

**T.C.  
HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İMMOBİLİZE METAL AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİNDE ŞELATLAYICI  
KARAKTERİNİN ADSORPSİYONA ETKİSİ**

**Beray EROL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ebru GÖKMEŞE**

**ŞUBAT 2018  
ÇORUM**

Beray EROL tarafından hazırlanan “İmmobilize Metal Afinite Kromatografisinde Şelatlayıcı Karakterinin Adsorpsiyona Etkisi” adlı tez çalışması 19/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Lokman UZUN (Başkan)




Doç. Dr. Ebru GÖKMEŞE (Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Sevil ÖZKINALI (Üye)



Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 16/03/2018 tarih ve 2018/95 sayılı kararı ile Beray EROL’un Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.



Doç. Dr. Cengiz BAYKASOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BEYANI

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



Beray EROL

# IMMOBİLİZE METAL AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİNDE ŞELATLAYICI KARAKTERİNİN ADSORPSİYONA ETKİSİ

Beray EROL

HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2018

## ÖZET

Kriyojellerin kromatografik işlemlerde bilim adamları tarafından son zamanlarda fazlaca tercih edilmesi bu polimerleri oldukça popüler hale getirmiştir. Bu yapılardan sürekli ve kesikli sistemlerde adsorban olarak yararlanılmaktadır. Bu çalışmada poli(2-hidroksietilmetakrilat-glisidil metakrilat), poli(HEMA-GMA), kriyojeller sentezlenmiş ve sonrasında *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridin bileşikleri yapıya ligand olarak bağlanmıştır. Son aşamada ise kriyojellere Cu(II), Ag(I) ve Zn(II) iyonları immobilize edilmiş ve bu yapılar sulu sistemlerden insülin molekülünün adsorpsiyonunda kullanılmıştır. En yüksek insülin adsorplama performansı *p*-amino piridin ligandının bağlı olduğu ve Cu(II) iyonlarının immobilize olduğu kriyojelde gözlemlenmiştir. Kriyojellerin insülin adsorpsiyonu değişen pH, etkileşim süresi, başlangıç insülin derişimi, sıcaklık ve iyonik şiddet koşullarında test edilmiştir. Kriyojellerin karakterizasyonu için; şişme testi, Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi, termal analiz, yüzey alanı analizi, elementel analiz ve Bilgisayarlı Mikrotomografi ( $\mu$ CT) analizi yapılmıştır. Kriyojellerin adsorplama kapasitesi yaklaşık olarak 242 mg insülin/g kriyojel olarak hesaplanmıştır. Adsorpsiyon işlemi, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri üzerinden analiz edilmiş ve Langmuir adsorpsiyon modelinin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Adsorpsiyon kinetiğinin ise yalancı-ikinci derece modele uygun olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Adsorpsiyon, Afinite, İnsülin, Kriyojel, Ligand.

**THE EFFECT OF THE CHELATOR CHARACTERISTICS ON  
ADSORPTION IN IMMOBILIZED METAL AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY**

Beray EROL

HITIT UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2018

**ABSTRACT**

The fact that cryogels have been highly preferred by scientists in chromatographic processes in recent times has made these polymers very popular. These structures are used as an adsorbent in continuous and batch systems. In this study, poly(2-hydroxyethyl methacrylate-glycidyl methacrylate), poly(HEMA-GMA), cryogels were synthesized and then *p*-aminobenzoic acid and *p*-aminopyridine compounds were ligated to the structure. Cu(II), Ag(I) and Zn(II) ions were immobilized in the cryogels and these structures were used for adsorption of insulin molecules from aqueous systems. The highest insulin adsorption performance was observed in the cryogel that the *p*-aminopyridine ligand was bound and the Cu(II) ions were immobilized. Insulin adsorption of cryogels was tested at varying pH, interaction time, initial insulin concentration, temperature and ionic strength. For the characterization of cryogels; Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis, thermal, surface area, elemental and Computerized Microtomography ( $\mu$ CT) analysis methods were performed. The adsorption capacity of the cryogels was estimated as approximately 242 mg insulin/g cryogel. The adsorption process was characterized by Langmuir and Freundlich adsorption models, and Langmuir adsorption model was found to be more suitable. The adsorption kinetics were found to be appropriate for the pseudo-second-order model.

**Keywords:** Adsorption, Affinity, Cryogel, Insulin, Ligand.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam, bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını yapan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki meslek hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım ve her daim örnek alacağım, danışman hocam Doç. Dr. Ebru GÖKMEŞE'ye teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana yardımda bulunarak yol gösteren sayın hocam Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Faruk GÖKMEŞE'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili annem Azize BÜLTER'e, her zaman yanımda olan, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli eşim Yrd. Doç. Dr. Kadir EROL'a ve biricik kızım Selin EROL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

*Beray Erol*  
*Çorum, 2018*

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. İyon Değişim Kromatografisi.....	2
2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	4
2.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi .....	6
2.4. Afinite Kromatografisi .....	6
2.5. Adsorpsiyon.....	8
2.6. Immobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) .....	11
2.7. Kriyojel.....	12
2.8. İnsülin.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	15
3.1. Kimyasal Maddeler .....	15
3.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Hazırlanması .....	15
3.3. Kriyojellere <i>p</i> -Amino Benzoik Asit ve <i>p</i> -Amino Piridin Bağlanması .....	16
3.4. Kriyojellere Metal Bağlanması.....	17
3.5. Karakterizasyon Çalışmaları .....	18
3.5.1. Şişme testi .....	18
3.5.2. Yüzey morfolojisi .....	19

**Sayfa**

3.5.3. Elemental analiz.....	19
3.5.4. FTIR çalışmaları .....	19
3.5.5. Yüzey alanı analizi.....	20
3.5.6. Termal analiz .....	20
3.5.7. Bilgisayarlı mikrotomografi ( $\mu$ CT) analizi.....	20
3.5.8. SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi.....	20
3.6. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	21
3.6.1. Sulu çözeltilerden insülin adsorpsiyonu .....	21
3.6.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik .....	22
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Kriyojellerin İnsülin Adsorpsiyon Performanslarının Karşılaştırılması.....	23
4.2. Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	24
4.2.1. Şişme testi .....	24
4.2.2. Yüzey morfolojisi .....	24
4.2.3. Elemental analiz.....	25
4.2.4. FTIR çalışmaları .....	25
4.2.5. Yüzey alanı analizi.....	25
4.2.6. Termal analiz çalışmaları.....	30
4.2.7. Bilgisayarlı mikrotomografi analizi ( $\mu$ CT).....	33
4.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	33
4.3.1. pH etkisi .....	33
4.3.2. Etkileşim süresinin etkisi .....	34
4.3.3. İnsülin derişiminin etkisi .....	35
4.3.4. Sıcaklığın etkisi.....	36
4.3.5. İyonik şiddetin etkisi.....	37
4.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	38
4.5. Ligandsız ve Metalsiz Polimer İle Karşılaştırma .....	39
4.6. SDS-PAGE Analizi .....	40
4.7. Matematiksel Modellemeler .....	41



	<b>Sayfa</b>
4.7.1. Adsorpsiyon izotermleri .....	41
4.7.2. Adsorpsiyon kinetik modelleme .....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	48
KAYNAKLAR .....	51
ÖZGEÇMİŞ .....	59



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tampon tuzları ve pH aralıkları.....	3
Çizelge 2.2. İyon değişim reçineleri ve fonksiyonel grupları.....	4
Çizelge 4.1. Kriyojellerin elementel analiz ve ICP-OES sonuçları.....	24
Çizelge 4.2. Termal bozunma basamakları.....	32
Çizelge 4.3. Adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	44
Çizelge 4.4. Yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitler.....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Adsorpsiyon mekanizmasının şematik gösterimi .....	11
Şekil 2.2. İnsan insülin molekülünün yapısı .....	14
Şekil 3.1. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin yapısı.....	16
Şekil 3.2. Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino benzoik asit kriyojelin yapısı.....	17
Şekil 3.3. Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino piridin kriyojelin yapısı .....	17
Şekil 3.4. Metal bağlanmış <i>p</i> -amino benzoik asit ve <i>p</i> -amino piridinli kriyojeller ...	18
Şekil 4.1. Kriyojellerin insülin adsorpsiyon performansları.....	23
Şekil 4.2. Pr-Cu(II) kriyojellerin SEM görüntüleri.....	27
Şekil 4.3. Poli(HEMA-GMA), Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino piridin ve Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino benzoik asit kriyojellerin FT-IR spektrumları .....	28
Şekil 4.4. Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino piridin ve Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino piridin-Cu(II) kriyojellerin FT-IR spektrumları.....	29
Şekil 4.5. Poli(HEMA-GMA)- <i>p</i> -amino piridin-Cu(II) polimerinin termal analiz grafiği .....	32
Şekil 4.6. Poli(HEMA-GMA) ve Pr-Cu(II) kriyojellerin Mikro-CT görüntüleri .....	33
Şekil 4.7. İnsülin adsorpsiyonuna pH etkisi. İnsülin derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C .....	34
Şekil 4.8. İnsülin adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi. İnsülin derişimi: 1000 mg/L; pH: 5,0; sıcaklık 25°C .....	35
Şekil 4.9. İnsülin adsorpsiyonuna insülin derişiminin etkisi. Etkileşim süresi: 30 dak.; pH: 5,0; sıcaklık 25°C .....	36
Şekil 4.10. İnsülin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. İnsülin derişimi: 3000 mg/L; pH: 5,0; etkileşim süresi: 30 dak.....	37
Şekil 4.11. İnsülin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. İnsülin derişimi: 3000 mg/L; pH: 5,0; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 4°C .....	38
Şekil 4.12. Pr-Cu(II) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği .....	39
Şekil 4.13. Kriyojellerin ligand ve metal iyonuna bağlı olarak insülin adsorplama kapasiteleri .....	40
Şekil 4.14. SDS-PAGE analizi .....	41
Şekil 4.15. Langmuir izotermi .....	42
Şekil 4.16. Freundlich izotermi.....	44

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 4.17.</b> Pr-Cu(II) ve insülin etkileşimi için deneysel verilerin yalancı birinci derece kinetiği .....	46
<b>Şekil 4.18.</b> Pr-Cu(II) ve insülin etkileşimi için deneysel verilerin yalancı ikinci derece kinetiği .....	47



## SİMGE VE KISALTMALAR

### Simgeler

Å	angström
q	adsorplama kapasitesi
rpm	dakikadaki devir sayısı
g	gram
L	litre
µL	mikrolitre
mg	miligram
°C	santigrat derece
%	yüzde
mM	milimolar

### Kısaltmalar

APS	amonyum persülfat
dak	dakika
DTA	diferansiyel termal analiz
EGDMA	etilen glikol dimetilakrilat
GMA	glisidil metakrilat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
IMAC	immobilize metal afinite kromatografisi
SDS	sodyum dodesil sülfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletildiamin
TGA	termal gravimetrik analiz

## 1. GİRİŞ

Kromatografi, bir karışımdaki bileşiklerin birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılması ile ayrılmalarını sağlayan fiziksel bir ayırma tekniğidir. Bu fazlardan bir tanesi film, tabaka, jel vb. yapısında olan sabit bir faz iken diğeri akışkan bir yapıya sahip olan hareketli fazdır.

Günümüzde bir proteinin istenilen saflıkta elde edilebilmesi için birkaç saflaştırma basamağı bir arada uygulanmaktadır. Bir karışım içerisinde bulunan spesifik bir proteinin bu karışımdan ayrılabilmesi için proteinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu durum uygun saflaştırma yönteminin seçimi için de çok önemlidir. Bir proteinin saflaştırılması için olumlu sonuç veren bir yöntem başka bir proteinin saflaştırılması için olumsuz sonuçlar doğurabilir. Bir proteinin bulunduğu ortamdaki diğer proteinlerden ayrılmasında sahip olduğu çözünürlük, boyut, yük ve spesifik bağlanma gibi özellikler belirleyici rol oynamaktadır. Proteinlerin yüzeyinde bulunan polar ve apolar amino asit grupları proteinlerin çözünürlüğünü etkilerken, yapılarında bulunan asidik (aspartik asit ve glutamik asit) ve bazik (arjinin, lisin, histidin) amino asitler ise yük dağılımlarını belirlemektedir.

Son yıllarda oldukça fazla kullanılan kromatografik tekniklerden iyon değişim kromatografisi farklı yüklere sahip proteinlerin ayrılmasında, jel filtrasyon kromatografisi farklı büyüklüğe sahip proteinlerin ayrılmasında, hidrofobik etkileşim kromatografisi polar ve apolar proteinlerin ayrılmasında ve afinite kromatografisi de farklı spesifik bağlanmalar gösteren proteinlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Proteinler; sıcaklık, pH, organik çözücü ya da oksidatif atmosfer koşullarından oldukça fazla etkilenmekte ve yapıları denatüre olabilmektedir. Bu sebeple bir kromatografik ayırma işlemi sırasında bu koşullara oldukça dikkat edilmesi gerekmektedir. Koşulların değiştirilmemesi ya da kontrollü bir şekilde değiştirilmesi ayırma-saflaştırma işlemlerinin başarısı açısından büyük önem arz etmektedir.

Kromatografi yöntemi; kimya, biyoloji, tıp, gıda ve çevre alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. İyon Değişim Kromatografisi

Proteinlerin yüzeylerinde bulunan aminoasitlerin yan zincirlerinin içerdiği yüklü gruplar, çözücü ile etkileşerek proteinlerin çözünürlüğünü belirlemektedir. Fizyolojik pH noktasında bazı aminoasit grupları pozitif yüklü iken (arginin, lisin, histidin), bazı aminoasit grupları da negatif yüklüdür (aspartat ve glutamat). Bir proteinin net yükü de bu gruplar arasındaki denge ve pH'a bağlı olarak belirlenmektedir. İzoelektrik nokta (pI) kavramının temeli de buraya dayanmaktadır. Buradan hareketle düşünüldüğünde farklı pH değerinde proteinlerin farklı net yüklere sahip olduğu düşünülür. Bu husus iyon değişim kromatografisinin ayırma prensibinin temelini oluşturmaktadır (Boudesocque ve ark., 2017).

İyon değişim kromatografisi yüksek ayırma kapasitesi, nispeten düşük maliyeti ve hassas temizleme işlemleri sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle küçük ve orta büyüklükte proteinlerin ayırma-safılaştırma işlemlerinde tercih edilse de, plazmid DNA'sı, virüs ve immunoglobulin proteinlerinin kromatografik işlemlerinde de bu yöntemden yararlanılmaktadır. Bu yöntemde kolon içinde bulunan dolgu maddesine (sabit faz) immobilize edilmiş olan iyon değiştirici gruplar bulunmaktadır. Bu gruplar, ayırma-safılaştırma işlemine tabi tutulacak hedef moleküller ile zıt yüke sahiptir (Saavedra ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017). Ayırma işleminde ilk aşama olarak, kolondaki dolgu maddesi pH ve iyonik şiddet açısından dengeyi sağlamak için bir tampon çözelti ile yıkanmaktadır. Sonra numune kolona düşük iyonik şiddet altında verilmektedir. Kolondaki dolgu maddesi ve hedef protein arasındaki spesifik etkileşim bu noktada sağlanmaktadır (Kittelmann ve ark., 2017). Bir sonraki aşamada ise başlangıçta kullanılan yıkama tamponu ile protein kolondan elüe edilmektedir. Ancak kolondaki dolgu maddesi ve numune içindeki proteinler arasında farklı derecelerde bağlanmalar gerçekleşebileceği de unutulmamalıdır. Bunun için yıkama çözeltisindeki iyonik şiddetin kademeli olarak arttırıldığı bir işlem ile kolona zayıf bir güçle bağlanan proteinlerin kolondan önce ayrılması sağlanabilir. Yıkama çözeltinin iyonik şiddetinin artması ile kolona daha güçlü bağlanan proteinlerin de kolondan ayrılması

sağlanmaktadır. Bir düzen içerisinde gerçekleşen bu işleme fraksiyonlama adı verilmektedir. Fraksiyonlama ile bir elüsyon profili oluşturulmakta ve hedef proteinin yeri tespit edilmektedir.

Hedef protein ve kolon arasındaki etkileşim sadece iyonik gücün türüne ya da derecesine bağlı değildir. Aynı zamanda hedef protein üzerindeki yük dağılımı da önemlidir. Buna göre üzerindeki yükü ortamın pH'sına bağlı olarak değişen amfoterik moleküller için mobil fazın pH'sı da büyük öneme sahiptir. Bileşiğin net yükü bu pH değerinden etkilenmekte ve bileşiğin kolonda alıkonma süresi ve çözünürlüğü gibi parametreler net yükün durumuna göre değişmektedir.

