

**ANTİBİYOTİKLERİN MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ
İLE SIVI KROMATOĞRAFİ SİSTEMİNDE AYIRIMI**

**SEPARATION OF ANTIBIOTICS USING MOLECULAR
IMPRINTING METHOD BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
SYSTEM**

MUSTAFA DENİZ AĞLAMAZ

Prof. Dr. ADİL DENİZLİ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2017

MUSTAFA DENİZ AĞLAMAZ' ın hazırladığı '**Antibiyotiklerin Moleküler Baskılama Yöntemi ile Sıvı Kromatografi Sisteminde Ayırımı**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

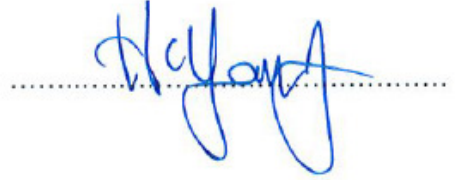
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Başkan - Danışman



Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Üye



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumuntarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun 25.06.2019 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

30 / 06 / 2017



Mustafa Deniz AĞLAMAZ

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün belge ve bilgileri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22.06.2017



MUSTAFA DENİZ AĞLAMAZ

ÖZET

ANTİBİYOTİKLERİN MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE SIVI KROMATOĞRAFI SİSTEMİNDE AYIRIMI

Mustafa Deniz AĞLAMAZ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Haziran 2017, 74 sayfa

Kromatografik analiz yöntemleri arasında önemli noktada bulunan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi'nin (HPLC) son dönemde yeri önem kazanmaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte daha yüksek basınçlara çıkan UPLC sistemleri geliştirilmektedir. Sıvı kromatografisinin temel parçası olan kolonlar ise bu gelişmeden tabii ki nasiplerini almaktadırlar. İşte bu noktada gelişen gözenekli ve yekpare yapısı ve farklı fonksiyonel grup içerebilen noktaları ile monolitik dolgu maddesi teknolojisi, basınç düşmanı sloganıyla kendini göstermektedir. Monolitik dolgu maddelerinin sayısız üstün özellikleri ve bu özelliklerini performans kaybı yaşatmadan sunmaları onları eşsiz kılan noktalardandır. Yapılan tez çalışmasında antibiyotik çeşitlerinden amoksisilin ayırımını, hidrofobik etkileşim temeline dayandırarak etkin bir şekilde gerçekleştiren monolitik kolon sentezlenmiştir. Fonksiyonel ligand olan N-metakriloil-L-triptofan (MATrp), metakriloil klorür ve L-

triptofan molekülleri kullanılarak sentezlenmiştir. Monomer olan MATrp ile yapı iskeletini oluşturacak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'nın yığın polimerizasyon tekniği ile cam kolon içerisinde monolitik kolon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonun yüzey alanı 14.2 m²/g'dır. Karakterizasyon yöntemlerinden olan Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemleri kullanılarak, fonksiyonel monomer MATrp'ın yapısı incelenmiştir. Sentezlenen poli(HEMA-MATrp) monoliti elemental analiz ile incelenmiş ve yapıya giren MATrp miktarı bulunmuştur. Ayrıca; Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Sulu çözeltide amoksisilin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tampon sisteminin adsorpsiyonu etkilediği görülmüş ve maksimum amoksisilin adsorpsiyonu 64 mg/g olarak fosfat tamponu varlığında, pH 7 de gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sonucunda poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonun adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma gözlenmemiştir. Monolitik kolonun tekrar kullanılabilirliği de ayrıca incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Monolitik kolon, amoksisilin, antibiyotik, hidrofobik etkileşim.

ABSTRACT

SEPARATION OF ANTIBIOTICS USING MOLECULAR IMPRINTING METHOD BY LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM

Mustafa Deniz AĞLAMAZ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

June 2017, 74 pages

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), one of the most important points among the chromatographic analyzes, is shining day by day in the chromatography sector. With developing technology, HPLC systems are being developed at higher pressures and the name is to be UPLC. Columns, which are the basic part of liquid chromatography, develop with developing technology. Here, the monolithic column technology with its pore and monolithic structure and different functional groups which develop in this point, manifests itself with the slogan of pressure enemy. The numerous superior features of monolithic columns and their ability to deliver these features without losing performance make them unique properties. In the thesis study, monolithic column which make amoxicillin separation efficiently based on hydrophobic interaction basis was synthesized. Amoxicillin, the antibiotic variety, used in the thesis. Functional monomer that name is N-methacryloyl-L-tryptophan (MATrp) was synthesized with using

methacryloyl chloride and L-Tryptophan. Monolithic column is prepared in a glass column by bulk polymerisation technique of functional monomer MATrp and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) which will form the structural skeleton. The surface area of the prepared poly(HEMA-MATrp) monolithic column is 14.2 m²/g. Functional monomer MATrp was characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR), which are characterization methods. The synthesized poly(HEMA-MATrp) monolith was subjected to elemental analysis and also characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and FTIR. Adsorption and desorption of amoxicillin in aqueous solution were carried out in the presence of poly (HEMA-MATrp) monolithic column. The buffer system used was found to affect the adsorption and the maximum amoxicillin adsorption 64 mg/g was carried out in the presence of phosphate buffer, pH 7. As a result of adsorption-desorption cycling no significant decrease in adsorption capacity of poly(HEMA-MATrp) monolithic column material was observed. The reusability of the monolithic column has also been examined.

Key words: Monolithic column, amoxicillin, antibiotic, hydrophobic interactions.

TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalını bir aileye çeviren, yüksek lisans eğitimim ile bana bu ailenin bir parçası olma yolunu açan, engin tecrubesini, yardımseverliği ve hoş sohbetini hiçbir zaman esirgemeyen, öncü bilim insanlarından olan saygıdeğer ve sevgili danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Lisansımın son yıllarında bitirme tezi ile akademik dünyanın kapısını bana aralayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü dert ve tasamı paylaştığım, en zor zamanlarımda yardımına koşan, bilgi ve tecrubesine sonuna kadar inandığım, örnek aldığım, kurucusu olduğumuz Hacettepe Üniversitesi Sualtı Sporları Topluluğu'nun eski danışman hocalarından, saygıdeğer ve sevgili hocam Doç. Dr. Lokman Uzan'a,

Bölümü her girişimde güler yüzleri ile karşılaştığım, tüm sorularıma içtenlikle cevap veren hocalarım Prof. Dr. Handan Yavuz, Doç. Dr. Deniz Türkmen, Doç. Dr. Nilay Bereli ve Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Çalışmalarım esnasında tüm tecrube ve bilgi birikiminden faydalandığım, birlikte çalışmaktan son derece keyif aldığım, çalışkan ve disiplinli ağabeyim Doç. Dr. Kadir Erol'a,

Karşılaştığım tüm sıkıntılı durumlarla kafalarını şişirdiğim fakat hiç itiraz etmeden beni dinleyen, bana akıl veren, ellerinden gelen tüm yardımı içtenlikle teklif eden abi ve abla olarak gördüğüm Mehmet Emin Çorman, Canan Armutçu Çorman, Ali Derazshamshir, Kazım Köse, Ilgım Göktürk ve Sevgi Aslıyüce Çoban'a,

Biyokimya ailesini sıcak ve samimi bir ortam haline getiren çalışma arkadaşlarım, abi ve ablalarım, Aykut Topçu, Erdoğan Özgür, Erkut Yılmaz, Fatma Kartal, Gülsu Şener, Hatice Bektaş, Kemal Çetin, Yeşeren Saylan, Monireh Bakhshpour, Semra Akgönüllü'ye ve daha ismini saymadığım tüm biyokimya üyelerine,

Tez dönemimdeki sıkıntılarımı usanmadan dinleyen, biyokimya ailesinin dışında bana bir aile ortamı daha katan İnorganik Kimya Anabilim Dalından sevgili hocam Doç. Dr. Solmaz Karabulut, ekibindeki hocam-arkadaşım Dr. Bengi Ögün Öztürk'e

Her zaman yanımda olduklarını hissettiğim dostlarım, kardeşlerim ve ev arkadaşlarım, mavi ve yeşil âşıkları Onur Geylan, Durmuş Aşıcıoğlu, Mete Öz ve Efe Şengün ile bu grubun çiçeği Burcu Durmuş'a,

Her konuda desteklerinin arkamda olduğunu bildiğim, beni bu günlere getiren, bir dediğimi iki etmeyen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Fikriye Ağlamaz ve canım babam Musa Ağlamaz'a,

Sonsuz Teşekkürler...

