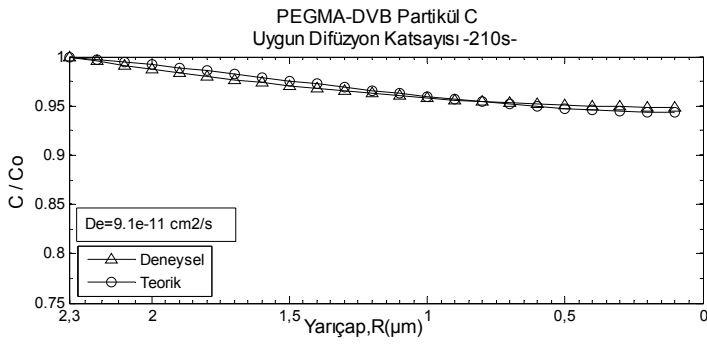
Şekil 4.33. PEGMA-DVB Partikül C: t=180s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



Şekil 4.34. PEGMA-DVB Partikül C: t=190s etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



Şekil 4.35. PEGMA-DVB Partikül C: $t=200\text{s}$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması



Şekil 4.36. PEGMA-DVB Partikül C: $t=210\text{s}$ etkin difüzyon katsayısının hesaplanması

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümit Volkan Uçak

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : İnönü Lisesi, Ankara, 1996-1999

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 1999–2004

Yabancı Dil : İngilizce