İyon değişim kromatografisinde yaygın olarak kullanılan tampon tuzları ve kullanılabilecekleri pH aralıkları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Tampon tuzları ve pH aralıkları

Tampon Tuzu	pH Aralığı	Tampon Tuzu	pH Aralığı
Amonyak	8,2-10,2	Sodyum asetat	4,2-5,4
Amonyak tuzu	8,6-9,8	Sodyum borat	8,0-9,8
Amonyum fosfat	2,2-6,5	Sodyum dihidrojen fosfat	2,0-6,0/8,0-12,0
Sitrik asit	2,0-6,0	Sodyum format	3,0-4,4
Disodyum hidrojen sitrat	2,6-6,5	Sodyum perklorat	8,0-9,8
Potasyum dihidrojen fosfat	2,0-8,0/9,0-13,0	Sodyum nitrat	8,0-10,0
Potasyum hidrojen fitalat	2,2-6,5	Trietanolamin	6,7-8,7

Kolon kromatografisi işlemlerinin çoğunda olduğu gibi iyon değişim kromatografisi işleminde de bir sabit faz bulunmaktadır. Bu faz genel olarak reçine, desktran, selüloz vb. maddelerden oluşmaktadır. Hareketli faz ise tampon çözelti içindeki numunedir. Bu sistemde hareketli fazda bulunan polar yapıdaki numune, durağan faz üzerindeki zıt yüklü gruplar ile elektrostatik etkileşime girmektedir (Rea ve ark., 2015). Sabit fazı oluşturan reçineler de kendi arasında katyon değişim ve anyon değişim olarak iki temel gruba ayrılmaktadır. Proteinler pI değerlerinin altındaki pH değerlerinde pozitif,



üzerinde ise negatif yüklüdür. Bu yüzden katyon ve anyon değişim reçinelerinden hangisinin kullanılacağı noktasında işlemin gerçekleştirileceği ortamın pH değeri çok önemlidir. Tüm bunların yanında güçlü ve zayıf iyon değiştirici ligandlar da bu yöntemde belirleyici bir role sahiptir. Güçlü iyon değiştiriciler geniş bir pH aralığında kullanılabilme imkânına sahipken zayıf iyon değiştiriciler dar bir pH aralığında kullanılabilmektedir. Bunun sebebi zayıf ligandların değişen pH ile beraber yük özelliklerinde ve iyon değişim kapasitelerinde değişiklikler meydana gelmesidir. Bahsedilen iyon değişim reçineleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** İyon değişim reçineleri ve fonksiyonel grupları

İyon değiştirici	Türü	Fonksiyonel grubu
<b>Katyon</b>		
Sülfopropil (SP)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Metil sülfonat (S)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Karboksimetil (CM)	Zayıf	-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
<b>Anyon</b>		
Kuaterner amonyum (Q)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CHOH-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Kuaterner aminoetil (QAE)	Güçlü	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>
Dietilaminoetil (DEAE)	Zayıf	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> H(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

## 2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Apolar yapıdaki suyu sevmeyen grupların polar yapıdaki suyu seven grupları itme kuvvetine hidrofobisite denir. Protein ve peptitlerin yüzeyinde bulunan aminoasitlerin yan zincirlerinde yer alan hidrofobik grupların, bu moleküllerin yüzeyinde hidrofobisite oluşturması ve bu durumun proteinlerin üç ve dört boyutlu yapılarının kararlılığını sağladığı bilinmektedir (Vialaya ve Horvath, 1996; Querioz ve ark., 2001; McCue, 2009; Fekete ve ark., 2016).

Proteinler suda çözüldüklerinde hidrofobik gruplar sıralı su molekülleri ile kaplanmaktadır. Su moleküllerinin düzeninde artış meydana geleceği için de sistemin entropisi düşmektedir. Bu durum da termodinamik açıdan istemli bir tepkimedir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniği genellikle iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile beraber kullanılmaktadır. Bu teknikten yüzeyinde ağırlıklı olarak hidrofobik gruplar barındıran biyomolekülerin ayırma ve saflaştırma işlemlerinde yararlanılmaktadır. Hidrofobik ligandlar hidrofilik destek yapısına kimyasal olarak bağlanmakta veya polimerik reçinenin omurgasını oluşturmaktadır (Querioz ve ark., 2001; Lienqueo ve ark., 2007; Baca ve ark., 2016).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, bir protein ayırma-saflaştırma işlemine tabi tutulurken hidrofobisitesi en yüksek olan protein kolonda en fazla tutulmaktadır. Ayrıca büyük bir proteinin yüzeyindeki hidrofobik yük dağılımı her yerinde aynı değildir. Bu kromatografi çeşidinde ayırma işleminin optimizasyonu için önemli olan parametreler ligand ve matriks çeşidi dışında; tuz çeşidi ve derişimi, pH ve sıcaklıktır. Bu teknik içerisinde yaygın olarak kullanılan destek maddeleri hidrofobik özelliğın artışına göre bütıl, oktil ve fenil gruplarını içermektedir. Proteinlerin ligandlara bağlanma kuvveti, hareketli fazın iyonik şiddetinin veya tuz derişiminin artmasıyla artmaktadır (Fausnaugh ve ark., 1984). Amonyum sülfat gibi tuzlar hareketli fazın iyonik şiddeti ile birlikte yüzey gerilimini de arttırırken hareketli faz ile protein arasındaki hidrofobik etkileşim artmaktadır (salting-out) (Shaital ve Er-el, 1973; Melander ve Horvath, 1977). Amonyum tiyosiyanat veya amonyum iyodür gibi çözünürlüğü arttıran tuzlar (katotropik) ise hidrofobik etkileşimi azaltmaktadır (salting-in).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kolona bağlanan proteinlerin kolondan elüe edilmesi için birkaç yöntem tercih edilmektedir. Bu yöntemler; pH'ın arttırılması, sıcaklığın düşürülmesi ve liganda güçlü bir şekilde bağlanan ya da proteini daha hidrofilik yapan elüsyon ajanlarının kullanılmasıdır (Hierten ve ark., 1986; Perkins ve ark., 1997; Machold ve ark., 2002; Xia ve ark., 2004; Jangbauer ve ark., 2005; Haimer ve ark., 2007; Mahna ve ark., 2007; Nfor ve ark., 2011).

### 2.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Boyut dışlama veya moleküler eleme gibi isimleri de bulunmaktadır. Proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin boyutlarındaki farklılıklardan yararlanan bir ayırma tekniğidir. Bu yöntem; bir ya da daha fazla proteinin izolasyonunda, tampon çözeltinin tuzdan arındırılmasında ve protein yapısında olmayan safsızlıkların ve istenmeyen protein kümelerinin ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Costa ve ark., 2014; Jin ve ark., 2014; Moniz ve ark., 2014). Farklı gözenek boyutuna sahip katı desteklerin kullanıldığı bu yöntemde, gözeneklerin boyutları çapraz bağlayıcı miktarının değiştirilmesi ile belirlenmektedir. Moleküllerin boyut ve şekillerindeki farklılıklar gözeneklerden geçiş hızlarını da etkilemektedir.

Jel filtrasyon kromatografisinde yapılacak ayırımın başarılı olabilmesi; gözenek çapına, katı destek türüne ve kolon uzunluğuna bağlıdır. Ayrıca numune hacmi, numune hacminin kolon hacmine oranı, partikül boyutu, akış hızı, numunenin ve tampon çözeltinin viskozitesi de ayırma etkilidir (Werner ve ark., 1994; Chaudhary ve ark., 2006). En fazla tercih edilen durum ise uzun bir kolon ve yavaş bir akış hızıdır. Bu teknikte seçilecek tampon çözeltinin ayırma yapılacak proteinlerle biyo-uyumlu olması çok önemlidir. Proteinleri denatüre eden, konformasyon değişikliğine sebep olan ya da alt birimlere ayrılmasını sağlayan tamponların kullanılması tekniğin başarısını olumsuz olarak etkilemektedir.

### 2.4. Afinite Kromatografisi

Dilimizde “ilgi” anlamına gelen afinite kromatografisi kendi içerisinde alt dallara ayrılmıştır (lektin afinite, boronat afinite, immünoafinite vs.). Bu yöntemlerin hepsi protein, enzim, karbonhidrat, vitamin, lipit, antijen, antikor gibi çok sayıda molekülün ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır (Walters, 1985; Ayyar ve ark., 2012; Arora ve ark., 2017).

Afinite kromatografisinin diğer yöntemlere göre en önemli avantajları; yüksek seçiciliğe sahip olması, hızlı ve kullanımının kolay olmasıdır. Hatta optimum koşullar

altında hedef molekül tek bir adımda saflaştırılabilir. Ancak bu teknikte kullanılan materyallerin pahalı olması yüzünden çok büyük ölçekli uygulamaları sınırlıdır.

Afinite kromatografisinde diğer tekniklerde olduğu gibi destek materyali ve ligand bulunmaktadır (Wichterle ve Lim, 1960; Axen ve ark., 1967; Stamberg, 1988; Klein ve ark., 1994; Staak ve ark., 1996; Verdoliva ve ark., 2002; Roberts ve ark., 2009). Ligand hedef molekül ile spesifik ve tersinir bir etkileşime girmektedir (Champagne ve ark., 2007; Liu ve ark., 2013; Prasanna ve ark., 2015). Bu etkileşimler Van Der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, elektrostatik veya hidrofobik temelli olabilmektedir. Hedef molekülün kolondan elüsyonu için yarışmacı bir ligand kullanılır veya ortamın pH, iyonik şiddet ya da polarite gibi özelliklerinin değiştirilmesi gerekir. Yalnız elüsyon için kullanılan tamponun bileşiği denatüre etmemesine ya da spesifik aktivite veya biyolojik fonksiyonunda değişikliğe sebep olmamasına dikkat edilmelidir.

Afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılan ligandlar Çizelge 2.3'de verilmiştir. Çizelge dikkatle incelendiğinde bu ligandların çoğu biyolojik temelli olmakla beraber, sentetik ligandlar da yer almaktadır. Bu ligandlar sahip oldukları spesifikliğin derecesine göre iki gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi sadece tek bir moleküle karşı spesifik olan ligandlardır (monospesifik). Diğeri ise sadece tek bir moleküle değil, benzer özellikte moleküllerden oluşan bir gruba karşı spesifik olan ligandlar (grup spesifik).

Bu kromatografi çeşidinde kolonda kullanılan katı desteğin sert, rijid, kararlı, hidrofilik ve büyük gözenekli olması tercih edilmektedir. Ligandın kolona immobilize edilmesi ayırımın başarılı bir şekilde yapılabilmesi açısından önemlidir. Ligandın immobilize edilmesi için kullanılan teknikler; spesifik olmayan ve biyospesifik özellik gösteren kovalent olmayan bağlanma teknikleri, kovalent bağlanmalar, hapsedme ve moleküler baskılama teknikleridir. Ligandın kolona bağlanması işlemi genel olarak en az iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci aşamada ligandın kolona bağlanabilmesi için jel aktive edilir. İkinci aşamada ise ligand kolona bağlanır (Arora ve ark., 2017).

Afinite kromatografisinde numune karışımı kolona uygulama tamponu adı verilen mobil bir faz aracılığıyla verilir. Burada kolona bağlı ligandın uç noktaları ile numune içerisindeki hedef moleküller arasında bir etkileşim meydana gelir. Diğer istenmeyen türler ise kolondan yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra kolona bağlı hedef moleküller uygun pH, iyonik şiddet ve bileşime sahip bir elüsyon tamponu ile kolondan alınır (Arora ve ark., 2017).

**Çizelge 2.3.** Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar

Ligand türü	Hedef molekül
<b><i>Monospesifik ligandlar</i></b>	
Antikorlar	İlaçlar, hormonlar, peptitler, proteinler, virüsler
Enzim inhibitörleri ve kofaktörler	Enzimler
Nükleik asitler	Tamamlayıcı nükleik asit zincirleri, DNA/RNA'ya bağlı proteinler
<b><i>Grup spesifik ligandlar</i></b>	
Lektinler	Şekerler, polisakkaritler, glikoproteinler, glikolipitler
A proteini ve G proteini	Bozulmamış antikorlar ve F <sub>c</sub> parçaları
Sentetik boyalar	Dehidrogenazlar, kinazlar
Metal şelatlar	Metal bağlayıcı aminoasitler, peptitler, proteinler

## 2.5. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, akışkan (hareketli-mobil) fazda çözülmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı sabit faz yüzeyine tutunmasına dayanan ve bu yüzeyde gerçekleşen bir tutunma olayıdır (Şekil 2.1). Adsorplanan maddeye adsorbat, adsorplayan katı maddeye ise adsorban ya da adsorbent adı verilmektedir.

Katı fazın içinde bulunan iyonlar çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, sıvı fazdaki maddeleri katı

yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin sabit fazın yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşmektedir.

Günümüzde adsorpsiyon; fiziksel, kimyasal ve biyolojik uygulamalarda önem taşımaktadır (Srihari ve Das, 2008; Lin ve Juang, 2009; Cheng ve ark., 2016; Hongxia ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Ayrıca adsorpsiyon işlemi, atık sulardaki organik ve kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzey üzerine adsorbe edilerek giderilmesi işleminde de sıklıkla kullanılmaktadır (Altmann ve ark., 2016; Frascari ve ark., 2016; Mailler ve ark., 2016).

Adsorbat ile adsorban türler arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen üç tür adsorpsiyon işlemi bulunmaktadır.

**Fiziksel Adsorpsiyon:** Adsorban ve adsorbat molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon olayıdır. Burada zayıf van der Waals kuvvetleri etkilidir ve işlem tersinirdir. Adsorpsiyon işlemi sonucunda yoğunlaşma enerjisinden biraz daha fazla ısı açığa çıkmaktadır.

**Kimyasal Adsorpsiyon:** Adsorban ve adsorbat arasındaki işlevsel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorpsiyondur. Adsorpsiyon işlemi tersinmezdir ve tek tabakalıdır. Adsorpsiyon işlemi sırasında açığa çıkan ısı enerjisi reaksiyon ısısından daha büyüktür.

**İyonik Adsorpsiyon:** Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkili olduğu bir adsorpsiyon türüdür. Burada adsorban ve adsorbatın iyonik güçleri önemlidir. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tanecik tercihen öncelikle yüzeye tutunmaktadır.

Adsorpsiyonu etkileyen bazı faktörler şunlardır:

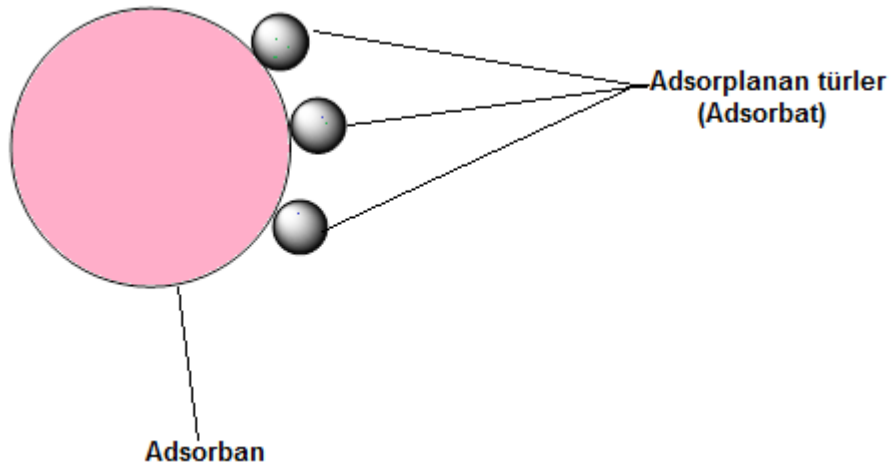
**pH:** Hidronyum ve hidroksil iyonları etkin bir şekilde adsorbe olduklarından, diğer iyonların adsorpsiyonu çözeltideki hidronyum iyonu derişiminden etkilenmektedir. Ayrıca asidik veya bazik türlerin iyonizasyon derecesi de adsorpsiyonu etkilemektedir.

**Sıcaklık:** Adsorpsiyon işlemi genel olarak ısı veren bir tepkime şeklinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile birlikte adsorpsiyon miktarı artmaktadır. Açığa çıkan ısı miktarı genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları derecesinde, kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal tepkime ısıları derecesindedir.

**Yüzey alanı:** Adsorpsiyon işlemi yüzeyde gerçekleştiğinden, adsorpsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorbanın partikül boyutunun küçük, yüzey alanının geniş ve gözenekli yapıda olması adsorpsiyon miktarını arttırmaktadır.

**Adsorbatın Çözünürlüğü:** Bir maddenin adsorpsiyonu genellikle bulunduğu ortamdaki çözünürlüğü ile doğru orantılıdır. Adsorbatın bulunduğu ortamdaki çözünürlüğü ne kadar fazla ise adsorbanla çözelti arasındaki bağ o kadar kuvvetli ve adsorpsiyon miktarı da o kadar fazla olmaktadır. Ayrıca adsorpsiyon işleminde adsorbatın çözünürlüğü adsorpsiyon dengesini kontrol etmektedir.

**Karıştırma Hızı:** Adsorpsiyon hızı ortamın karıştırma hızından etkilenmektedir. Genellikle adsorpsiyon miktarı artan karıştırma hızıyla beraber artış göstermektedir. Çünkü karıştırma hızının artmasıyla adsorban ile adsorbat arasındaki etkileşim artmakta ve daha fazla adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Ancak belli bir karıştırma hızından sonra adsorpsiyonda azalmalar görülebilmektedir. Yani maksimum adsorpsiyon miktarı için limit bir karıştırma hızının belirlenmesi önem arz etmektedir.



**Şekil 2.1.** Adsorpsiyon mekanizmasının şematik gösterimi

## 2.6. Immobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

IMAC, ilk defa 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir tekniktir. Bu teknikte metal iyonları katı desteğe şelatlayıcı bir ligand üzerinden immobilize olmaktadır. Ligandlar bu teknikte kritik bir rol oynamaktadır. İminodiasetik asit (IDA) ve nitrilotriasetik asit (NTA) en fazla kullanılan şelatlayıcı bileşiklerdir (Sun ve ark., 2015). Geçiş metali olarak Zn(II), Cu(II), Co(II), Ni(II) gibi iki değerlikli iyonlar kullanılmaktadır. IMAC tekniğinin performansı şelatlayıcı bileşiğin türü ile doğrudan ilişkilidir (Karakuş ve ark., 2015). Şelatlayıcı bileşik metal iyonuna bağlanmakla beraber metal iyonunun tüm koordinasyon bölgelerini doldurmamalıdır. Aksi halde hedef protein molekülleri metal iyonuna bağlanamamakta ve bu yapı ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılamamaktadır.