Mustafa Deniz Ağlamaz

Haziran 2017, Ankara

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antibiyotikler ve Amoksisilin	4
2.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	6
2.1.1.1. Hedef Hücreye Etkilerine Göre Antibiyotik Çeşitleri	6
2.1.1.2 Etki Mekanizmasına Göre Antibiyotik Çeşitleri	6
2.1.1.3. Kimyasal Yapılarına Göre Antibiyotik Çeşitleri	8
2.1.2. Amoksisilin Yapısı ve Özellikleri	8
2.1.2.1. Amoksisilin Elde Edilişi	10
2.1.2.2. Amoksisilin Farmokinetik Özelliği ve Klinik Kullanımı	10
2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi.....	11
2.2.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Tarihi ve Gelişimi	11
2.2.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Temelleri	12
2.2.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Etkenleri	15
2.2.3.1. Ligand Çeşidi.....	15
2.2.3.2. Matris Çeşidi.....	16
2.2.3.3. Tuz Derişiminin ve Türünün Etkisi	17
2.2.3.4. pH etkisi.....	18
2.2.3.5 Sıcaklık Etkisi	19
2.2.3.6. Katkı Maddeleri	19
2.3. Monolitler.....	20
2.3.1. Monolitik Yapılı Kolonların Tarihi	20
2.3.2. Monolitik Yapılı Kolon Dolgu Malzemeleri	21
2.3.3. Monolitlerin Yüzey Alanı ve Gözenek Özellikleri	22
2.3.4. Monolitlerin Türleri.....	24

2.3.4.1. Silika Monolitler	24
2.3.4.2. Polimer Monolitler.....	26
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	27
3.2. N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezi.....	27
3.3. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik HPLC Kolonların Hazırlanması	28
3.4. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu.....	29
3.4.1. FTIR ile Yapı Analizi	29
3.4.2. NMR Çalışmaları	29
3.4.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi.....	30
3.4.4. Yüzey Morfolojisi	30
3.4.5. Yüzey Alanı Ölçümleri	30
3.4.6. Elementel Analiz.....	30
3.5. Adsorpsiyon – Desorpsiyon Çalışmaları.....	31
3.5.1. Amoksisilinin Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu	31
3.5.2. Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Karşılaştırması	31
3.5.3. Desorpsiyon Çalışmaları	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) Monomerinin Karakterizasyonu.....	33
4.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu.....	35
4.2.1. FTIR (Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi) Analizleri	35
4.2.2. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi.....	36
4.2.3. Yüzey Morfolojisi	37
4.2.4. Yüzey Alanı Ölçümü	37
4.2.5. Elementel Analiz.....	39
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları.....	39
4.3.1. Amoksisilinin Poli(HEMA-MATrp) Üzerine Adsorpsiyonu	39
4.3.1.1. Amoksisilin Derişim Etkisinin İncelenmesi	39
4.3.1.2. Akış Hızı Etkisinin İncelenmesi.....	40
4.3.1.3. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	41
4.3.1.4. Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Karşılaştırması	42
4.3.2. Adsorpsiyon Termodinamiği	43
4.3.3. Adsorpsiyon İzotermiği.....	45
4.3.4. Adsorpsiyon Kinetiği.....	48

4.3.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	51
5. YORUM	52
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	54
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Penisilinin bakteriler üzerindeki etkisi.	5
Şekil 2.3. Antibiyotiklerin etki mekanizması.	7
Şekil 2.4. Antibiyotik çeşitlerine örnekler.	8
Şekil 2.5. Amoksisilin yapısı.	9
Şekil 2.6. Amoksisilinin elde edilmiş tepkimesi.	10
Şekil 2.7. Aminoasit gruplarının hidrofobisite sıralaması	13
Şekil 2.8. Hidrofobik etkileşim.	14
Şekil 2.9. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde alkil zincir uzunluğunun ve süstitüsyon derecesinin bağlanma kapasitesine etkisi.	15
Şekil 2.10. Agaroz matrikse bağlanmış farklı hidrofobik gruplardan örnekler	16
Şekil 2.11. Agaroz matris.	17
Şekil 2.12. Hoffman Serisi.	17
Şekil 2.13. Tuz etkisi.	18
Şekil 2.15. Partikül ve Monolitik kolon karşılaştırması; dolgulu kolon ve monolit sistemlerin gözenek ağ modelinin şematik gösterimi.	24
Şekil 2.16. Tipik bir monolitik kolondaki gözenek yapılarının SEM görüntüsü	25
Şekil 3.1. Monolitik kolon hazırlama sistemi.	29
Şekil 4.2. MATrp monomerinin FTIR spektrumu.	33
Şekil 4.3. MATrp monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (DMSO).	34
Şekil 4.4. MATrp monomerinin D ₂ O içinde ¹³ C-NMR spektrumu.	34
Şekil 4.5. Poli(HEMA-MATrp)' nin molekül yapısı.	35
Şekil 4.6. Poli(HEMA-MATrp) monolitine ait FTIR Spektrumu.	36
Şekil 4.7. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda geri basınç-akış hızı arasındaki bağlantının incelenmesi.	37
Şekil 4.9. Poli(HEMA-MATrp) monoliti ile amoksisilin arasındaki adsorpsiyona amoksisilin başlangıç derişimi etkisi.	40
Şekil 4.10. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda amoksisilin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.	41
Şekil 4.11. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda farklı derişimlerideki amoksisilin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi.	42

Şekil 4.12. Kesikli ve sürekli sistemde poli(HEMA-MATrp) monolitinde amoksisilin adsorpsiyon kapasitesi.....	43
Şekil 4. 13. Van't Hoff denkleminde ΔH 'ı bulmak için çizilen grafik.....	45
Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklardaki poli(HEMA-MATrp) monoliti için Langmuir izoterm modeli.....	46
Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklardaki poli(HEMA-MATrp) monoliti için Freundlich izoterm modeli.....	47
Şekil 4.16. Poli(HEMA-MATrp) monoliti için elde edilen verilerin yalancı-birinci derece kinetiği.....	49
Şekil 4.17. Poli(HEMA-MATrp) monoliti için elde edilen verilerin yalancı-ikinci derece kinetiği.....	50
Şekil 4.18. Poli(HEMA-MATrp) monolitinin tekrar kullanılabilirliği.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde bazı çözücülerin fiziksel özellikleri.	20
Çizelge 3.1. Polimerizasyon şartları ve prosüdür.	28
Çizelge 4.1. Amoksisilin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich Adsorpsiyon sabitleri ve kolerasyon katsayıları.	48
Çizelge 4.2. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.....	50

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ve sağlığın devamı açısından oldukça büyük öneme sahip ilaçlardır. Hedef hücreye etkilerine, etki mekanizmasına ve kimyasal yapılarına bağlı olarak antibiyotikler üç farklı grup altında toplanmaktadırlar. Özellikle penisilininin bulunması antibiyotik tarihi için bir mihenk taşıdır. Bu süreçte sürekli gelişen ve büyüyen antibiyotik sektörü günümüzde çok önemli bir güce ulaşmıştır.

B laktam grubu antibiyotikler içerisinde bulunan amoksisilin aynı zamanda penisilin türevi olan bir aminopenisilindir. Yapısında laktam halkası ve aromatik grup bulundurur. Etkinliği yüksek bir antibiyotik olan amoksisilin; kulak-burun-boğaz ve idrar yolu enfeksiyonları ile sinüzit, bronşit ve zatüre tedavisinde kullanılmaktadır [1].

İlaç etkisi gösteren molekülün formülasyonu içerisinde bulunmayan ve istenmeyen maddelere safsızlık denilmektedir. Safsızlıklar, sentez esnasında oluştuğu gibi, sıcaklık, ışık gibi çevresel koşulların etkisi ile de oluşabilmektedir. İnsan üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip olmaları yüzünden safsızlık analizleri farmasötik ilaç keşfi ve gelişmesinde oldukça önemlidir. Öyleki ana bileşiğin içerisindeki safsızlık miktarının % 0.01'den düşük olması ilaç üretiminde istenmektedir. Amoksisilin ve safsızlık analizi UV dedektörlü ve MS dedektörlü HPLC sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Yeni nesil UPLC cihazlarıyla amoksisilin ve safsızlıkları 5 dk gibi bir süre içerisinde analiz edilebilirken, standard HPLC sistemleri ile bu süre üç kat kadar artmaktadır [2].

Sıvı kromatografisindeki en önemli nokta kolondur. Çünkü ayırımın ve saflaştırmanın gerçekleştiği yer burasıdır. Kolondaki ayırımın temel mantığı ise sıvı fazdaki hedef molekülün, kolon içerisindeki dolgu malzemesine karşı olan ilgisinden kaynaklı olarak kolonda tutunarak alıkonması ve belirli bir zaman sonra kolonu terk etmesidir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) giderek artan ve yaygınlaşan bir kullanım ağına sahiptir. Öyleki çevreden ilaca, gıdadan kozmetiğe birçok farklı sektörde analitik analiz cihazı olarak kullanılmaktadır. Sektördeki bu gelişim HPLC yi geliştirmeye sevk etmiş, daha yüksek basınca çıkabilen, daha hızlı analiz yapabilen sistemler (UPLC sistemleri) geliştirilmiştir. Sistem içerisinde artan basıncın, analiz süresini kısaltma gibi avantajları olmasına rağmen, kolon ve cihaz

parçalarının ömrünü azaltması gibi dezavantajları da vardır. Bundan dolayı yüksek ayırım gücü sağlamak, fakat bu süreci de düşük basınç altında yapabilmek için yeni metotlara ihtiyaç vardır. Bu tür yöntemlerin geliştirilmesi için HPLC'de monolitik dolgulu kolonların kullanılması yeni bir basamak olmuştur [3].

Monolitik dolgu maddeleri silika ve polimer bazlı olabilir. Monolitik dolgu maddesi gözenekli ve yekpare bir yapıdan oluşur. Bu karakteristik yapı üstün hidrodinamik özellikleri de beraberinde getirmektedir. Yüksek akış hızlarına çıkılmasına rağmen, düşük geri basınç sergilerler. Aynı zamanda kirli ve viskoz numuneler (krem, şurup, gibi) klasik dolgulu kolonlarda tıkanmalara neden olurken monolitik dolgu malzemesine sahip kolonlarda çok rahat bir şekilde analizi yapılabilmektedir. Partikül kolona kıyasla bu artılarının dışında, seçiciliğinde herhangi önemli bir azalma da gözlenmemektedir. Preparatif, yarı-preparatif ve analitik ölçekteki analizlerde kullanımları artan bir ivme ile devam etmektedir.

Yalancı-spesifik ligandlar; hidrofilik, hidrofobik etkileşimler ile elektrostatik ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşim güçlerini bünyelerinde barındırabildikleri için; zayıf afinite ligandları olmalarına rağmen hedef molekül ile seçici ve güçlü etkileşime girebilirler. Bu özelliklerinden dolayı da son zamanlarda biyoligandlara alternatif olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda üretim maliyetleri de biyoligandlara göre daha düşüktür.

Sunulan tezin amacı poli(2-hidroksietil metakrilat) [poli(HEMA)] temelli, monolitik yalancı-spesifik afinite dolgu maddesinin hazırlanarak, sulu çözeltideki amoksisilin adsorpsiyonunda kullanılabilirliğinin incelenmesidir. Bu bağlamda ilk basamak olarak yalancı-spesifik ligand, aynı zamanda fonksiyonel monomer olan N-metakriloil-L-triptofan (MATrp) sentezlenmiştir. İkinci basamak olarak yığın polimerizasyon tekniğiyle; yapı monomeri olarak HEMA, fonksiyonel monomer olarak MATrp kullanılarak poli(2-hidroksietilmetakrilat-N-metakriloil-L-triptofan) [poli(HEMA-MATrp)] monolitik kolon hazırlanmıştır. Karakterizasyon yöntemlerinden Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) kullanılarak, MATrp'nın karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen monolitik polimer dolgu maddesi poli(HEMA-MATrp)'nın elemental analizi ve yüzey alanı ölçümü (BET) gerçekleştirilmiş; Fourier Transform İnfrared spektroskopisi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümleri ile karakterizasyonu tamamlanmıştır. Üçüncü basamak olarak

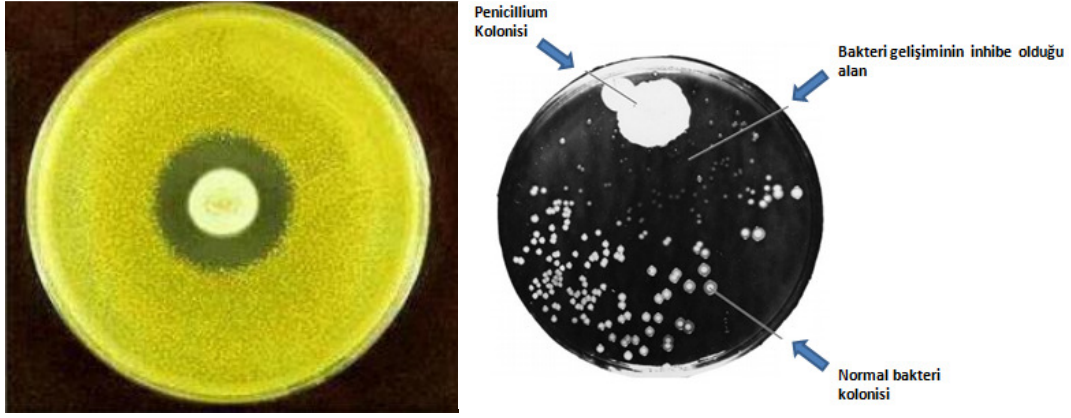
poli(HEMA-MATrp) monolitik dolgu maddesi üzerine amoksisilin adsorpsiyon çalışmaları (pH, derişim, akış hızı, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca adsorpsiyon çalışmalarında sũrekli ve kesikli sistem deneyleri de gerçekleştirilmiş ve sulu çözeltilerden amoksisilin adsorpsiyonu incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler ve Amoksisilin

Antibiyotikler, diğler organizmaların gelişmesini engellemek için bir mikroorganizma tarafından düşük derişimlerde üretilen bileşiklerdir [4]. Antibiyotik terimi bakteri, mantar, aktinomisetler gibi mikroorganizamalar tarafından sentezlenen veya sentetik olarak hazırlanan, son derece düşük miktarlarda bile, bakterilerin gelişmesini engelleyen veya onları öldüren maddeler olarak tanımlanır [5]. Antibiyotikler, enfeksiyonlarla mücadelede son derece önemli bir silahtır. Hayvanlarda ve insanlarda doğuştan gelen bağışıklık sistemi kendi antimikrobiyal peptidlerini üretir ve bu sistem evrimsel olarak korunur [6].