IMAC; kolay hazırlanma, yüksek adsorplama kapasitesi ve kararlılık gibi bazı avantajlara sahiptir (Cömert ve Odabaşı, 2014). Immobilize metal afinite kromatografisinde afinite ayırma, metal iyonları ile biyolojik moleküllerde bulunan ulaşılabilir amino asitler (başlıca histidin olmak üzere triptofan, sistein, aspartat, glutamat vs.) arasındaki etkileşim ile meydana gelmektedir (Yip ve Hutchens, 1994).



## 2.7. Kriyojel

Kriyojeller mükemmel yapısal özellikleri ve akış dinamikleri nedeniyle yeni nesil adsorbentler olarak tanımlanmaktadır (Lozinsky ve ark., 2013). Bu polimerler, kısmen dondurulmuş monomer çözeltileri altında serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmektedir (Lozinsky ve ark., 2001).

Kriyojelasyon adı verilen polimerizasyon sırasında, katı faz oluşturan solvent molekülleri, kullanıcıların herhangi bir tıkanma ve difüzyon problemi olmaksızın yüksek debide çalışmasına olanak tanıyan birbirine bağlı akış kanalları oluşturmak için porojen gibi davranmaktadır (Plieva ve ark., 2005).

Buna ek olarak, dondurma işlemi, yüksek oranda çapraz bağlanmış polimerik ağ elde edilmesini sağlayan dondurulmamış organik fazda, dondurma derişimi olarak bilinen monomer konsantrasyonunu arttırmaktadır. Su, kriyojel sentezlenmesi için genellikle çözücü madde olarak kullanılır ve suda çözünen monomerler buz kristallerinin yapısal özelliklerinden dolayı kriyojenik formlara dönüştürülür. Makro gözenekli yapı ve mükemmel akış-dinamikler yanında, kriyojeller iyi mekanik, kimyasal ve fiziksel kararlılık gösterirler ve suda çözünen uygun fonksiyonel monomerler başlangıç materyali olarak kullanıldıklarında değişiklik yapmaya hazır bir konuma gelirler (Doğan ve ark., 2012; Çorman ve ark., 2013; Andaç ve Denizli, 2014).

Bu özelliklerin kombinasyonu ve sinerjisi, kimya, biyoteknoloji, çevre bilimleri ve gıda güvenliği de dahil olmak üzere çeşitli araştırma disiplinlerinde farklı uygulamalar için kriyojelleri umut verici bir materyal haline getirmektedir (Busto ve ark., 2007; Wang ve Min, 2007; Plieva ve ark., 2008; Önnby ve ark., 2010; Henderson ve ark., 2013; Şahiner ve Seven, 2014).

## 2.8. İnsülin

İnsülin karbonhidratların, proteinlerin ve yağların anabolik reaksiyonlarını düzenleyen ve bu sayede kandaki glukoz seviyesini kontrol eden bir proteindir (Ladisich ve

Kohlmann, 1992). İki zincirden meydana gelmiş olup toplam 51 aminoasit içermektedir (Şekil 2.2). Molekül ağırlığı 5800 g/mol'dür (Chien, 1996).

Vücudumuzdaki hücreler insülin olmadan glukozu kullanamazlar. İnsülin diabet hastalarının tedavisinde kullanılan pankreatik bir hormondur. Diabetes önemli bir metabolik hastalıktır. Bu hastalık insülinin salgılanmasında ve sentezinde kusurlara neden olur ve sanayileşmiş ülkelerde en büyük üçüncü ölüm nedenidir (Min ve ark., 2011). Rekombinant insan insülini, sentetik olarak üretilebilir ve insülin eksikliklerine sahip insanlarda kullanılabilir (Fineberg ve ark., 1983).

Hızlı ve yüksek düzeyde insülin üretimi, geniş çapta tamamen şeker hastalığı kullanılmış rekombinant DNA teknolojisi ile sağlanmaktadır. İnsan rekombinant insülini (HRI) büyük bir ölçekte üretilen ilk hormondur. Bu günlerde, üretim hızı, dünyada yılda yaklaşık 25 tondur (Gusarov ve ark., 2007).

İnsülin, keşfinden sonraki yıllarda, hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılmıştır (Leeuw ve ark., 2005). Diyabet hastalığının giderek yaygınlaşması ve ilerleyici niteliğinden dolayı, son on yılda insülin pazarının hacmine göre sağlıklı bir şekilde % 7 oranında büyümüşür. İnsülin reaktifleri biyomedikal pazarların neredeyse yarısını paylaştığından, pazar ölçeği 0,2 milyarı aşmıştır. Son zamanlarda, dünya çapındaki insülin piyasası 2011 yılında % 12,5 artışla yaklaşık 16,7 milyar dolarlık bir bütçeye ulaşmıştır. Sadece Birleşik Devletler'de, 2010'dan 2011'e % 14,9'luk bir artışla 7,2 milyar dolardan 8,3 milyar dolara yükselmiştir (Rotenstein ve ark., 2012).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

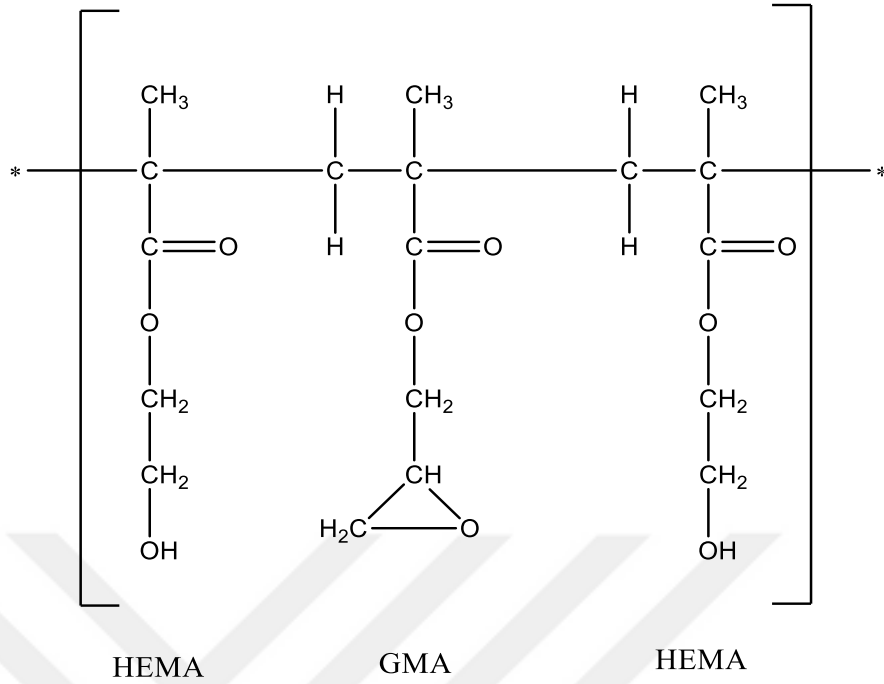
#### 3.1. Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), glisidil metakrilat (GMA), *p*-amino benzoik asit, *p*-amino piridin, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), amonyum persülfat, (APS), sodyum dodesil sülfat (SDS), *N,N,N',N'*-Tetrametiletilediamin (TEMED), insülin,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  Sigma (St. Louis, USA) firmasından tedarik edilmiştir. Diğer tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve tüm çalışmalarda ultra saf su (18 M $\Omega$ .cm) kullanılmıştır.

#### 3.2. Poli(HEMA-GMA) Kriyojellerin Hazırlanması

Monomer fazı GMA (500  $\mu\text{L}$ ), HEMA (5000  $\mu\text{L}$ ) ve distile su (6500  $\mu\text{L}$ ) karıştırılarak hazırlanmıştır. Dağıtma fazı olarak ise 1 g SDS, 25,6 mL distile su ve 2,4 mL EGDMA kullanılmıştır. Daha sonra iki faz birbirine karıştırılmıştır. 10-15 dakika buz banyosunda soğutulmuştur. 30 mg APS ve 150  $\mu\text{L}$  TEMED ilâve edilmiştir. Karışım 24 saat boyunca  $-20^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

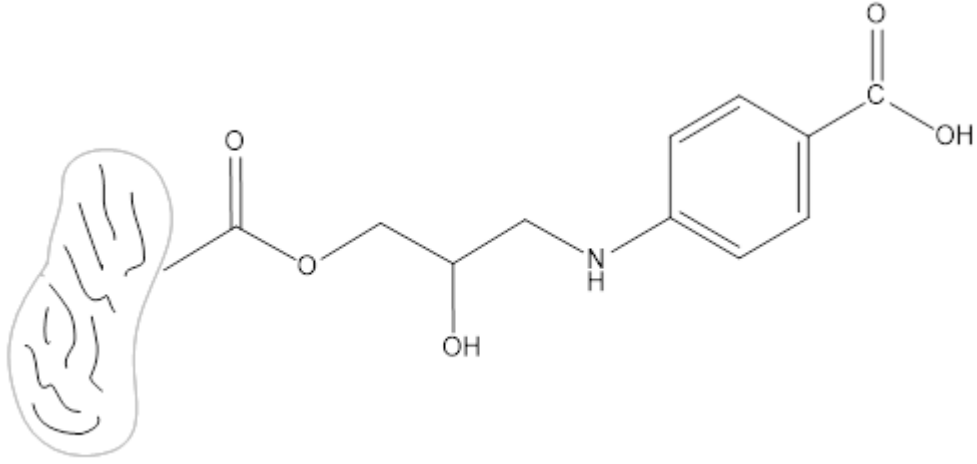
Elde edilen polimerik yapı, membran (disk) şeklinde kesilmiştir. Daha sonra bu diskler ultra saf su ile SDS ve diğer bileşenler uzaklaşana ve yıkama suyu berrak hale gelinceye kadar rotatör karıştırıcıda (Multi Bio RS-24 Biosan, Letonya) 10 rpm hızda çalkalanmış ve yıkama suyu her 15 dakikada bir değiştirilmiştir (Şekil 3.1) (Erol ve ark., 2016). Yıkama sayısının artmasıyla beraber yıkama suyunda meydana gelen köpürme miktarı azalmıştır.



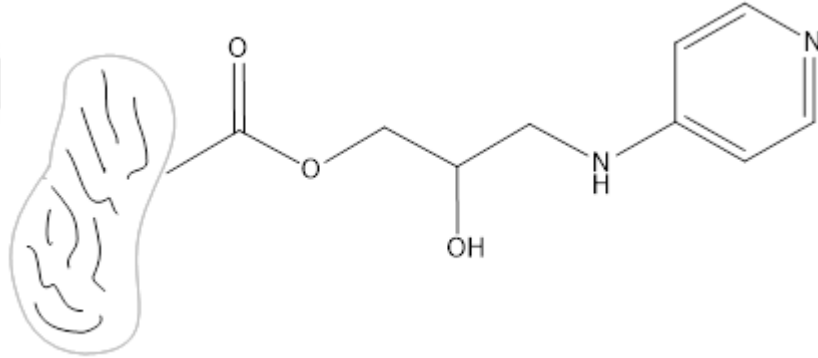
Şekil 3.1. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin yapısı

### 3.3. Kriyojellere *p*-Amino Benzoik Asit ve *p*-Amino Piridin Bağlanması

120 adet kriyojel membran 1M NaOH (50 mL) ile 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Birkaç defa ultra saf su ile yıkanan membranların 60 tanesi 5 mg/mL *p*-amino benzoik asit çözeltisi (20 mL) içine atılmıştır. Kalan 60 adet membran da 5 mg/mL *p*-amino piridin çözeltisi (20 mL) içeren beherin içine atılmıştır. Her iki beherde bulunan membranlar *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridin çözeltileri ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir. Bu işlemdeki amaç, *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridin moleküllerindeki amin gruplarının GMA monomerinin epoksi halkarındaki karbona bağlanmasını sağlamaktır (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Bu işlem sonunda membranlar ultra saf su ile 3 defa yıkanmıştır.



Şekil 3.2. Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino benzoik asit kriyojelin yapısı



Şekil 3.3. Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin kriyojelin yapısı

### 3.4. Kriyojellere Metal Bağlanması

Kriyojeller, *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridin ile etkileşimleri sonrasında  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  bileşiklerinin çözeltileri (5 mg/mL, 10 mL) ile ayrı ayrı etkileşime sokulmuştur. Metal iyonlarının bağlanmasıyla kriyojellerin renklerinde farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Metal bağlanmış *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridinli kriyojeller

### 3.5. Karakterizasyon Çalışmaları

#### 3.5.1. Şişme testi

Kriyojellerin su tutma kapasitesi ultra saf su kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için öncelikle kuru kriyojel numuneleri, dikkatlice tartılmıştır. Daha sonra izotermal su banyosunun içerisindeki ultra saf suyun içerisine konularak 25°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örnekleri, bir süzgeç kâğıdının üzerine alınıp yüzeye tutunan suyun uzaklaştırılması için hızlıca silinmiş, tekrar tartılmış ve su tutma

kapasitesi hesaplanmıştır. Su tutma kapasitesini belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = (W_s - W_o) / W_o \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Bu eşitlikte  $W_o$  ve  $W_s$  sırayla kuru membranın ve su tutmuş membranın ağırlığını (g) ifade etmektedir.

### 3.5.2. Yüzey morfolojisi

Sentezlenen kriyojellerin morfolojik yapılarını incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM; Carl Zeiss AG - EVO® 50 Series, Almanya) kullanılmıştır. Etüv kullanılarak yaklaşık 72 saat boyunca kurutulmuş olan kriyojel numuneleri vakumlandıktan sonra SEM plakalarına yerleştirilmiş ve yüzey görüntüleri alınmıştır.

### 3.5.3. Elemental analiz

Tamamen kurutulmuş numune elemental analiz için özel tartım kaplarında yaklaşık 1-2 mg olarak tartılmış ve daha sonra cihazın numune kısmına yerleştirilmiştir. Analiz başlatılmış ve % N yanma kompartımanının sıcaklığı 1120°C ve indirgenme kompartımanının sıcaklığı 850°C olarak analiz gerçekleştirilmiştir.

Poli(HEMA-GMA) kriyojellerin içerisine katılmış olan *p*-amino piridin ve *p*-amino benzoik asit moleküllerinin miktarının belirlenmesinde elemental analiz cihazı (CHNS-932, Leco, ABD) kullanılmıştır. Hesaplamalar azot miktarına göre yapılmıştır.

### 3.5.4. FTIR çalışmaları

Elde edilen kriyojellerin üzerindeki fonksiyonel grupları belirlemek için Fourier Transform Infrared spektroskopisi (Thermo Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer, ABD) cihazından yararlanılmıştır. Kriyojeller, kuru toz KBr (0,1 g, IR Grade, Merck,



Almanya) ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirilmiş ve FTIR analizi yapılmıştır

### **3.5.5. Yüzey alanı analizi**

Kriyojellerin spesifik yüzey alanı, Brunauer-Emmett-Teller (BET; Quantachrome Autosorb® iQ-Chemi, ABD) cihazı ile belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan kriyojel numuneleri gözeneklerdeki oksijen ve nemi gidermek için, 35°C’de 100 mbar vakum altında 6 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra kriyojel örneklerine oda sıcaklığında azot gazı ile muamele edilmiştir.

### **3.5.6. Termal analiz**

Kriyojellerin termal bozunma basamaklarını saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı (Shimadzu DTG-60H, Japonya) kullanılmıştır. Termogravimetrik analiz işlemi, 100 cm<sup>3</sup>/dakika hava akış hızı ve 10°C/dakika ısıtma hızıyla 0°C’den 900°C’ye ısıtılarak gerçekleştirilmiş ve kütle kayıpları incelenmiştir.

### **3.5.7. Bilgisayarlı mikrotomografi ( $\mu$ CT) analizi**

Kriyojellerin içerdiği gözenekleri, bu gözeneklerin dağılımını ve akış kanallarını üç boyutlu görüntülemek amacıyla Bilgisayarlı Mikrotomografi ( $\mu$ CT) (Bruker, Skyscan 1272, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Bunun için numunelere 360° açıyla 0,4° aralıklarla X-ışınları gönderilmiştir. Görüntü kalitesini arttırmak için 0,5 mm’lik alüminyum filtre kullanılmıştır. X-ışınlarının gücü 50 kV olup her 500 ms’de bir piksel başına 10  $\mu$ m çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilmiştir.

### **3.5.8. SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizi**

SDS-PAGE jel elektroforezi BIO-RAD marka “Mini-Protean 3 Cell” ile gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE tampon sistemi takip edilmiş olup çözücü jel %12’lik, toplayıcı jeli ise %5’lik olacak şekilde dökülmüştür. Toplayıcı jeli numune (10  $\mu$ L),

Laemmlı 2x buffer (Sigma-S3401) 'dan 10 µL eklenerek kuyulara yüklenmiş, 60 Volt ve 400 amper'de çözücü jele gelene kadar koşturulmuştur. Çözücü jele örneklerin gelmesinden sonra voltaj 80'e çıkartılmış ve yaklaşık 2 saatlik koşmanın ardından jel görüntülemesi için boyamaya geçilmiştir. Marker için 5 µL Colorburst elektroforesis marker (8000- 22000 Da) (Sigma-C1992) kullanılmıştır. Boyama için EZBlue gel staining reagent (Sigma-G1041) 45 dak. kullanılmış ve 45 dakikadan sonra gece boyunca boya uzaklaştırma gerçekleştirilerek görüntü (Li-Cor odyssey CLx'de) alınmıştır.