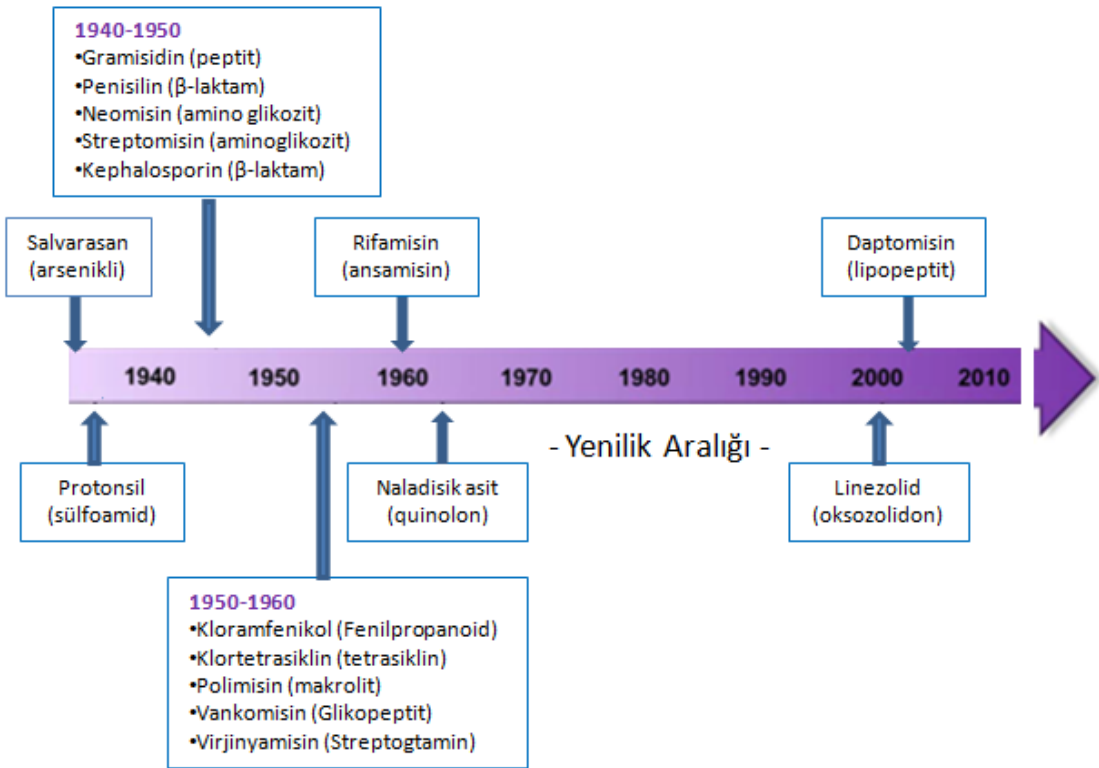
2000 yılı aşkın bir süre önce eski Çin Tıbbında enfeksiyon tedavilerinde antimikrobiyal özellikli bitkiler kullanılıyordu [7]. Antik Mısır ve Antik Yunan gibi bir çok eski kültür, enfeksiyonları tedavi etmek için bitkiler kullandı [8]. 1877 yılında Pasteur ve Robert bilimsel anlamda iki farklı mikroorganizmanın aynı ortamda bulduklarında diğlerine zarar verdiğini göstermiştir. Kemoterapötik olarak adlandırılan kimyasal maddeler 17. yüzyıldan itibaren enfeksiyon hastalıklarında kullanılmaya başlanmıştır. Paul Ehrlich tarafından 'seçici toksik etki' terimi ortaya atılmış ve kemoterapötik tedavi temeli bilimsel bir noktaya dayandırılmıştır. 1935 yılında Domogk sülfamidleri tedavi sürecinde kullanarak, antimikrobiyal tedavi gelişmeye başlamıştır. 1929 yılında Fleming tarafından gözlenen ve 1940 yılında Flayer ve Chain'in mikroorganizmaları öldüren bir etkiye sahip olduğunu gördüğü *Penicillium notatum*'dan elde edilen bir maddenin kullanıma girmesiyle, antibiyotikler tedavi sürecindeki yerlerini almıştır. 1889 yılında Vuillemin, terim olarak *antibios*'u (bir canlının başka canlıyı öldürmesi) tanımlamış ve böylece antibiyotik olgusu ortaya çıkmıştır. Bu kavram günümüzde modern tıpta halen kullanılmaktadır [9].



Şekil 2.1. Penisilin bakteriler üzerindeki etkisi [10, 11].

Eski zamanlarda antibiyotikler genellikle sentelenerek elde edilen kemoterapötiklerden ayrı bir ilaç grubu olarak bilinmekte iken, bazı antibiyotiklerin de kemoterapötikler gibi sentetik veya yarı sentetik elde edilmesi nedeniyle günümüzde antibiyotikler ve antibakteriyel kemoterapötikler eş anlamlı sözcükler olarak kullanılmaktadır [12].

Antibiyotik gelişim tablosu;



Şekil 2.2. Yeni antibiyotiklerin ortaya çıkışı.

2.1.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antbiyotikler ve kemoterapötikler; hedef hücreye etkilerine, etki mekanizmasına ve kimyasal yapılarına göre olmak üzere üç ana başlık altında sınıflandırılırlar

2.1.1.1. Hedef Hücreye Etkilerine Göre Antibitibiyotik Çeşitleri

Bakteriyostatikler ve bakterisidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Bakteriyostatikler, bakteri hücrelerinin gelişimini ve üremesini önlerler. Bakteriyi doğrudan öldürmezler. Gelişmesi ve üremesi engellenen bakteri vücudun hücrel savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilebilir. Bu gruptaki ilaçlar aşağıdaki gibi sıralanırlar;

- Tetrasiklinler
- Kloramfenikol
- Sülfonamidler
- Eritromisin
- Klindamisin
- Mikonazol
- Etambutol

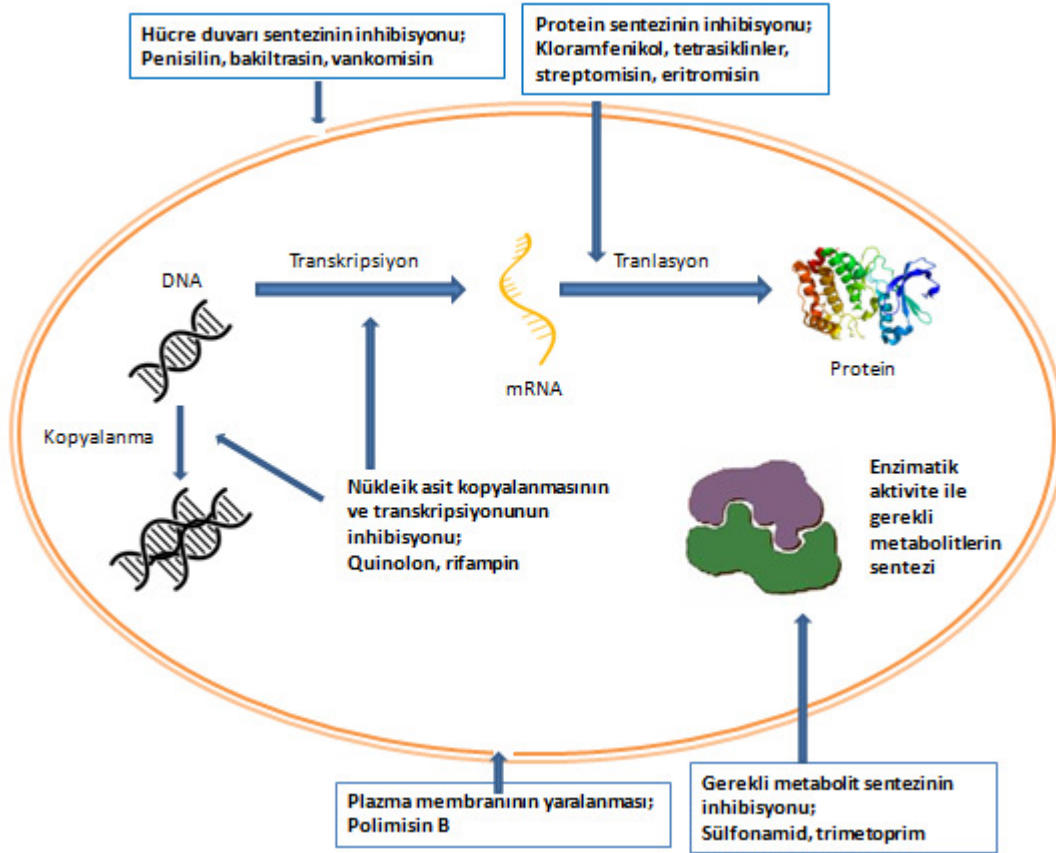
Bakterisitler, bakteri hücrelerini doğrudan öldürürler. Bu gruptaki ilaçlar aşağıdaki gibi sıralanırlar;