### **3.6. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları**

#### **3.6.1. Sulu çözeltilerden insülin adsorpsiyonu**

Kriyojellerin insülin molekülünü adsorplama performansları sulu çözelti içerisinde (10 mL) kesikli sistemde çalışılmıştır. Optimum pH, süre, insülin başlangıç derişimi, karıştırma hızı, sıcaklık ve tuz derişimi belirlenmiştir. İnsülinin kriyojellere adsorpsiyonu pH: 3-10 arasında incelenmiştir. Yine aynı şekilde optimum sürenin belirlenmesi için adsorpsiyon işlemi 5-90 dakika arasında değişen sürelerde incelenmiş ve adsorpsiyonun maksimum olduğu süre optimum süre olarak belirlenmiştir. Başlangıç derişimi 1000-10000 mg/L arasında değişen insülin çözeltileri kriyojellerin adsorpsiyon performansının hangi derişimde en fazla olduğunu belirlemede kullanılmıştır. İnsülinin adsorpsiyonu 4-45°C arasında değişen sıcaklıklarda incelenmiş ve adsorpsiyonun en yüksek olduğu sıcaklık denge sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon işlemi iyonik şiddetin yüksek olduğu NaCl ortamında yapılmış ve optimum koşullar altında değişen iyonik şiddet değerlerinde adsorpsiyon incelenmiş ve iyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi belirlenmiştir. Adsorpsiyon öncesi ve sonrasındaki insülin miktarı Morötesi-Görünür Bölge (UV-VIS) spektrofotometresi (TU-1810 UV-VIS Spectrophotometer, Pgeneral, Çin) ile 280 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. İnsülin adsorplama kapasitesi aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$q = [(C_0 - C) \times V] / m \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

burada,  $q$  birim kriyojel kütlesine adsorplanan insülin miktarı (mg/g);  $C_0$  ve  $C$  sırasıyla, insülinin başlangıç ve muamele sonrası derişimleri (mg/L);  $V$  çözelti hacmi (L) ve  $m$  kullanılan kriyojelin kütlesidir (g). Sonuçların güvenilirliği ve istatistiksel değerlendirme açısından deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

### 3.6.2. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

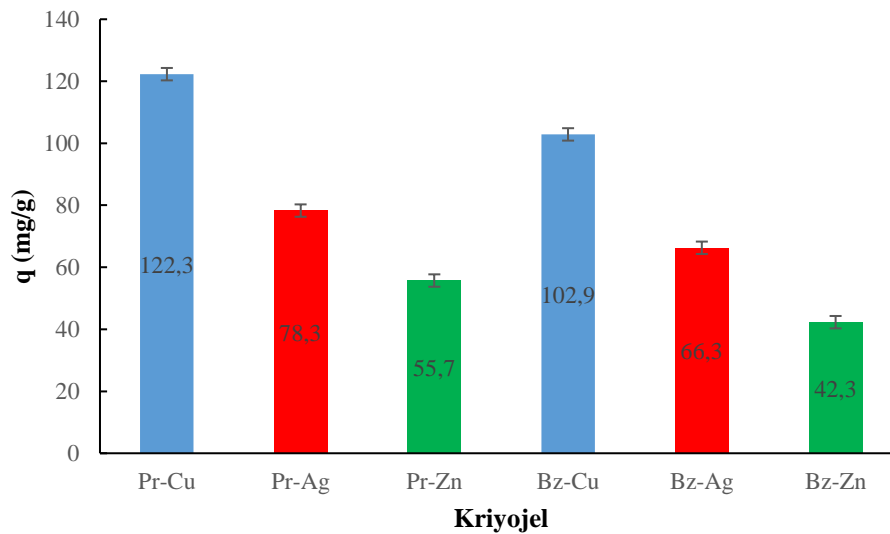
Kriyojellere adsorplanmış olan insülinin desorpsiyonu ve elde edilmesi de yine kesikli sistemde çalışılmıştır. İnsülin adsorplanmış olan kriyojellere 10 mL 1 M NaCl çözeltisi içerisinde 150 rpm'de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirlik kapasitesi için aynı kriyojel ile 5 döngü gerçekleştirilmiştir. İnsülin desorpsiyon oranı aşağıdaki formüle göre bulunmuştur.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorplanan insülin miktarı}}{\text{Toplam insülin miktarı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kriyojellerin İnsülin Adsorpsiyon Performanslarının Karşılaştırılması

İnsülin molekülünün adsorpsiyonu için *p*-amino benzoik asit ligandı içeren kriyojeller Cu(II) bağlı için Bz-Cu(II), Ag(I) bağlı için Bz-Ag(I) ve Zn(II) bağlı için Bz-Zn(II) olarak kodlanmıştır. Yine aynı şekilde *p*-amino piridin bağlı kriyojeller Cu(II) bağlı için Pr-Cu(II), Ag(I) bağlı için Pr-Ag(I) ve Zn(II) bağlı için de Pr-Zn(II) olarak kodlanmıştır. Bu kriyojeller ile insülin molekülünün adsorpsiyon çalışması 1,0 mg/mL insülin derişiminde, 15 rpm karıştırma hızında, 60 dak. etkileşim süresi ile oda sıcaklığında yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda en fazla insülin adsorpsiyonu Pr-Cu(II) kodlu kriyojel için tespit edilmiştir. Yapılan elementel analiz ve ICP-OES sonuçları incelediğinde insülin adsorpsiyonunun Pr-Cu(II) kodlu kriyojelde en fazla olması beklenen bir sonuçtur (Çizelge 4.1). Çünkü ligand olarak kullanılan moleküllerden *p*-amino piridin, *p*-amino benzoik asit molekülüne göre yapıya daha fazla girmiş ve aynı zamanda *p*-amino piridin ligandına üç metal iyonu arasında en çok Cu(II) bağlanmıştır. Bu sebeple Pr-Cu(II) kodlu kriyojel bu çalışma için en ideal polimer olarak tespit edilmiş ve çalışmanın kalan kısımlarında bu polimer üzerinden deneysel uygulamalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Kriyojellerin insülin adsorpsiyon performansları

**Çizelge 4.1.** Kriyojellerin elementel analiz ve ICP-OES sonuçları

Ligand olarak bağlanan molekül					
<i>p</i> -amino benzoik asit			<i>p</i> -amino piridin		
Elementel Analiz (% N)			Elementel Analiz (% N)		
3,70			0,60		
ICP-OES			ICP-OES		
Cu(II) ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ag(I) ( $\mu\text{mol/g}$ )	Zn(II) ( $\mu\text{mol/g}$ )	Cu(II) ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ag(I) ( $\mu\text{mol/g}$ )	Zn(II) ( $\mu\text{mol/g}$ )
216,6	189,2	158,5	238,1	202,4	170,2

## 4.2. Kriyojellerin Karakterizasyonu

### 4.2.1. Şişme testi

Poli(HEMA-GMA) kriyojeller çapraz bağlı olduğundan dolayı sulu ortamlarda çözünmezler fakat çapraz bağ örgüsüne ve suyu sevme özelliğine bağlı olarak su tutarak şişerler. Bu çalışmada kullanılan Pr-Cu(II) kodlu Poli(HEMA-GMA) kriyojelin dengedeki şişme kapasitesi yaklaşık % 422 olarak tespit edilmiştir. Yani 1 g kuru kriyojel 4,22 g su tutma kapasitesine sahiptir. Su çapraz bağlarla bağlanmış yapının içine nüfuz ederek içeride kalmaktadır.

### 4.2.2. Yüzey morfolojisi

Pr-Cu(II) kodlu kriyojellere ait yüzey yapısı ve kaviteler Şekil 4.2’de net bir şekilde görülmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere kriyojeller makro-gözeneklere ve pürüzlü bir yüzeye sahiptir. Kriyojellerin özellikleri incelendiğinde çapraz bağlayıcı (EGDMA) sayesinde elde edilen büyük gözenekler dikkat çekmektedir.

### 4.2.3. Elemental analiz

Bu çalışma kapsamında hazırlanan Poli(HEMA-GMA) kriyojellere bağlanan *p*-amino benzoik asit ve *p*-amino piridin miktarı, HEMA ve GMA'nın yapısında azot olmadığından, azot stokiyometrisi kullanılarak *p*-amino benzoik asit için 43,75 µmol/g kriyojel ve *p*-amino piridin için 393,14 µmol/g kriyojel olarak hesaplanmıştır.

### 4.2.4. FTIR çalışmaları

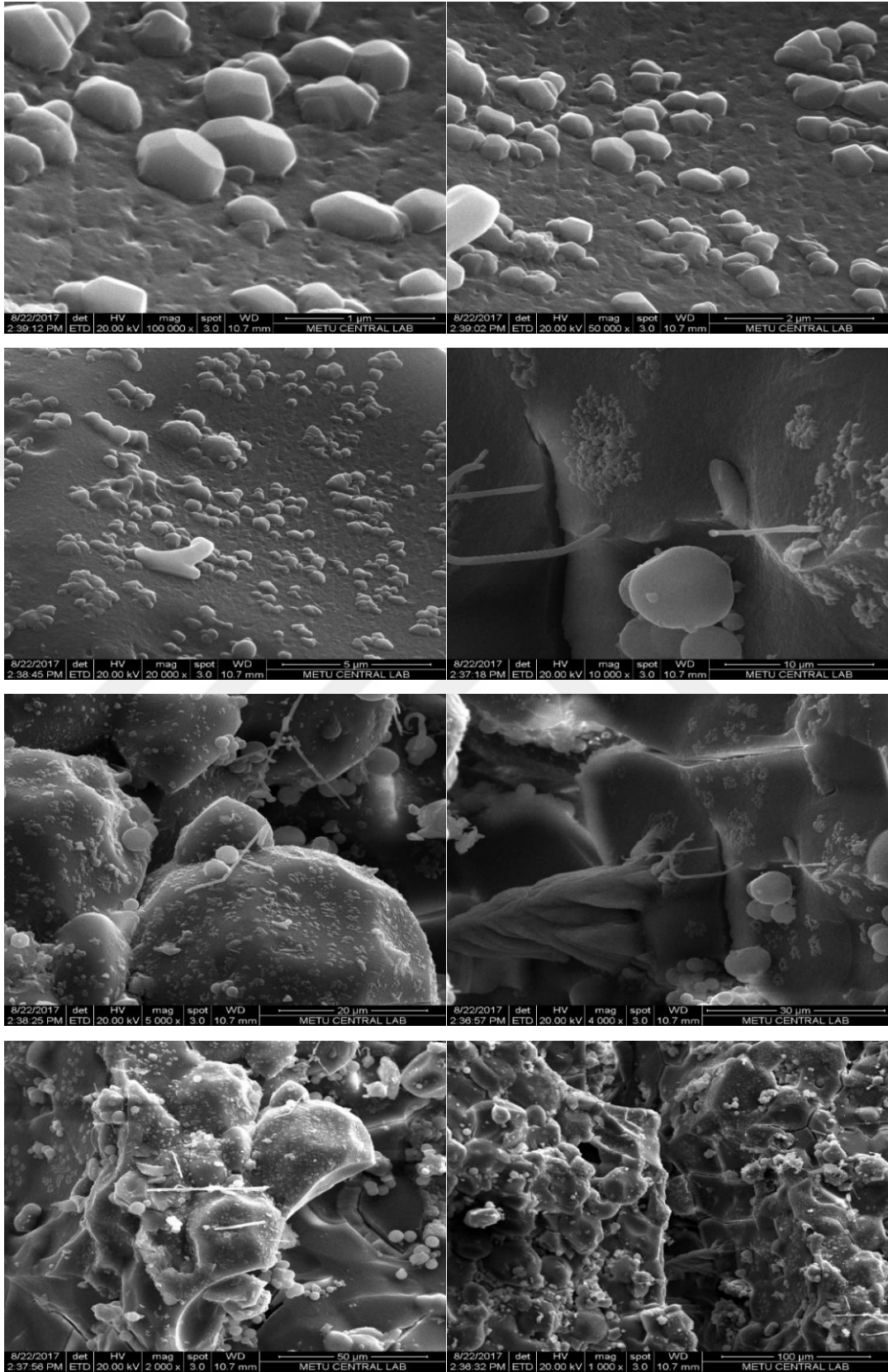
Şekil 4.3'de Poli(HEMA-GMA), Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin ve Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino benzoik asit kriyojellere ait FT-IR spektrumları verilmektedir. Bu spektrumlar incelendiğinde; her üç spektrumda da karbonil (C=O) gerilmesi (1728, 1731 ve 1727 cm<sup>-1</sup>) ve alkanlardaki C-H gerilmesi (2953, 2943 ve 2952 cm<sup>-1</sup>) pikleri dikkat çekmektedir. Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin kriyojelin spektrumunda yer alan aromatik -C=C- gerilmesi pikleri (1565 ve 1514 cm<sup>-1</sup>) ve sekonder aminlerdeki N-H eğilmesi piki (880 cm<sup>-1</sup>) *p*-amino piridin molekülünün Poli(HEMA-GMA)'nın yapısına ligand olarak başarılı bir şekilde katıldığına bir kanıttır. Bununla birlikte aromatik -C=C- gerilmesi (1606 cm<sup>-1</sup>) ve sekonder amin N-H eğilmesi (880 cm<sup>-1</sup>) pikleri Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino-benzoik asit kriyojelinin spektrumunda da yer almaktadır. Yapıda yer alan O-H gerilme pikleri sırasıyla 3436 cm<sup>-1</sup>, 3447 cm<sup>-1</sup>, 3422 cm<sup>-1</sup> tepe noktaları olmak üzere yayvan bir pik şeklinde gözlenirken aynı bölgede yer alan N-H gerilme pikleri ise O-H gerilme piklerinin altında kalmasından dolayı beklenildiği üzere tespit edilememiştir. Şekil 4.4 incelendiğinde ise Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin kriyojeline Cu(II) iyonlarının bağlanması sonucu spektrumda 473 cm<sup>-1</sup>'de meydana gelen pik dikkat çekmektedir (Dudley ve ark., 1974).

### 4.2.5. Yüzey alanı analizi

Poli(HEMA-GMA) ve Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) kriyojellerin yüzey alanı sırasıyla 6,55 m<sup>2</sup>/g ve 9,18 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Bu yüzey alanı mikro ya da nanopartiküller ile karşılaştırıldığında düşük olmasına rağmen yapı içerisindeki gözenekler ve çukurlar adsorpsiyonun etkili olması konusunda önemli avantajlar

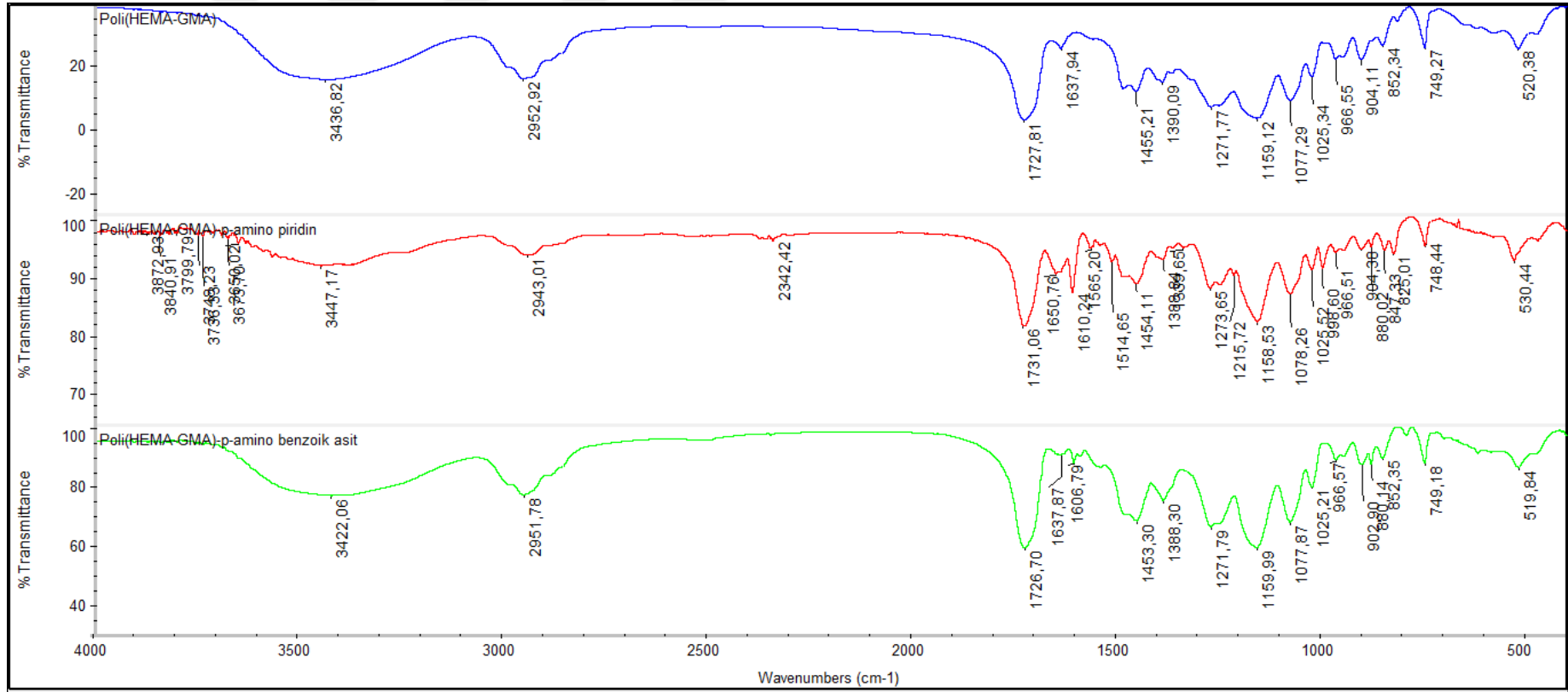
sağlamıştır. Ayrıca Poli(HEMA-GMA) kriyojelin ortalama gözenek çapı yaklaşık 350 Å, Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) kriyojelin ise yaklaşık 60 Å olarak tespit edilmiştir. Bu durum *p*-amino piridin molekülünün ve Cu(II) iyonlarının Poli(HEMA-GMA) kriyojeli içerisinde bulunan moleküler seviyedeki boşlukları doldurmasıyla açıklanabilir.



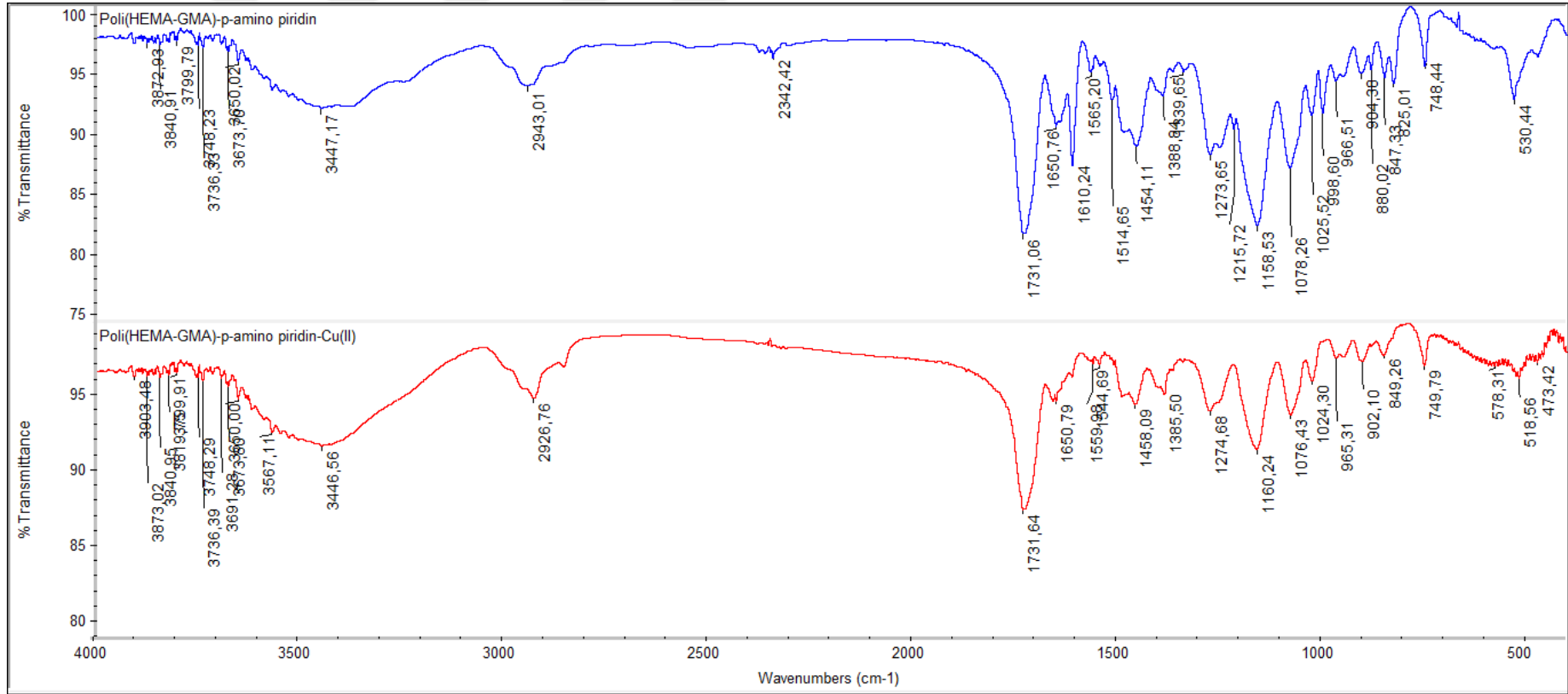


Şekil 4.2. Pr-Cu(II) kriyojellerin SEM görüntüleri





Şekil 4.3. Poli(HEMA-GMA), Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin ve Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino benzoik asit kriyojellerin FT-IR spektrumları



Şekil 4.4. Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin ve Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) kriyojellerin FT-IR spektrumları

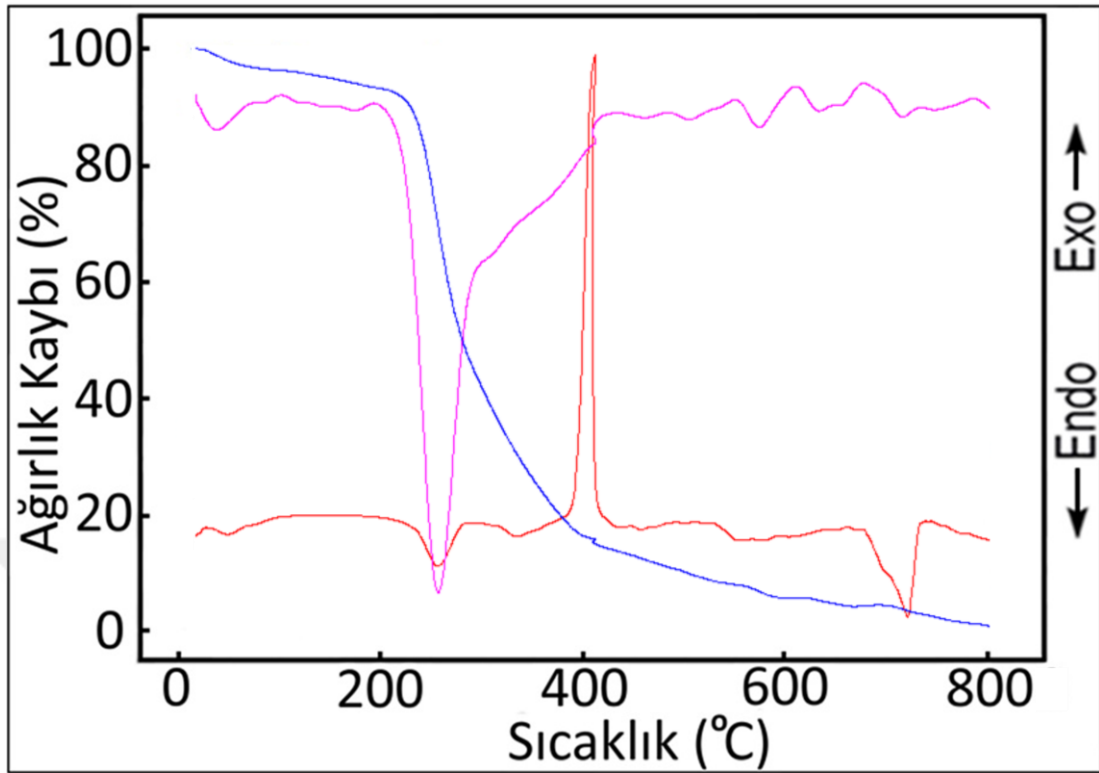
#### 4.2.6. Termal analiz çalışmaları

Dinamik inert azot atmosferinde kaydedilen TG, DTA ve DrTG eğrileri Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Referans olarak alümina tozunun ( $Al_2O_3$ ) kullanıldığı analiz 0-800 °C aralığında gerçekleştirilmiştir. Termogravimetrik analiz (TGA) eğrisi termal bozunma sonucu örnekte gerçekleşen kütle kayıplarının yüzde (%) miktarını, termogravimetrik analizin türevi (drTGA) eğrisi maksimum kütle kayıplarının olduğu sıcaklıkları ve diferansiyel termal analiz (DTA) eğrisi ise tepkimelerin ısı alan (endotermik) ve ısı veren (ekzotermik) özelliklerinin incelenmesi konusunda veriler sağlamaktadır. Termal bozunma eğrisi incelendiğinde malzemenin yapısında bulunduğu düşünülen ve kurutma esnasında tam olarak yapıdan uzaklaştırılmayan nemden kaynaklı yaklaşık 0,8 mol hidrate suyunun 0,5 molü 35-95°C sıcaklık aralığında, 46°C maksimum DTA sıcaklık bölgesinde (deneysel: % 3,57; teorik: % 3,74) ve geriye kalan 0,3 mol hidrat suyunun ise 98-168°C sıcaklık aralığında, 142°C maksimum DTA sıcaklık bölgesinde (deneysel: % 2,11; teorik: % 2,24) yapıdan uzaklaştığı düşünülmektedir. Ağırlık kayıplarına ilişkin deneysel ve teorik değerlerin uyum içinde olması iddiamızı desteklemektedir.

169-238°C termal bozunma aralığında termal olarak dehidrate olmuş polimerik yapının temelini oluşturan ve GMA yapısında bulunan oksiran halkasının açılarak aromatik halkanın aminine ( $NH_2$ ) bağlanmasıyla oluşan molekülün hidroksil grubuna ait olan bozunma olup, 222°C’de endotermik bir pik vermektedir. Teorik ve deneysel olarak elde edilen kütle kayıpları –OH grubunun parçalanmasını (deneysel; % 6,75; teorik; % 7,07) göstermektedir.

Devam ettirilen termal bozunma neticesinde polimerik yapıyı oluşturan ikincil molekül olan *p*-amino piridin yapısının bozunmasına ait edilebilecek basamak olup, parçalanma sıcaklık aralığı 239-282°C bölgesine denk gelmektedir. Endotermik olarak 265°C’de maksimum DTA piki veren bozunma basamağının deneysel ve teorik kütle kayıpları *p*-amino piridin bozunmasını desteklemektedir (deneysel; % 37,97; teorik; % 38,69).

Son bozunma basamağında halka açılması sonucu katılma reaksiyonu ile iki farklı molekülden oluşan yapının termal bozunması gözlenmektedir. Önceki basamaklarda –OH grubu uzaklaşan polimerik organik yapı 285-792°C sıcaklık aralığında yanarak bozunmaktadır. Bu yanma ile gerçekleşen bozunmanın en çok gerçekleştiği temel basamak 349°C'deki DTA piki bölgesine karşılık gelmektedir. Sonraki bozunma basamakları 429°C, 478°C, 604°C ve 755°C bölgelerinde gerçekleşmektedir. 429°C'deki DTA bozunma piki ekzotermik olup diğerleri endotermik termal bozunmalara karşılık gelirken, ekzotermik bozunmada gerçekleşen yüksek derecedeki enerji açığa çıkmasına sebep olan basamak, yanma sonucu ortamda biriken karbonmonoksit (CO) gazının yanarak karbondioksite (CO<sub>2</sub>) yükselttiği basamaktır. Son organik kalıntının yanarak ortamdan CO/CO<sub>2</sub>/NO/NO<sub>2</sub> gazları şeklinde uzaklaşmasına atfedilebilecek bozunma basamağının deneysel ve teorik ağırlık kayıpları da iddiamızı desteklemektedir (deneysel: % 46,72; teorik % 47,54). Parçalanma yüzdelerinin uyum içerisinde olması, önerilen son bozunma basamağının da doğruluğunu desteklemektedir. Yanma reaksiyonundan geriye kalan deneysel % 2,88 oranında kalıntı hem polimerik yapıdaki Cu varlığına hem de termal bozunma reaksiyonu sonucu organik ürünün tamamen yandığı ancak reaksiyon ortamının inert azot atmosferi olması sebebiyle bir miktarının yanamayıp karbonize kömür şeklinde reaksiyon kabında kalmasına yorumlanabilir. Termal bozunma basamaklarının ayrıntıları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) polimerinin termal analiz grafiği

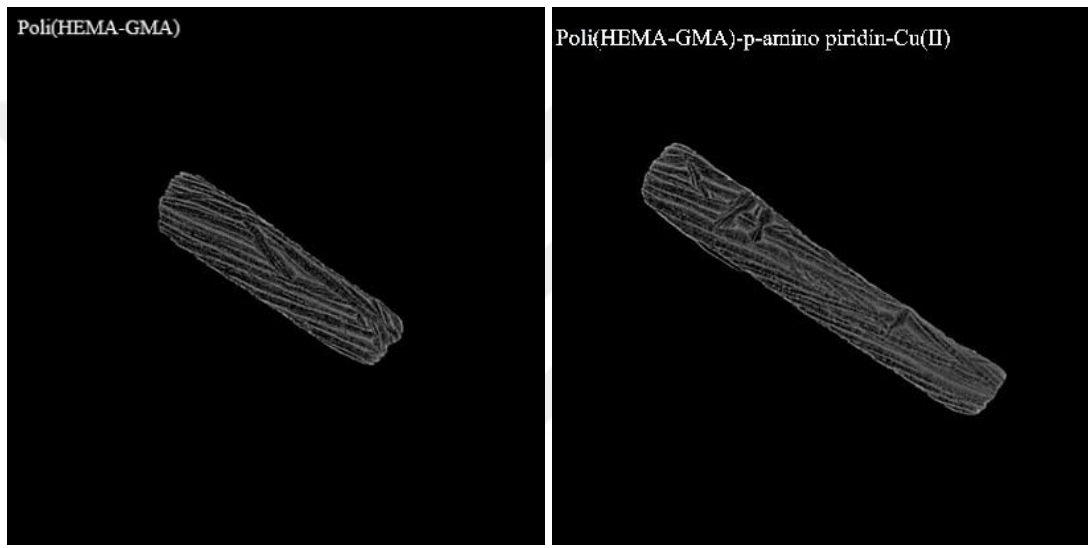
Çizelge 4.2. Termal bozunma basamakları

Kompleks	Sıcaklık Aralığı (°C)	DTA <sub>max</sub> (°C)	Uzaklaşan Grup	Ağırlık Kaybı (%)		Renk
				Deney.	Teorik	
CuC <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O <sub>0.8</sub> 304,18 g/mol	1	35-95	46	(H <sub>2</sub> O) <sub>0.5</sub>	3,57	3,74
	2	98-168	142	(H <sub>2</sub> O) <sub>0.3</sub>	2,11	2,24
	3	169-238	222	-OH	6,75	7,07
	4	239-282	265	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	37,97	38,69
	5	285-792	349, 429, 478, 604, 755	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	46,72	47,54

Pembe

#### 4.2.7. Bilgisayarlı mikrotomografi analizi ( $\mu$ CT)

Bilgisayarlı mikrotomografi analizi yapılan kriyollerin üç boyutlu görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekiller incelendiğinde kriyojellerin gözenekli yapıları ve sahip oldukları akış kanalları açıkça fark edilmektedir. Poli(HEMA-GMA) kriyojelinin yapısına *p*-amino piridin moleküllerinin ve Cu(II) iyonlarının girmesiyle kriyojel içindeki gözeneklerin ve akış kanallarının dolduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Poli(HEMA-GMA) ve Pr-Cu(II) kriyojellerin Mikro-CT görüntüleri

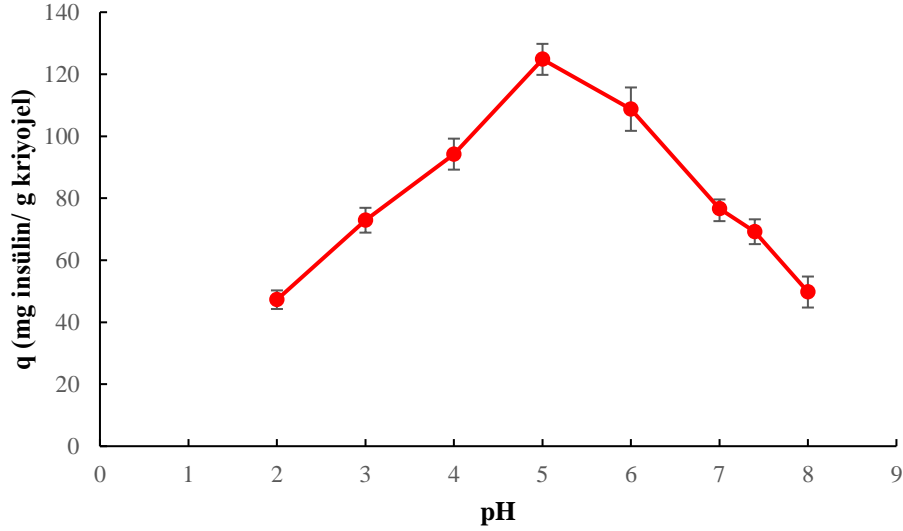
### 4.3. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

Pr-Cu(II) kriyojellere insülin adsorpsiyonu için kesikli sistemde çalışılmıştır. Optimum adsorpsiyon koşulları değişen pH, etkileşim süresi, insülin başlangıç derişimi, sıcaklık ve tuz etkisi parametrelerinde belirlenmiştir.

#### 4.3.1. pH etkisi

Pr-Cu(II) kriyojellere insülin adsorpsiyonunun pH değeriyle değişimi Şekil 4.7'de verilmektedir. Pr-Cu(II) kriyojeller üzerine maksimum insülin adsorpsiyonu pH:5,0 değerinde elde edilmiştir (Şekil 4.8). Kriyojellerin insüline gösterdiği afinite daha yüksek ve daha düşük pH değerlerinde önemli derecede düşüktür. İnsan insülin

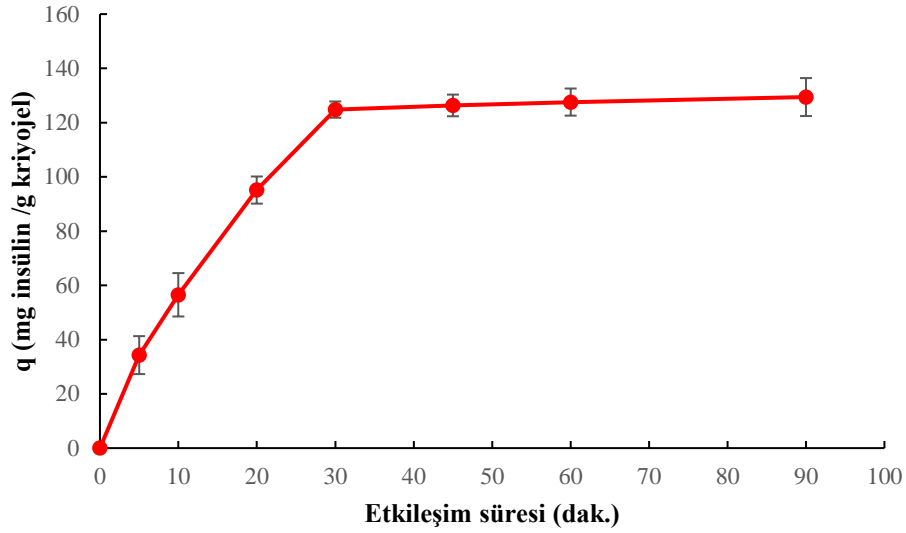
proteininin izoelektrik noktası yaklaşık pH: 5,3 civarındadır (Anonim, 2018). En yüksek adsorpsiyonun pH:5,0 noktasında elde edilmesi kriyojele bağlı Cu(II) gruplarının ve insülin proteininin iyonlaşabilir gruplarının bu pH değerinde optimum düzeyde bir etkileşim kurmasından kaynaklı olabilir.