- Penisilinler
- Sefalosporinler
- Aminoglikozidler
- Vankomisin
- Rifampisin
- Florokinolonlar
- Polimiksinler
- Teikoplanin

2.1.1.2 Etki Mekanizmasına Göre Antibiyotik Çeşitleri

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre beş farklı grup altında değerlendirilirler. Bunlar;

- Bakteride hücre duvarı sentezini engelleyerek ve otolitik enzimleri aktive ederek etki gösterenler. Bunlara örnek olarak; Beta laktamlar, Glikopeptitler, Sikloserin ve Basitrasin gösterilir.
- Sitoplazma membran geçirgenliğini bozarak etki gösterenler. Bunlara örnek olarak; Polimiksinler, Polienler ve Azoller gösterilir.
- Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etki gösterenler. Bunlara örnek olarak; Aminoglikozidler, Tetrasiklinler, Makrolidler, Linkozamidler, Kloramfenikol, Fusidik asit ve Linezolid gösterilir.
- Nükleik asit (DNA ve RNA) sentezini bozarak etki gösterenler. Bunlara örnek olarak; Kinolonlar, Rifampisin, Metronidazol, Ordinazol ve Tinidazol gösterilir.
- Antimetabolitik etki gösterenler. Bunlara örnek olarak; Sülfonamidler, Dapson, PAS, Trimetoprin, İzoniazid ve Kloroki gösterilir.

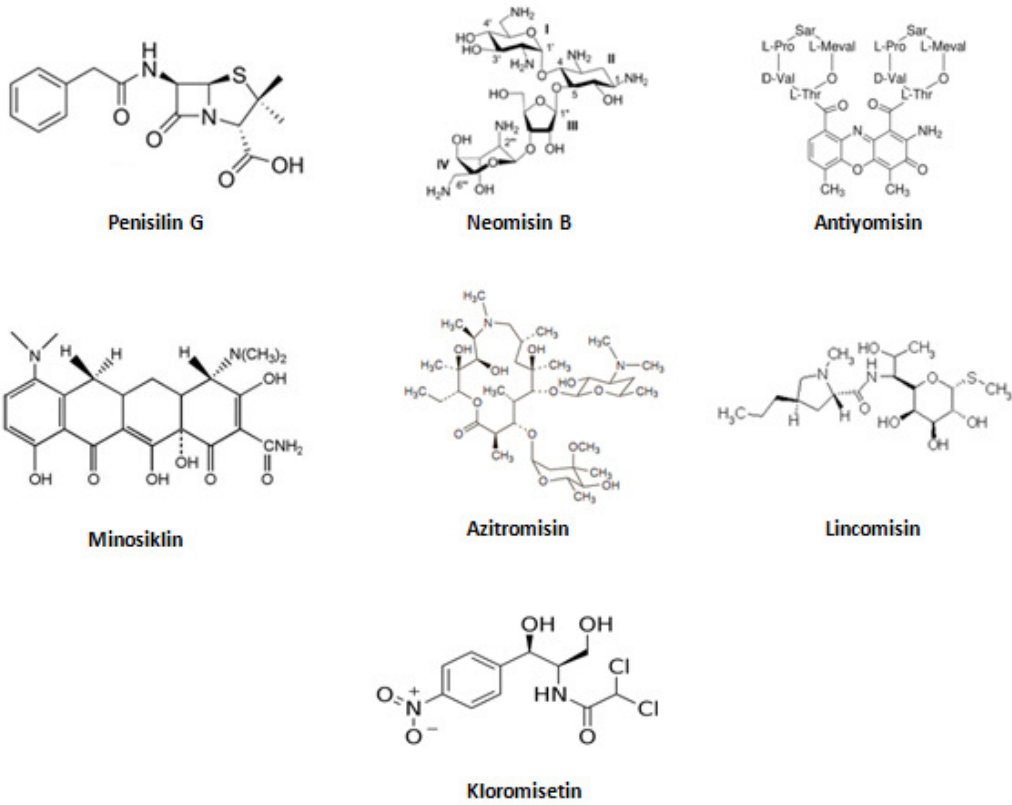


Şekil 2.3. Antibiyotiklerin etki mekanizması.

2.1.1.3. Kimyasal Yapılarına Göre Antibiyotik Çeşitleri

Antibiyotikler kimyasal yapılarına göre sekiz grupta incelenebilirler. Bunlar;

- B-laktam antibiyotikleri
- Aminoglikozid antibiyotikleri
- Tetrasiklinler
- Makrolit antibiyotikler
- Polipeptid antibiyotikler
- Linkomisin grubu antibiyotikler
- Kloramfenikol grubu antibiyotikler
- Çeşitli yapılardaki antibiyotikler



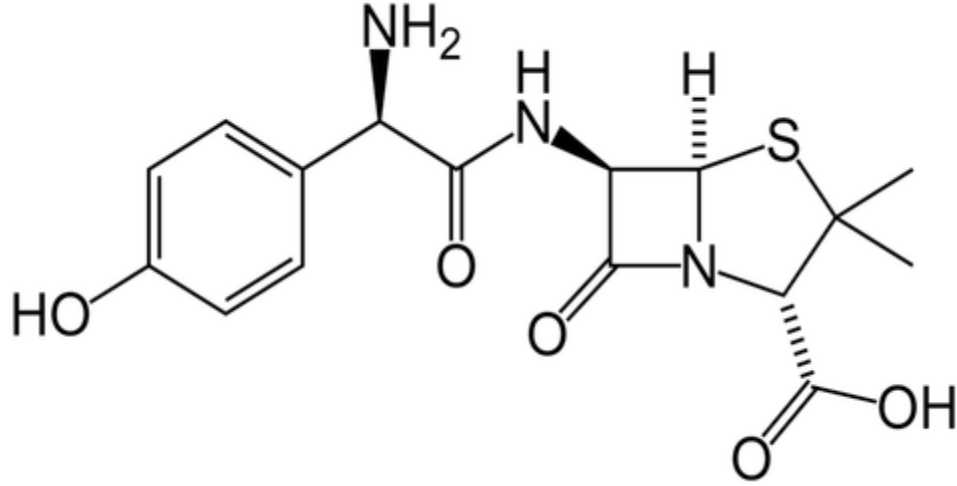
Şekil 2.4. Antibiyotik çeşitlerine örnekler.

2.1.2. Amoksisillin Yapısı ve Özellikleri

Amoksisillin kirli beyaz renkte, hafif aromatik kokulu, tadı acı olan olan kristal tozdur. Bileşiğin trihidrat veya susuz formu hazırlanabilir. Sodyum tuzu parenteral

uygulamalarda kullanılır. Kimyasal sentez veya 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ten yarısentetik yolla elde edilebilir.

Amoksisilin kapalı formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, IUPAC ismi ise (2S,5R,6R)- 6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)-asetil]amino} -3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabisiklo [3.2.0] heptan-24-karbosiklik asit şeklindedir. Molekül ağırlığı 365.4 g/mol olan amoksisilin; suda ve alkolde az çözünür, kloroform ve eterde çözünmez [13].



Şekil 2.5. Amoksisilin yapısı.

Amoksisilinler B Laktam grubu antibiyotiklerin penisilin türevi olan aminopenisilin grubunda yer alır. Yapısında biri azot, üçü karbon olan dört üyeli heterosiklik B-Laktam halkası içeren antibiyotiklere B-Laktam antibiyotikleri adı verilir. Aminopenisilinler, benzilpenisilin yan zincirinin α -karbonu üzerine amino grubu getirilmesi sonucu oluşan türevleridir. Aminopenisilinleri penisilin grubu B-Laktam antibiyotikleri içerisinde en çok kullanılan gruplardan birisidir.