**Şekil. 4.7.** İnsülin adsorpsiyonuna pH etkisi. İnsülin derişimi: 1000 mg/L; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 25°C

#### 4.3.2. Etkileşim süresinin etkisi

Şekil 4.8 incelendiğinde Pr-Cu(II) kriyojellere insülin adsorpsiyonu ilk 30 dakikada en yüksek seviyeye ulaşmış ve bu süreden sonra adsorpsiyon miktarında ciddi bir değişim gözlenmemiştir. Bunun sebebi ilk 30 dakikada insülin molekülleri oldukça hızlı bir şekilde Pr-Cu(II) kriyojellerin aktif bölgelerine tutunmuş ve tüm bölgeler tutabileceği kadar insülin tutarak dolmuştur. Etkileşimin bu kadar hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, kriyojellerin aktif bölgelerinde bulunan Cu(II) grupları ve insülin molekülleri arasında hem geometrik hem de elektrostatik etkileşim açısından iyi bir uyum olduğunun göstergesidir. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde edilen etkileşim hızı Pr-Cu(II) kriyojellerin adsorpsiyon performansı hakkında oldukça umut vericidir.

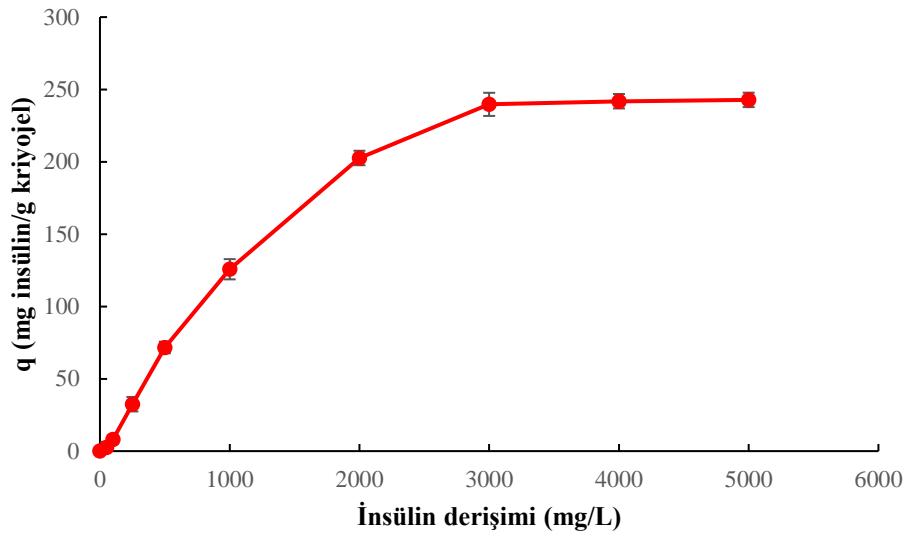


**Şekil. 4.8.** İnsülin adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi. İnsülin derişimi: 1000 mg/L; pH: 5,0; sıcaklık 25°C

#### 4.3.3. İnsülin derişiminin etkisi

İnsülin molekülünün Pr-Cu(II) kriyojellere adsorpsiyonuna etki eden diğer bir faktör de adsorpsiyonda kullanılan insülin çözeltisinin derişimidir. 50-5000 mg/L arasında değişen insülin derişimine sahip çözeltiler Pr-Cu(II) kriyojeller ile etkileşime sokulmuştur. Şekil 4.9’da gösterildiği gibi adsorpsiyon 3000 mg/L insülin derişimine kadar artmış ve sonrasında yaklaşık olarak sabit bir değere ulaşmıştır. Bu da Pr-Cu(II) kriyojellerin etkileşime giren bölgelerinin insülin ile tamamen doyduğunu ve insülin bağlayacak boş bölgenin kalmadığını göstermektedir.

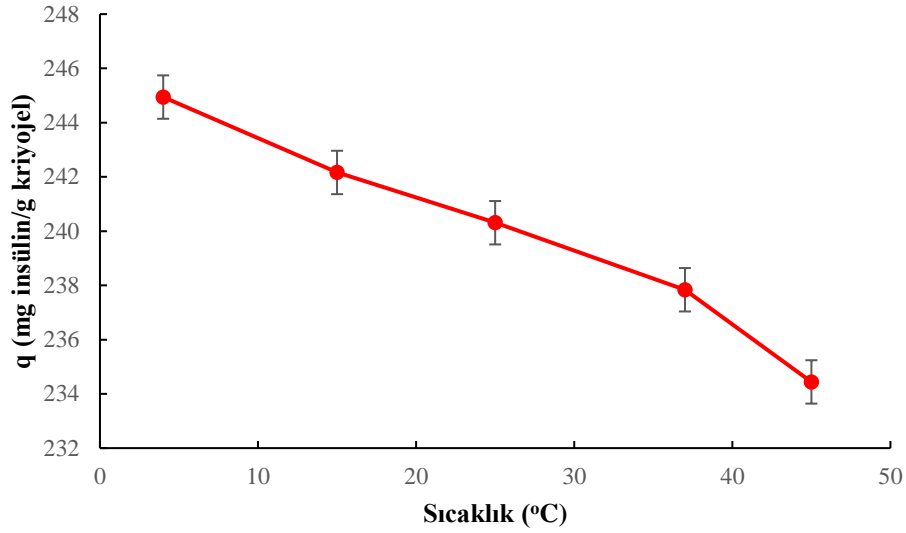




**Şekil. 4.9.** İnsülin adsorpsiyonuna insülin derişiminin etkisi. Etkileşim süresi: 30 dak.; pH: 5,0; sıcaklık 25°C

#### 4.3.4. Sıcaklığın etkisi

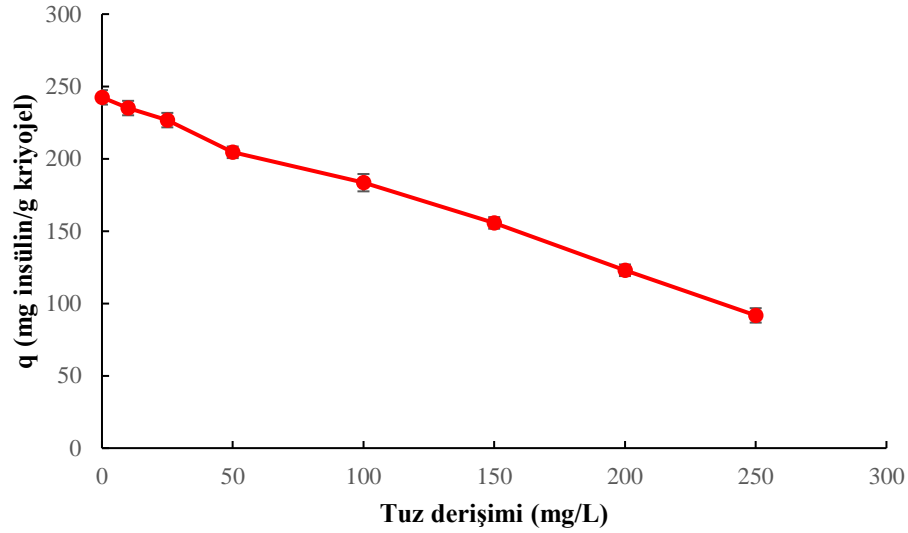
Pr-Cu(II) kriyojellere insülin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini ve optimum adsorpsiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla 4, 18, 25, 37 ve 45°C sıcaklıklarda adsorpsiyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve en yüksek adsorpsiyon değerinin elde edildiği sıcaklık 4°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). Şekilden de görüldüğü gibi kriyojellere insülin adsorpsiyonu artan sıcaklıkla ters orantılı olarak azalmaktadır. Adsorpsiyonun sıcaklıkla azalmasına neden olarak, adsorpsiyon işleminin ekzotermik bir işlem olması ve düşük sıcaklığa sahip ortamlarda ısıl seyreltilik etkisi gösterilebilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda moleküller nispeten daha fazla enerjiye ve buna bağlı olarak daha fazla hareketliliğe sahip olacağından elektrostatik etkileşimin oluşması için gerekli olan moleküller arasındaki mesafe de artacaktır. Bu da etkileşimin oluşması için bir engel teşkil etmektedir. Spesifik adsorpsiyon sürecini kontrol eden termodinamik faktör, bağlanma ile ilgili toplam serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ), hem entalpi ( $\Delta H$ ) hem de entropi ( $\Delta S$ ) değişimlerini içerdiğinden adsorpsiyon işlemi muhtemelen kompleks bir şekilde sıcaklığa bağımlıdır (Leatherbarrow ve Dean, 1980; Arnold ve Blanch, 1986).



**Şekil. 4.10.** İnsülin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. İnsülin derişimi: 3000 mg/L; pH: 5,0; etkileşim süresi: 30 dak.

#### 4.3.5. İyonik şiddetin etkisi

İnsülin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla derişimi 10-200 mg/L arasında değişen NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi Pr-Cu(II) kriyojeller üzerine insülin adsorpsiyonu artan tuz derişimiyle azalmaktadır. Bunun nedeni polimer üzerindeki Cu(II) gruplarının ve insülin molekülü üzerindeki polar grupların  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları tarafından maskelenmesi ve dolayısıyla adsorban-adsorbat arasındaki muhtemel elektrostatik etkileşimlerin azalması olabilir. Ayrıca yüksek tuz derişimlerinde, yüksek iyonik şiddete bağlı olarak meydana gelen tuz köprülerindeki bozulma adsorpsiyonun azalmasına sebep olmaktadır (Kassab ve ark., 2000).

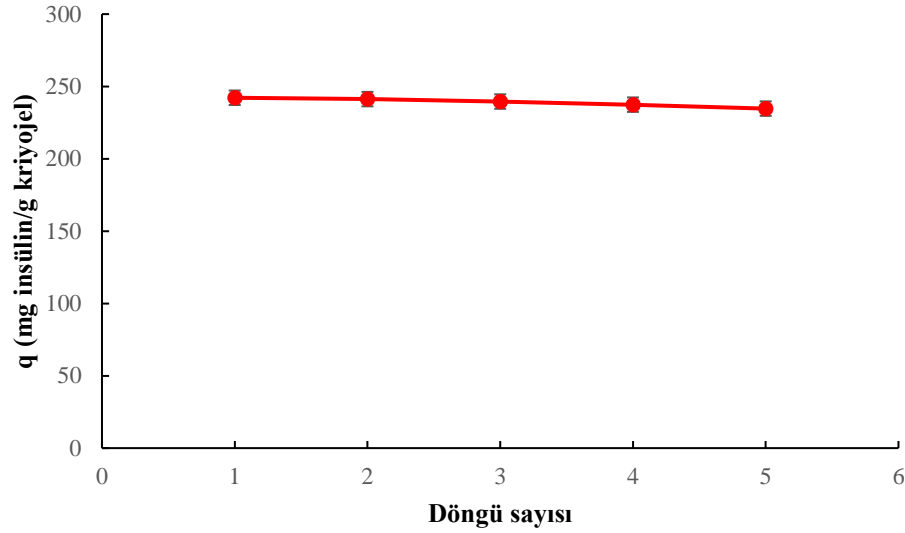


**Şekil 4.11.** İnsülin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. İnsülin derişimi: 3000 mg/L; pH: 5,0; etkileşim süresi: 30 dak.; sıcaklık 4°C

#### 4.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Pr-Cu(II) kriyojellerden insülin molekülünün desorpsiyonu için yine kesikli sistem ile çalışılmıştır. Bu çalışma için 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. 60 dak. süre ile yapılan desorpsiyon işlemi sonucunda tuz moleküllerinin meydana getirdiği iyonik şiddet nedeniyle polimer ve hedef molekül arasında elektrostatik etkileşimle meydana gelen bağlar kırılmaktadır.

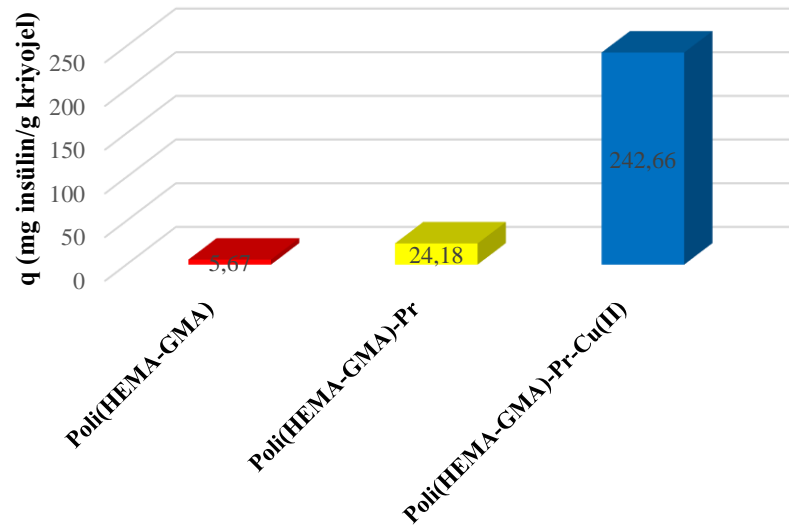
Adsorpsiyon işleminde kullanılmış aynı Pr-Cu(II) kriyojel ile adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmış ve 5 döngü sonucunda kriyojelin insülin adsorplama performanslarında önemli bir azalma görülmemiştir (Şekil 4.12). İlk döngü sonunda 242,18 mg/g olan adsorplama kapasitesi 5. döngü sonunda 234,68 mg/g değerine düşmüş ve sadece yaklaşık % 3,1 oranında azalmıştır. Kriyojellerin rejenarasyonu için membran iki döngü arasında 2 mM NaOH içerisinde 30 dakika bekletilmiş ardından önce distile su ve sonrasında adsorpsiyonun gerçekleştiği pH:5,0 tampon çözeltisi (100 mM CH<sub>3</sub>COONa-CH<sub>3</sub>COOH) ile yıkanarak yeniden kullanıma hazır hale getirilmiştir. 5 döngü sonucunda geri kazanım sağlanan insülin miktarı ortalama % 93,52'dir.



**Şekil 4.12.** Pr-Cu(II) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği

#### 4.5. Ligandsız ve Metalsiz Polimer İle Karşılaştırma

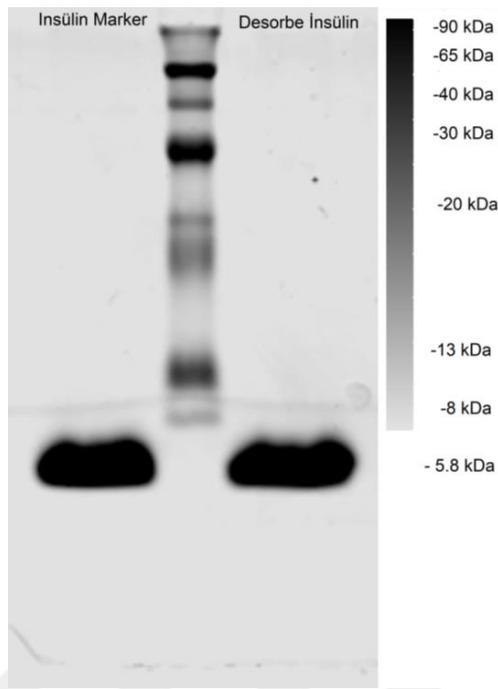
İnsülin molekülünün adsorpsiyonuna *p*-amino piridin ligandının ve Cu(II) iyonunun etkisini incelemek için daha önceden belirlenen optimum koşullarda (pH: 5,0; etkileşim süresi: 30 dak., insülin derişimi: 3000 mg/L; sıcaklık 4°C) Poli(HEMA-GMA), Poli(HEMA-GMA)-Pr ve Poli(HEMA-GMA)-Pr-Cu(II) kriyojeller ile adsorpsiyon çalışması yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.13'deki grafikte verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi Poli(HEMA-GMA) ve Poli(HEMA-GMA)-Pr kriyojellerin insülin adsorplama kapasiteleri Poli(HEMA-GMA)-Pr-Cu(II) kriyojele göre (242,66 mg/g) çok daha düşük olup sırasıyla 5,67 ve 24,18 mg/g şeklindedir. Bu sonuçlar bize Cu(II) iyonlarının insülin molekülleri ile elektrostatik etkileşimler kurduğunun bir göstergesidir. Bu etkileşimler sonucu da muhtemelen koordine kovalent bağlar meydana gelmektedir. Poli(HEMA-GMA) ve Poli(HEMA-GMA)-Pr kriyojellerde az da olsa insülin adsorpsiyonunun olmasının nedeni fiziksel etkileşimlerdir. Kriyojele *p*-amino piridin gruplarının bağlanması yapıdaki iyonlaşabilir grup sayısını arttırdığı için adsorplama kapasitesi de bir miktar artmıştır.



**Şekil 4.13.** Kriyojellerin ligand ve metal iyonuna bağlı olarak insülin adsorplama kapasiteleri

#### 4.6. SDS-PAGE Analizi

Şekil 4.14 incelediğinde insülin marker ve desorbe edilen insülin molekülünün bantları arasında herhangi bir farkın bulunmadığı görülmektedir. Bu da bize Pr-Cu(II) kodlu kriyojeller ile yapılan adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin insan insülininde herhangi bir yapısal bozunma yaratmadığını göstermektedir. Bu husus, bir kromatografik işlem için önemli özelliştir.