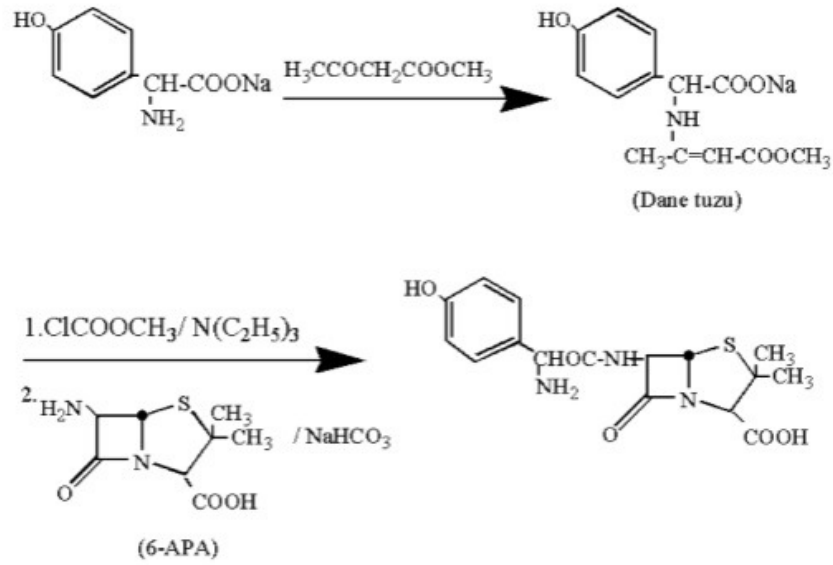
Günümüzde penisilin türleri antimikrobik spektrumları; farmokinetik ve kimyasal özellikleri bakımından beş grupta toplanır.

- Penisilin G ve depo türevleri
- Aside dayanıklı penisilinler
- Anistafilokokal penisilinler
- Geniş spektrumlu penisilinler
- Antipsödomonal penisilinler

Amoksisilin bu grupta geniş spektrumlu penisilinler grubunda yer almaktadır. Genel olarak bu penisilinler; gram-pozitif ve gram-negatif koklara karşı penisilin G'ye yakın derecede etkin, antisafilokokal penisilinlere göre çok daha yüksek etkinliğe sahip ilaçlardır.

2.1.2.1. Amoksisilin Elde Edilişi

Amoksisilin de içinde bulunduğu aminopenisilinlerin elde edilebilmesi için asit bileşenin taşıdığı amin gruplarının öncelikle korunması sonra da 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ile bağlanması gerekir. Bunun için de D-fenilglisin, D-(4-hidroksifenil) slisin ve D-(1,4-dehidrofenil) glisinin amin grupları metil asetilasetat ile tepkimeye sokularak korunur. Oluşan bu ürünün sodyum tuzuna Dane tuzu denilmektedir. Daha sonra metil kloroformat ve trietilamin varlığında 6-APA ile tepkimeye sokulur [9].



Şekil 2.6. Amoksisilin elde edilme tepkimesi.

2.1.2.2. Amoksisilin Farmakinetik Özelliği ve Klinik Kullanımı

Aminopenisilin grubunda yer alan ampisilin ve amoksisilin oral ve damar yoluyla kullanılabilirken, oral yolla kullanılabilen bakampisilin ise bir aminopenisilindir. Biyo-yararlanım bakımından Ampisilin etkisi, amoksisilin ve bakampisiline göre daha düşüktür. Ampisilin oral alımdan sonra %30 emilir ve gıdalarla kullanımda emilimi azalmaktadır. Vücuda dağılım özelliği uygun niteliktedir. Yeterli terapötik

derişimde asit, plevral, sinoviyal ve oküler sıvılara ulaşır. Ancak enflomasyon olmadıkça BOS'a geçiş zayıftır.

Amoksisilin ise %90 emilir ve gıda ile kullanımda emilimde herhangi bir farklılaşma görülmez. İnce bağırsak kanalında antibiyotik kalıntısı azdır. Çünkü amoksisilin bağırsaklardan hızla emilebilmektedir. Bu yüzden de antibiyotik nedenli ishal daha az görülür. Oral yolla kullanılan amoksisilin, ampisiline kıyasla çok daha iyi bir biyo-yararlanım oluşturur. Ampisilinin aynı dozuna kıyasla 2-2.5 kat daha yüksek serum ilaç derişimi özelliği göstermektedir. Penisilin G'ye kıyasla *L. monocytogenes* ve *E. faecalis*'e karşı oldukça etkilidir. Bu etkisi nedeniyle aminoglikozitlerle birlikte tercih edilir. Amoksisilin, ampisilin ile eşdeğer doku dağılımına sahiptir. Bu nedenle; otitismedia, pnömoni, sinüzit, bronşit, tifo, kulak-burun-boğaz ve üriner sistem enfeksiyonlarında günümüzde de kullanımı önerilen bir antibiyotiktir [14].

2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Bir düşünceye göre sudaki yüzeyler ve non polar moleküller arasındaki olağandışı güçlü etkileşim olarak hidrofobite tanımlanmıştır. Temas halindeki iki metan molekülü için sudaki etkileşim enerjisi vakumdaki van der Walls etkileşim enerjisinden altı kata kadar daha büyüktür. Daha az düzenli su moleküllerinin iki komşu hidrofobik yüzey üzerinde düzenli hale geçmesinden kaynaklı gerçekleşen ekstrüksüyon, eş zamanlı entropi artışıyla enerji doğurmaktadır. Bu enerjinin iki metan molekülü için 8.5 kJ/mol olduğu tahmin edilmektedir. Su içerisindeki polar olmayan gruplar arasında oluşan bu entropi odaklı etkileşim hidrofobik etkileşim kromatografisinin (HEK) temelini oluşturur. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde analizi yapılacak hedef molekül, immobilize hidrofobik grup taşıyan apolar sabit faz üzerinde adsorplanır.

2.2.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Tarihi ve Gelişimi

1962 de proteinlerin hidrofobitesinin aminoasitlerin hidrofobik etkisinden kaynaklı olduğu üzerinde fikir birliğine varıldı. [15, 16] Hidrofobite çeşitli olası yollarla ve ölçümlerle tahmin edilmiştir. Bunlar; ortalama hidrofobite [17], polar olmayan zincir frekansı [18], polarite oranı [19] ve net hidrofobitesidir [16]. Proteinin kromatografik saflaştırılması için spesifik olan ilk dolgu maddesi Yon ve Shaltiel tarafından

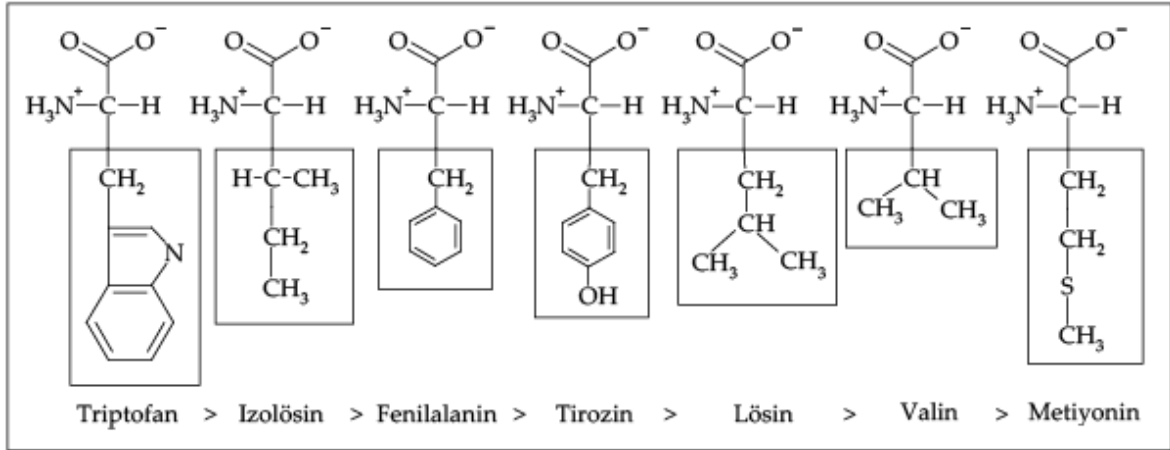
1972'de sentezlendi. İlk geliştirilen hidrofobik matris aminoalkan türevlerinin CNBr yöntemi ile birleştirildiği agarozdan oluşturulmuştur.