Şekil 4.14. SDS-PAGE analizi

## 4.7. Matematiksel Modellemeler

### 4.7.1. Adsorpsiyon izotermeleri

İnsülin molekülünün Pr-Cu(II) kriyojeller üzerine adsorpsiyonunun karakterizasyonu için Langmuir (Şekil 4.15) ve Freundlich (Şekil 4.16) adsorpsiyon izotermlerinden faydalanılmıştır. Bu iki izoterm sayesinde hedef molekül ile adsorban arasındaki etkileşimin teorik olarak nasıl gerçekleşmesi gerektiği ve deneysel sonuçların teoriğe ne kadar yakın olduğunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

Langmuir adsorpsiyon modelinde etkileşim tek tabakada ve homojen olarak gerçekleşmektedir. Bu adsorpsiyon modeline göre bir molekülün adsorplandığı bölge ile diğer bölgeler arasında ve diğer hedef moleküller arasında etkileşim bulunmamaktadır (Langmuir, 1918).

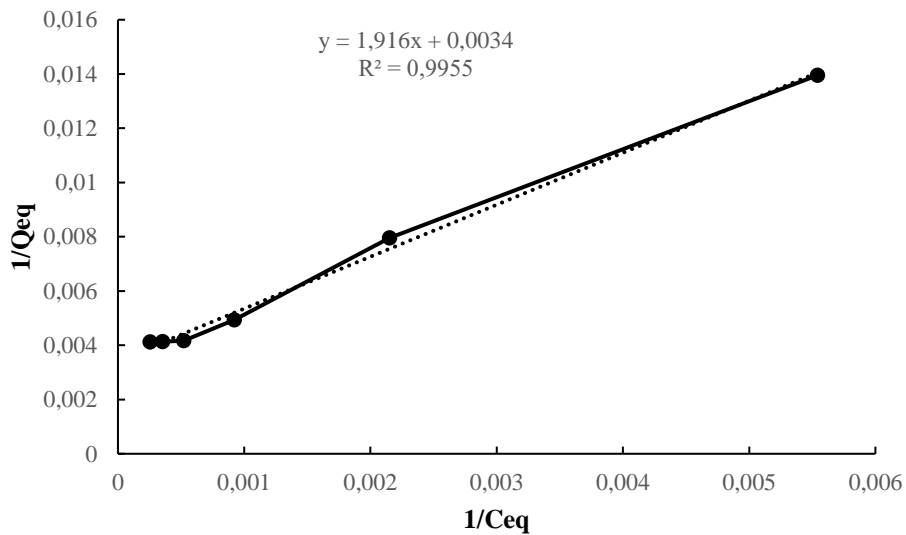
Aşağıdaki eşitlik Langmuir adsorpsiyon modeline göre maksimum adsorplanan insülin miktarının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

$$Q_{eq} = \frac{Q_{max} \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + bC_{eq}} \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Burada  $Q_{eq}$  adsorplanan insülin miktarını (mg/g),  $C_{eq}$  ise dengedeki insülin derişimini (mg/mL) belirtmektedir.  $b$ , Langmuir sabiti (mL/mg)'dir ve maksimum adsorplama kapasitesinin deneysel değer ile ilişkisini göstermektedir.  $Q_{max}$  ise maksimum adsorplama kapasitesidir. Doğrusallaştırma yapıldığında;

$$\frac{1}{Q_{eq}} = \left[ \frac{1}{Q_{max}} \cdot b \right] \left[ \frac{1}{C_{eq}} \right] + \left[ \frac{1}{Q_{max}} \right] \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

elde edilir.  $1/C_{eq}$ 'a karşı  $1/Q_{eq}$  grafiğinin y eksenini kestięi nokta  $1/Q_{max}$  değerini ve eęimi de  $1/Q_{max} \cdot b$  değerini vermektedir.



Şekil 4.15. Langmuir izotermi

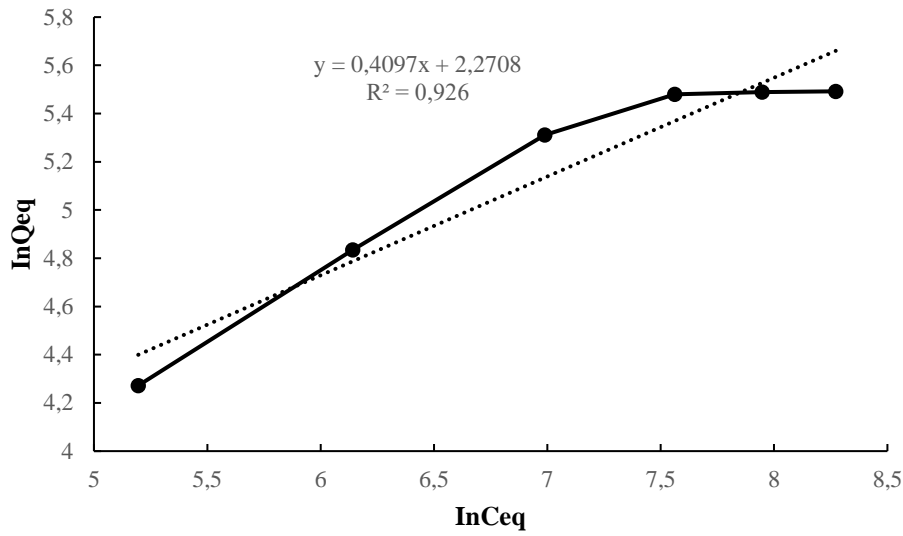
Pr-Cu(II) kriyojellere insülin adsorpsiyonunun teorik hesaplamaları Langmuir adsorpsiyon modeline göre yapıldığında, Langmuir korelasyon katsayısı oldukça yüksek bulunmuştur ( $R^2=0,9955$ ). Ayrıca  $Q_{max}$  değeri de deneysel olarak elde edilen maksimum adsorplama kapasitesi ile oldukça yakın değere sahiptir (Çizelge 4.3). Sonuç olarak insülinin Pr-Cu(II) kriyojele adsorpsiyonu Langmuir adsorpsiyon modeli ile açıklanabilir.

Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir adsorpsiyon modeli ise adsorpsiyonun heterojen ve çoklu tabakada gerçekleştiği esasına dayanan Freundlich adsorpsiyon modelidir. Bu modele göre adsorplanan hedef molekülün miktarı tüm bağlanma bölgelerine adsorplanmış moleküllerin toplamına eşittir ve tersinir adsorpsiyon gerçekleşmektedir (Freundlich, 1906). Freundlich adsorpsiyon modeli aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir;

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + (n \times \ln C_{eq}) \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

Burada  $K_f$  ve  $n$  Freundlich adsorpsiyon sabitlerini göstermektedir.  $\ln Q_{eq}$  'a karşı  $\ln C_{eq}$  grafiğinde  $\ln K_f$ , y eksenini kesen nokta ve eğim de  $n$  değerini vermektedir. Burada  $1/n$  değeri yüzey heterojenite indeksini belirtmektedir. Bu değer büyük olması adsorpsiyonun daha elverişli, sıfıra yakın olması ise düşük olduğunu bildirmektedir.  $K_f$  ise adsorplama kapasitesini göstermektedir. Bu değer ne kadar büyükse adsorplama kapasitesi o kadar büyüktür. Bu değerler, Pr-Cu(II) ve insülin arasındaki etkileşim için sırasıyla 2,44 ve 9,69 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının Langmuir modeline göre daha düşük olması ( $R^2=0,926$ ) da göz önüne alındığında Freundlich adsorpsiyon modelinin bu etkileşime uygun olmadığı görülmektedir.





Şekil 4.16. Freundlich izotermi

Çizelge 4.3. Adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları

Q <sub>den.</sub> (mg/g)	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri			
	Q <sub>max.</sub> (mg/g)	b (L/mg)	R <sup>2</sup>	K <sub>f</sub>	n	1/n	R <sup>2</sup>
242,8	294,1	0,0018	0,9955	9,69	0,4097	2,44	0,926

#### 4.7.2. Adsorpsiyon kinetik modelleme

Gerçekleşen etkileşim üzerindeki hakim kuvveti belirlemek amacıyla elde edilen deneysel veriler kullanılarak reaksiyon kinetiği hesaplamaları yapılmıştır. Yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik hesaplamaları yapabilmek için deneysel derişimlerin adsorban yüzeyindeki derişimlere eşit olması gerekmektedir. Bu işlemi yapabilmek için genellikle başvuru denklemleri Lagergren birinci-derece hız denklemdir (Kahyaoğlu ve Öztürk, 2012):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (\text{Eşitlik 4.4})$$

Burada  $q_{eq}$  (mg/g) dengedeki,  $q_t$  (mg/g)  $t$  anındaki adsorplanan insülin miktarını,  $k_1$  (1/dak.) ise yalancı- birinci derece adsorpsiyon hız sabitini belirtmektedir.

Sınır değerler,  $t=0$  için  $q_t=0$  ve  $t=t$  için  $q_t=q_t$  uygulandıktan sonra integrasyon uygulandığında;

$$\log \frac{q_{eq}}{q_{eq}-q_t} = \frac{k_1 t}{2.303} \quad (\text{Eşitlik 4.5})$$

Linearize edildiğinde ise;

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

denklemini elde edilir.

$\log(q_{eq})$ 'e karşı  $t$  grafiği çizildiğinde eğer doğrusal bir veri dizisi elde edilirse bu adsorpsiyon modeli yalancı-birinci kinetik model ile açıklanabilir ve fiziksel adsorpsiyon dinamiklerin kontrolü hakimdir.

Yalancı-ikinci derece denklem ise aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir;

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (\text{Eşitlik 4.7})$$

Burada  $k_2$  (g/mg.dak.) yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabitidir. Sınırlar,  $t=0$  için  $q_t=0$  ve  $t=t$  için  $q_t=q_t$  olduğunda yapılan integrasyon sonucu;

$$\frac{1}{q_{eq}-q_t} = \frac{1}{q_{eq}} + k_2 t \quad (\text{Eşitlik 4.8})$$

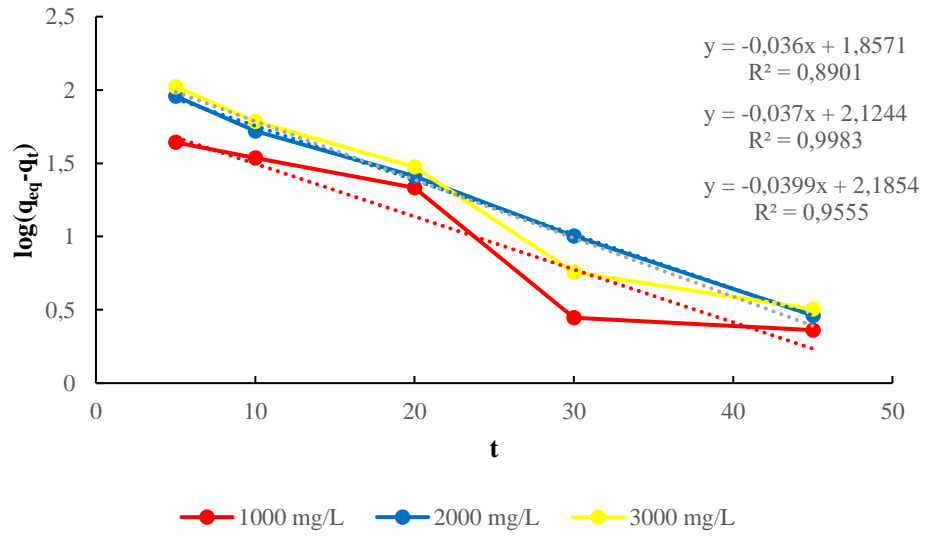
denklemini elde edilir. Doğrusal olarak ise;

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{eq}^2} + \frac{1}{q_{eq}} t \quad (\text{Eşitlik 4.9})$$

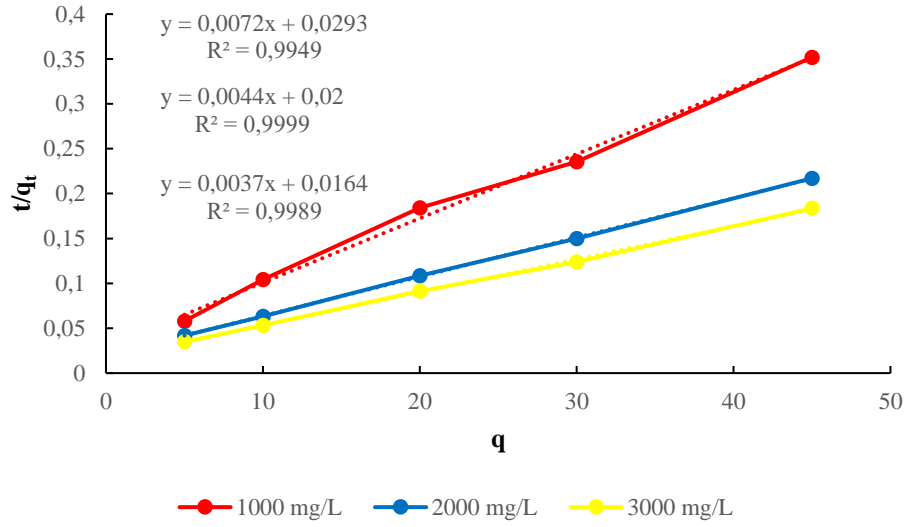
denklemini elde edilir.

Aynı zamanda bu etkileşimde yalancı ikinci derece kinetiğin uygulanabilmesi için  $t/q_t$  ye karşı  $t$  grafiğinin doğrusal olması gerekmektedir. Şekil 4.17 yalancı birinci derece

kinetik, Şekil 4.18 ise yalancı ikinci derece kinetik modellemenin deneysel verilere uygulanmış grafikleridir. Bu grafiklerden elde edilen sabitlerin özeti Çizelge 4.3'de verilmektedir. Çizelgeden de görüldüğü üzere deneysel verilerle en çok örtüşen ve en yakın değerler yalancı-ikinci derece kinetik modelleme hesaplamalarından elde edilmiştir. Sonuçlara göre korelasyon sabiti olan  $R^2$  değerleri yalancı ikinci derece kinetik modelleme için genelde 1,00'e yakındır. Yani Pr-Cu(II) kriyojele insülin adsorpsiyonu kimyasal dinamiklerin kontrolünde yürümüştür.



**Şekil 4.17.** Pr-Cu(II) ve insülin etkileşimi için deneysel verilerin yalancı birinci derece kinetiği



**Şekil 4.18.** Pr-Cu(II) ve insülin etkileşimi için deneysel verilerin yalancı ikinci derece kinetiği

**Çizelge 4.4.** Yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitler

Başlangıç Derişimi (mg/L)	$q_{\text{deneysel}}$ (mg/g)	Yalancı-Birinci Derece			Yalancı-İkinci Derece		
		$q_{\text{eq}}$ (mg/g)	$k_1$ (1/dak.)	$R^2$	$q_{\text{eq}}$ (mg/g)	$k_2$ (g/mg.dak.)	$R^2$
1000	130,2	71,96	0,0829	0,8901	138,89	0,00177	0,9949
2000	210,2	133,17	0,0852	0,9983	227,27	0,00097	0,9999
3000	248,3	153,25	0,0919	0,9555	270,27	0,000835	0,9989

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsülin adsorpsiyon deneyleri kesikli sistemde yapılmıştır.

- Poli(HEMA-GMA) kriyojeller serbest-radikal polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin spesifik yüzey alanı  $6,55 \text{ m}^2/\text{g}$  ve Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) kriyojelin ise  $9,18 \text{ m}^2/\text{g}$  bulunmuştur.
- Taramalı elektron mikroskop görüntülerinden anlaşıldığı üzere Pr-Cu(II) kriyojel makro gözeneklere sahiptir ve yüzey adsorpsiyon için son derece uygundur.
- Ligand katılım miktarı hesaplanmış ve *p*-amino piridin miktarı azot stokiyometrisi göz önünde bulundurularak  $393,14 \text{ } \mu\text{mol/g}$  kriyojel olarak bulunmuştur.
- Pr-Cu(II) kriyojelin termogravimetrik analizi yapılmış ve termal kararlılığı belirlenmiştir. Poli(HEMA-GMA) kriyojelin termal analizi incelendiğinde, yapının termal kararlılığı GMA komonomerlerinin HEMA monomerine eklenmesiyle artmıştır. Bozunma sıcaklık aralığı Poli(HEMA-GMA)-*p*-amino piridin-Cu(II) için  $285\text{-}792^\circ\text{C}$  olarak tespit edilmiştir.
- Pr-Cu(II) kriyojel ile insülin adsorpsiyonu elektrostatik nitelik taşıdığı için çözeltinin pH'ına bağlıdır. En yüksek adsorpsiyon değerinin hesaplanması için asidik ve bazik pH'larda adsorpsiyon işlemi yapılmış ve en uygun pH değerinin pH: 5,0 olduğu tespit edilmiştir. Bu pH değerindeki maksimum adsorplama kapasitesi  $244,9 \text{ mg/g}$  olarak bulunmuştur. Başlangıç insülin derişimi  $3,0 \text{ mg/mL}$  olarak alınmıştır.
- Pr-Cu(II) kriyojele insülin adsorpsiyonu sıcaklık arttıkça azalmaktadır.
- Pr-Cu(II) kriyojele adsorbe olan insülinin desorpsiyonu yine kesikli sistemde yürütülmüştür. Bu işlemde desorpsiyon ajanı olarak  $1,0 \text{ M}$   $10 \text{ mL}$  NaCl çözeltisi uygulanmış ve tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için 5 defa adsorpsiyon-

desorpsiyon döngüsü uygulanmıştır. İnsülin geri kazanım oranı ise ortalama % 93,52 olarak hesaplanmıştır.

- Pr-Cu(II) kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojel kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. Bu beş döngünün sonunda kayda değer bir azalma gözlenmemiştir (242,18 mg/g'dan 234,68 mg/g'a).
- İnsülin adsorpsiyonu için deneysel maksimum adsorplama kapasitesi ( $Q_{max}$ ) ve Langmuir ( $Q_{max}$ ) değeri birbiriyle uyumludur. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) Langmuir izotermi için 0,9955 Freundlich izotermi için 0,926'dır. Langmuir adsorpsiyon modeli bu afinite adsorban sistemine uygulanabilir. Yani Pr-Cu(II) kriyojele insülin molekülleri tek tabaka (homojen) halinde adsorplanmıştır ve polimerin yüzeyindeki tüm noktalar eş enerjilidir.
- İnsülin adsorpsiyonu üzerinde hâkim olan kinetik modellemenin ve sürücü kuvvetin belirlenmesi için yapılan matematiksel hesaplamalar sonucunda teorik ve deneysel  $q_{eq}$  değerlerinin yalancı ikinci-derece kinetik modelleme için birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak difüzyon sorunu yoktur ve sürücü kuvvet kimyasal kontrollü olarak gerçekleşmiştir.
- İnsülin adsorpsiyonu konusunda son yıllarda polimerler ile önemli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birtanesinde Memmedova ve ark. (2015) poligliseril metakrilat temelli kriyojele anti-insülin antibadi immobilize etmişler ve yaklaşık 12 mg/g insülin adsorplama kapasitesine ulaşmışlardır. Başka bir çalışmada ise Sarı ve ark. (2010) etilen glikol dimetakrilat temelli mikrokürelerin *N*-metakriloil-*L*-histidin ile fonksiyonelleştirilmesi sonucu elde edilen polimerik yapı ile insülin adsorpsiyonu yapmışlar ve 24,7 mg/g insülin adsorplama kapasitesi elde etmişlerdir. Çavuş ve ark. (2013) İse *L*-histidin bağlı 2-hidroksietil metakrilat kriyojeller ile yaklaşık 8,78 mg/g insülin adsorplama kapasitesi rapor etmişlerdir. Bu sonuçlardan da görülmektedirki Pr-Cu(II) kodlu kriyojeller ile elde edilen insülin adsorpsiyon sonuçları oldukça başarılıdır.

- İnsülin molekülünün adsorpsiyonunun Pr-Cu(II) kodlu kriyojeller tarafından yüksek bir adsorplama kapasitesi ile gerçekleşmesi, *p*-amino piridin molekülünün güçlü bir Lewis bazı ve Cu(II) iyonunun da güçlü bir Lewis asidi olmasının bir sonucudur diyebiliriz. Zira ligandın ve metalin yapıya fazlaca girmesi polimer ve hedef molekül arasındaki etkileşimin artması açısından avantaj sağlamaktadır.
- Pr-Cu(II) kodlu kriyojel insülin molekülünün ayırma-safılaştırma işlemlerinde kullanılabilir bir materyaldir. Özellikle de ticari olarak bakterilerden insülin elde edilmesi çalışmalarında yüksek adsorplama kapasitesi ile alternatif bir materyal olarak değerlendirilebilir. Elde edilen sonuçlar bu görüşü desteklemekle beraber immobilize metal afinite alanı açısından ümit vermektedir

## KAYNAKLAR

- Altmann, J., Rehfeld, D., Träder, K., Sperlich, A., Jekel, M., 2016. Combination of granular activated carbon adsorption and deep-bed filtration as a single advanced wastewater treatment step for organic micropollutant and phosphorus removal. *Water Research*, 92, 131-139.
- Andaç, M., Denizli, A., 2014. Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. *Rsc Advances*, 4(59), 31130-31141.
- Anonim, 2018. Drugbank. Insulin Human, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00030-> (22.01.2018).
- Arnold, F., Blanch, H., 1986. Analytical affinity chromatography: II. Rate theory and the measurement of biological binding kinetics. *Journal of Chromatography A*, 355, 13-27.
- Arora, S., Saxena, V., Ayyar, B. V., 2017. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*, 116, 84-94.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214(5095), 1302-1304.
- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., O’Kennedy, R., 2012. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, 56(2), 116-129.
- Baca, M., De Vos, J., Bruylants, G., Bartik, K., Liu, X., Cook, K., Eeltink, S., 2016. A comprehensive study to protein retention in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1032, 182-188.
- Boudesocque, L., Forni, L., Martinez, A., Nuzillard, J. M., Giraud, M., Renault, J. H., 2017. Purification of dirucotide, a synthetic 17-aminoacid peptide, by ion exchange centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1513, 78-83.
- Busto, M., Meza, V., Ortega, N., Perez-Mateos, M., 2007. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly (vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chemistry*, 104(3), 1177-1182.
- Champagne, J., Delattre, C., Shanthi, C., Satheesh, B., Duverneuil, L., Vijayalakshmi, M., 2007. Pseudoaffinity chromatography using a convective interaction Media®-disk monolithic column. *Chromatographia*, 65(11-12), 639-648.
- Chaudhary, R., Jain, S., Muralidhar, K., Gupta, M., 2006. Purification of bubaline luteinizing hormone by gel filtration chromatography in the presence of blue dextran. *Process Biochemistry*, 41(3), 562-566.



- Cheng, W. P., Gao, W., Cui, X., Ma, J. H., Li, R. F., 2016. Phenol adsorption equilibrium and kinetics on zeolite X/activated carbon composite. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 62, 192-198.
- Chien, Y. W., 1996. Human insulin: basic sciences to therapeutic uses. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 22(8), 753-789.
- Costa, H. B., Fernandes, P. M., Romão, W., Ventura, J. A., 2014. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. *Industrial Crops and Products*, 59, 163-168.
- Cömert, Ş. C., Odabaşı, M., 2014. Investigation of lysozyme adsorption performance of Cu<sup>2+</sup>-attached PHEMA beads embedded cryogel membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 34, 1-8.
- Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., León, C., Patarroyo, M. A., Arevalo, G., Pavia, P., Vallejo, G., Carranza J. C., Ramírez, J. D., 2017. Purification of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes by ion exchange chromatography in sepharose-DEAE, a novel methodology for host-pathogen interaction studies. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 27-32.
- Çavuş, A., Baysal, Z., Alkan, H., 2013. Preparation of poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogels containing l-histidine for insulin recognition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 84-89.
- De Leeuw, I., Vague, P., Selam, J. L., Skeie, S., Lang, H., Draeger, E., Elte, J., 2005. Insulin detemir used in basal-bolus therapy in people with type 1 diabetes is associated with a lower risk of nocturnal hypoglycaemia and less weight gain over 12 months in comparison to NPH insulin. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(1), 73-82.
- Doğan, A., Özkara, S., Sarı, M. M., Uzun, L., Denizli, A., 2012. Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. *Journal of Chromatography B*, 893, 69-76.
- Dudley, R., Hathaway, B., Hodgson, P., Mulcahy, J., Tomlinson, A., 1974. A correlation of the copper-nitrogen bond-lengths, infrared spectra and electronic spectra of some axial tetraammines and pentaammines of the copper(II) ion. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 36(9), 1947-1950.
- Çorman, M. E., Bereli, N., Özkara, S., Uzun, L., Denizli, A., 2013. Hydrophobic cryogels for DNA adsorption: Effect of embedding of monosize microbeads into cryogel network on their adsorptive performances. *Biomedical Chromatography*, 27(11), 1524-1531.

- Erol, K., Köse, K., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2016. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 567-576.
- Fausnaugh, J., Kennedy, L., Regnier, F., 1984. Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, 317, 141-155.
- Fekete, S., Veuthey, J. L., Beck, A., Guillarme, D., 2016. Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 3-18.
- Fineberg, S., Galloway, J., Fineberg, N., Rathbun, M., Hufferd, S., 1983. Immunogenicity of recombinant DNA human insulin. *Diabetologia*, 25(6), 465-469.
- Frascari, D., Bacca, A. E. M., Zama, F., Bertin, L., Fava, F., Pinelli, D., 2016. Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column. *Chemical Engineering Journal*, 283, 293-303.
- Freundlich, H., 1906. Über die adsorption in losungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57, 385-471.
- Guo, J., Liu, H., Liu, J., Wang, L., 2014. Ultrafiltration performance of EfOM and NOM under different MWCO membranes: Comparison with fluorescence spectroscopy and gel filtration chromatography. *Desalination*, 344, 129-136.
- Gusarov, D., Lasman, V., Bayramashvili, D., 2007. Methods for protecting silica sorbents used in high-performance liquid chromatography from strongly adsorbed impurities during purification of human recombinant insulin. *Journal of Chromatography B*, 853(1), 354-359.
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., 2012. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69, 93-105.
- Haimer, E., Tscheliessnig, A., Hahn, R., Jungbauer, A., 2007. Hydrophobic interaction chromatography of proteins IV: kinetics of protein spreading. *Journal of Chromatography A*, 1139(1), 84-94.
- Henderson, T. M., Ladewig, K., Haylock, D. N., McLean, K. M., O'Connor, A. J., 2013. Cryogels for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(21), 2682-2695.
- Hjertén, S., Yao, K., Eriksson, K.-o., Johansson, B., 1986. Gradient and isocratic high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns. *Journal of Chromatography A*, 359, 99-109.

- Hongxia, Z., Xiaoyun, W., Honghong, L., Tianshe, T., Wangsuo, W., 2016. Adsorption behavior of Th (IV) onto illite: effect of contact time, pH value, ionic strength, humic acid and temperature. *Applied Clay Science*, 127, 35-43.
- Jungbauer, A., Machold, C., Hahn, R., 2005. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption. *Journal of Chromatography A*, 1079(1), 221-228.
- Kahyaoglu, H., Öztürk, A., 2016. Dichlorvos Biyosorpsiyonunun Termodinamik ve Kinetiği. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(1), 70-76.
- Karakus, C., Uslu, M., Yazici, D., Salih, B. A., 2016. Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein. *Journal of Chromatography B*, 1021, 182-187.
- Kassab, E., Langlet, J., Evleth, E., Akacem, Y., 2000. Theoretical study of solvent effect on intramolecular proton transfer of glycine. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 531(1), 267-282.
- Kittelmann, J., Lang, K. M., Ottens, M., Hubbuch, J., 2017. Orientation of monoclonal antibodies in ion-exchange chromatography: A predictive quantitative structure–activity relationship modeling approach. *Journal of Chromatography A*, 1510, 33-39.
- Klein, E., Eichholz, E., Yeager, D. H., 1994. Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers. *Journal of Membrane Science*, 90(1-2), 69-80.
- Ladisch, M. R., Kohlmann, K. L., 1992. Recombinant human insulin. *Biotechnology Progress*, 8(6), 469-478.
- Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361-1403.
- Leatherbarrow, R. J., Dean, P., 1980. Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochemical Journal*, 189(1), 27-34.
- Lienqueo, M. E., Mahn, A., Salgado, J. C., Asenjo, J. A., 2007. Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, 849(1), 53-68.
- Lin, S. H., Juang, R. S., 2009. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: a review. *Journal of Environmental Management*, 90(3), 1336-1349.

- Liu, Z., Gurgel, P. V., Carbonell, R. G., 2013. Affinity chromatographic purification of human immunoglobulin a from Chinese hamster ovary cell culture supernatant. *Biotechnology Progress*, 29(1), 91-98.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445-451.
- Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2001. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10(4-5), 163-188.
- Machold, C., Deinhofer, K., Hahn, R., Jungbauer, A., 2002. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: I. Comparison of selectivity. *Journal of Chromatography A*, 972(1), 3-19.
- Mahn, A., Lienqueo, M. E., Asenjo, J. A., 2007. Optimal operation conditions for protein separation in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*, 849(1), 236-242.
- Mailler, R., Gasperi, J., Coquet, Y., Derome, C., Buleté, A., Vulliet, E., Bressy, A., Varrault, G., Chebbo, G., Rocher, V., 2016. Removal of emerging micropollutants from wastewater by activated carbon adsorption: experimental study of different activated carbons and factors influencing the adsorption of micropollutants in wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 1102-1109.
- McCue, J. T., 2009. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods in Enzymology*, 463, 405-414.
- Melander, W., Horváth, C., 1977. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183(1), 200-215.
- Memmedova, T., Armutcu, C., Uzun, L., Denizli, A., 2015. Polyglycidyl methacrylate based immunoaffinity cryogels for insulin adsorption. *Materials Science and Engineering: C*, 52, 178-185.
- Min, C. K., Son, Y. J., Kim, C. K., Park, S. J., Lee, J. W., 2011. Increased expression, folding and enzyme reaction rate of recombinant human insulin by selecting appropriate leader peptide. *Journal of biotechnology*, 151(4), 350-356.
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L. C., Carvalheiro, F., 2014. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Industrial Crops and Products*, 62, 460-465.
- Nfor, B. K., Hylkema, N. N., Wiedhaup, K. R., Verhaert, P. D., Van der Wielen, L. A., Ottens, M., 2011. High-throughput protein precipitation and hydrophobic

- interaction chromatography: salt effects and thermodynamic interrelation. *Journal of Chromatography A*, 1218(49), 8958-8973.
- Önnby, L., Giorgi, C., Plieva, F. M., Mattiasson, B., 2010. Removal of heavy metals from water effluents using supermacroporous metal chelating cryogels. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1295-1302.
- Perkins, T. W., Mak, D. S., Root, T. W., Lightfoot, E. N., 1997. Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. *Journal of Chromatography A*, 766(1), 1-14.
- Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., Mattiasson, B., 2008. Cryogel applications in microbiology. *Trends in Microbiology*, 16(11), 543-551.
- Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1(4), 303-309.
- Porath, C., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598-599.
- Prasanna, R. R., Kamalanathan, A. S., Vijayalakshmi, M. A., 2015. Development of l-histidine immobilized CIM® monolithic disks for purification of immunoglobulin G. *Journal of Molecular Recognition*, 28(3), 129-141.
- Queiroz, J., Tomaz, C., Cabral, J., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87(2), 143-159.
- Rea, J. C., Freistadt, B. S., McDonald, D., Farnan, D., Wang, Y. J., 2015. Capillary ion-exchange chromatography with nanogram sensitivity for the analysis of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*, 1424, 77-85.
- Roberts, M. W., Ongkudon, C. M., Forde, G. M., Danquah, M. K., 2009. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. *Journal of Separation Science*, 32(15-16), 2485-2494.
- Rotenstein, L. S., Ran, N., Shivers, J. P., Yarchoan, M., Close, K. L., 2012. Opportunities and Challenges for Biosimilars: What's on the Horizon in the Global Insulin Market? *Clinical Diabetes*, 30(4), 138-150.
- Sahiner, N., Seven, F., 2014. Energy and environmental usage of super porous poly (2-acrylamido-2-methyl-1-propan sulfonic acid) cryogel support. *Rsc Advances*, 4(45), 23886-23897.

- Sari, M. M., Armutcu, C., Bereli, N., Uzun, L., Denizli, A., 2011. Monosize microbeads for pseudo-affinity adsorption of human insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 140-147.
- Shaltiel, S., Er-El, Z., 1973. Hydrophobic chromatography: use for purification of glycogen synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 778-781.
- Srihari, V., Das, A., 2008. Comparative studies on adsorptive removal of phenol by three agro-based carbons: equilibrium and isotherm studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 274-283.
- Staak, C., Salchow, F., Clausen, P.-H., Luge, E., 1996. Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 194(2), 141-146.
- Štamberg, J., 1988. Bead cellulose. *Separation and Purification Methods*, 17(2), 155-183.
- Sun, X., Liu, X., Feng, J., Li, Y., Deng, C., Duan, G., 2015. Hydrophilic Nb<sup>5+</sup>-immobilized magnetic core-shell microsphere—A novel immobilized metal ion affinity chromatography material for highly selective enrichment of phosphopeptides. *Analytica Chimica Acta*, 880, 67-76.
- Vailaya, A., Horvath, C., 1996. Retention thermodynamics in hydrophobic interaction chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 35(9), 2964-2981.
- Verdoliva, A., Pannone, F., Rossi, M., Catello, S., Manfredi, V., 2002. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *Journal of Immunological Methods*, 271(1), 77-88.
- Walters, R. R., 1985. Affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, 57(11), 1099A-1114A.
- Wang, X., Min, B. G., 2007. Cadmium sorption properties of poly (vinyl alcohol)/hydroxyapatite cryogels: I. kinetic and isotherm studies. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 43(1), 99-104.
- Werner, M. H., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Kondoh, A., Fisher, R. J., 1994. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Letters*, 345(2-3), 125-130.
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706), 117-118.

Xia, F., Negrath, D., Garde, S., Cramer, S. M., 2004. Evaluation of selectivity changes in HIC systems using a preferential interaction based analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(3), 354-363.

Yip, T.-T., Hutchens, T. W., 1994. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Molecular Biotechnology*, 1(2), 151-164.

Zhang, K., Cao, M., Lou, C., Wu, S., Zhang, P., Zhi, M., Zhu, Y., 2017. Graphene-coated polymeric anion exchangers for ion chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 970, 73-81.

Zhang, S., Sheng, J. J., Qiu, Z., 2016. Water adsorption on kaolinite and illite after polyamine adsorption. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 142, 13-20.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : EROL, Beray  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 12.10.1991 – İskilip/ÇORUM  
Medeni Hali : Evli  
Telefon : 0544 604 51 26  
e-mail : bulter12beray@hotmail.com.tr

<b>Eğitim</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet Tarihi</b>
Lisans	Hitit Üniversitesi Kimya Bölümü	2014
Lise	İskilip Lisesi	2010

### Yabancı Dil

İngilizce