1973 yılında Hjerten tarafında ilk Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi tanıtıldı [20, 21]. Aynı yıl Porath'ın grubu tarafından tamamen yüklenmemiş hidrofobik jeller sentezlendi. İlerleyen yıllarda hidrofobik etkileşim üzerine çalışmalar artarak devam etti. HEK'deki protein tutunmasının, protein yüzeyindeki hidrofobik noktaların dağılımından önemli ölçüde etkilendiği tespit edildi [22].

2.2.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Temelleri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi mekanizmasının açıklanmasının arkasında üç ana teori bulunmaktadır. Bunlar; salting-out teorisi, termodinamik teori ve yüzey gerilimi veya van der Waals kuvvetleri teorisidir. Hidrofobik etkileşimin arkasındaki ana güçlerden biri van der Waals kuvvetleridir. Biyomoleküller, protein ve peptitler kendi yapılarındaki hidrofobik grupların, dolgu malzemesinde bulunan hidrofobik gruplar ile etkileşimi sonucu ayrılır ve saflaştırılır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ayırımın yapıldığı dolgu maddesi, yapısında hidrofobik bir ligand veya grup bulundurmalıdır. Aynı şekilde kromatografi pazarının büyük bir kısmına sahip olan ters faz kromatografisinin temelini de yapısındaki hidrofobik gruplar ve bu grupların yapmış olduğu etkileşim oluşturur. Bu dolgu malzemesi polar olmayan sıvı fazları tutabilen çok yüksek hidrofobitesi olan bir destek sunar. Yüksek hidrofobitesi destek proteinlerle olan etkileşimi de fazlaştıran, proteinin tekrardan destek maddesinden ayrılması için farklı çözücü kullanılmasının yolunu açar. Ters fazın hidrofobitesinden kaynaklı bu sıkıntı denatürasyon sebebidir. İşte bu nedenden dolayıdır ki HEK özellikle protein saflaştırması için anahtar bir teknik olarak görülmektedir. Proteinlerin hidrofobitesi yapılarında bulunan aminoasitlerin hidrofobisiteleri ile doğrudan ilişkilidir. Aminoasitlerin hidrofobisiteleri suda ve fenol gibi organik çözücülerdeki kendi çözünürlük değerlerinin hesaplanmasıyla bulunmuştur [23].

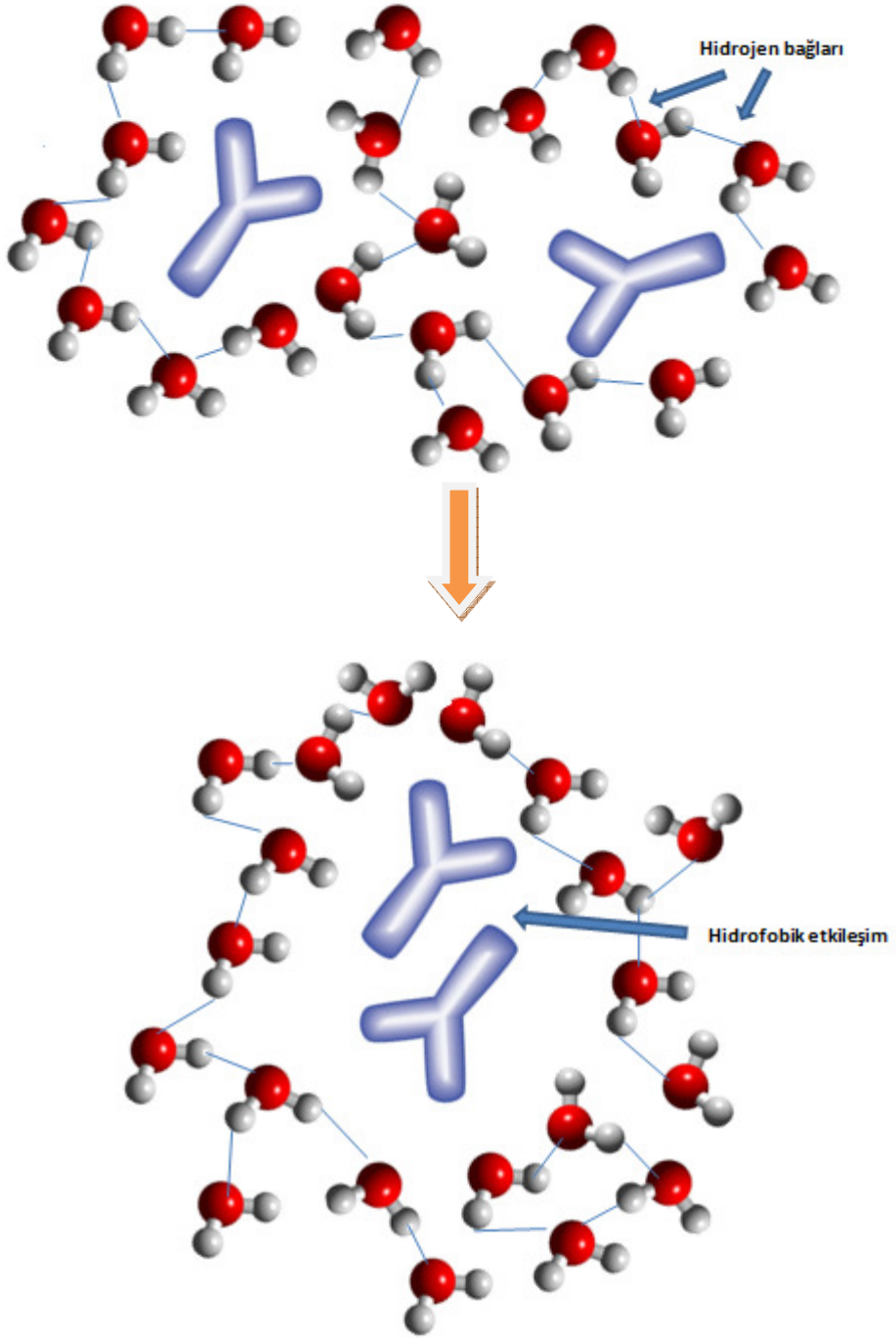
Şekilde bazı aminoasit gruplarının hidrofobisite gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Aminoasit gruplarının hidrofobisite sıralaması [24].

HEK için önerilen teorilerin merkezini tuz ve tuzun etkisi oluşturur. Bir çok çalışma bu etken üzerine gerçekleştirilmiştir. Porath, jel üstüne adsorplanan proteinlerin ters tuz davranışlarını göstermiştir. İyon değiştiricilerin aksine proteinler yüksek tuz derişimlerinde bu jellere uygulanmış ve iyonik etkiyi azaltarak elüe edilmiştir (negatif tuz gradienti). Bu tuz numunenin çözünürlüğünü azaltır. Çözünürlüğün azalmasıyla beraber serbestleşen hidrofobik bölgeler adsorbe edilir. Moleküldeki hidrofobisite arttıkça, hidrofobik etkileşimi teşvik etmek için kullanılan tuz miktarı azalır. Genelde azalan tuz gradienti artan hidrofobisiteye göre kolondan hedef melokülleri çıkarmak için kullanılır.

Hidrofobisite, esasen suyu sevmeme şeklinde de tercüme edilebilir. Hidrofobik etkileşim sürecindeki mekanizmayı ise entropi prosesi açıklar. Su moleküllerinin hidrojen bağı yapma istekleri vardır. Eğer su molekülleri hidrofobik bir yüzey ile karşılaşır, hidrojen bağı yapamadığı için yüzeyin etrafını sararak, muntazam bir tabaka oluşturur. Tabakanın incilmesi entropideki (ΔS) artışı da beraberinde getirerek, termodinamik kararlılık için iki hidrofobik yüzeyin birlikteliğini ortaya çıkarır. İşte bu olay hidrofobik etkileşiminin çıkış noktasıdır.



Şekil 2.8. Hidrofobik etkileşim.

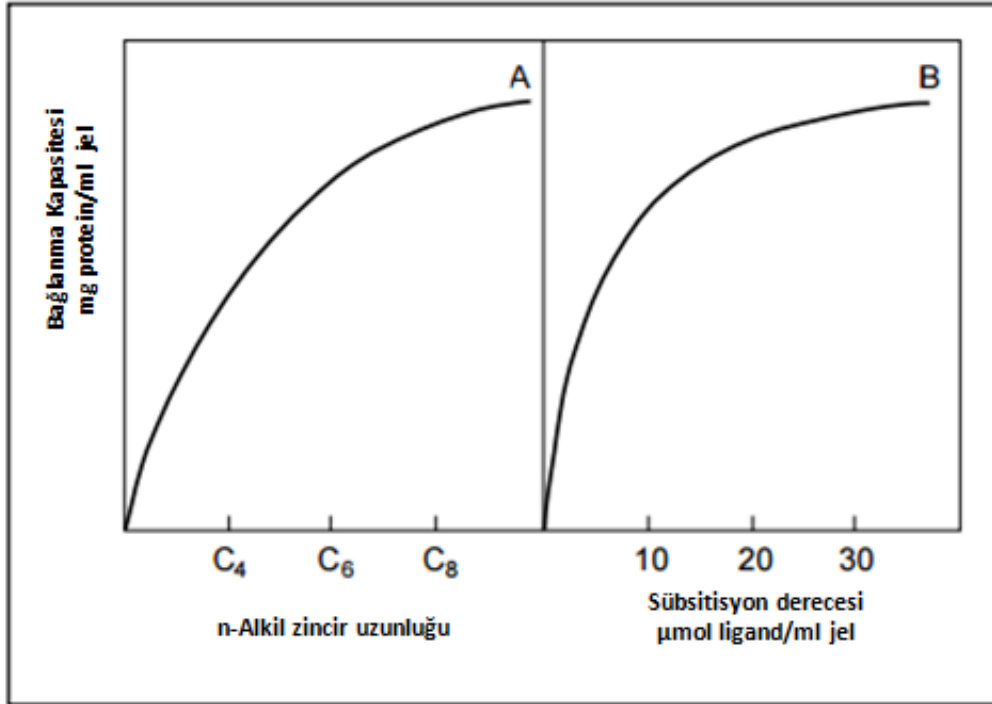
HEK'de dolgu malzemesi polimer bir hidrofilik iskelet ve bu iskelete bağlanmış hidrofobik gruplardan oluşur. Dolgu malzemesinde akış ile beraber hedef moleküldeki hidrofobik bölgeler, iskelettteki hidrofobik bölgeler ile etkileşime girerek adsorpsiyon ve saflaştırma sağlanmış olur.

2.2.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Etkenleri

HEK'deki tuz derişimi, pH, sıcaklık, kullanılan ligand türü, kolon dolgu malzemesi gibi bir çok parametre analizi doğrudan etkileyebilmektedir. En iyi sonuç için optimum koşulların sağlanması gereklidir.

2.2.3.1. Ligand Çeşidi

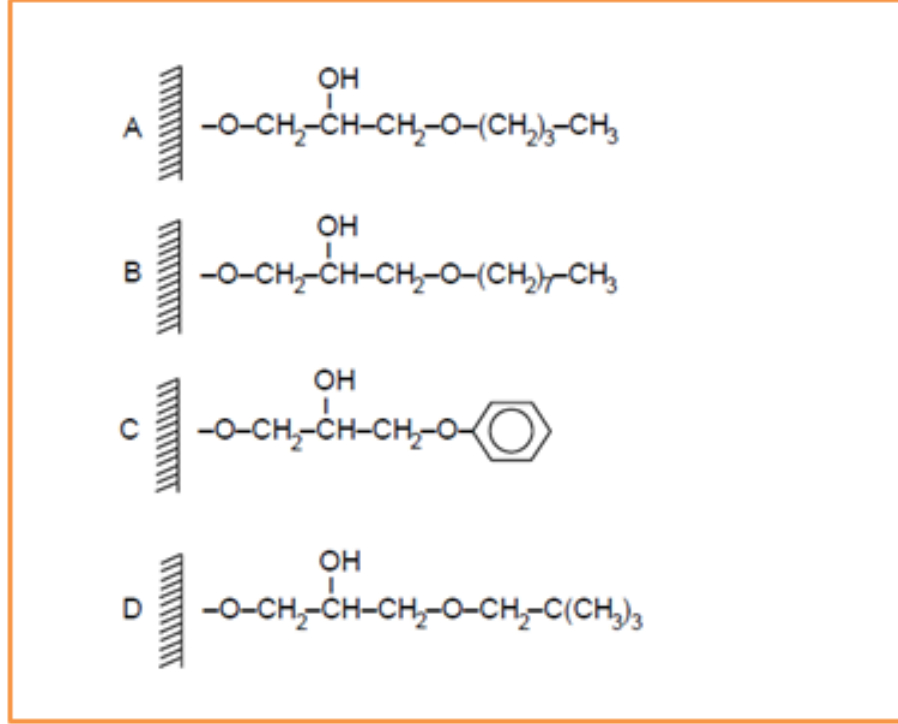
Bir biyomolekülün adsorpsiyon davranışı, immobilize ligandın türüne göre belirlenir. Genellikle düz zincir alkil ligandlar saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlar aromatik (π - π etkileşimi) ve hidrofobik etkileşimleri gösteren bir karaktere sahiptir [25]. Alkil zincirinin uzaması hidrofobik etkinin artmasına sebep olur. Alkil zincir uzunluğunun bağlanma kapasitesine etkisi, zincir uzunluğu arttıkça artarken bir noktadan sonra bu artış sabit bir seyir sergileyecektir. Alkil zincir uzunluğu ve sübstitüsyon derecesi benzer özellik göstermektedir.



Şekil 2.9. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde alkil zincir uzunluğunun ve sübstitüsyon derecesinin bağlanma kapasitesine etkisi [26].

Alkil ve aril ligandları arasındaki seçim ampiriktir. Bu nedenden dolayı deneysel yöntemler uygulanarak yapılacak olan analize en uygun ligand seçilmelidir.

Aşağıda bazı HEK ligandlarının şematik gösterimi verilmiştir. Şekil 2.10.'da gösterilen fenil grupun π - π etkileşimi yapabilme kapasitesi de varken, diğer tüm gruplar sadece hidrofobik etkileşim yapabilme potansiyeline sahiptirler.

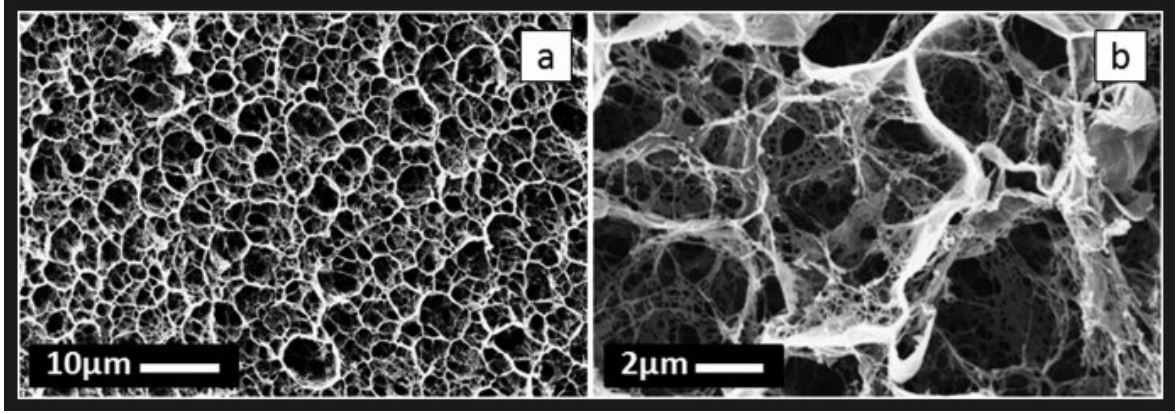


Şekil 2.10. Agaroz matrikse bağlanmış farklı hidrofobik gruplardan örnekler [27].

İmmobilize ligandın süstitüsyon derecesinin artışı, bağlanma kapasitesini de artırır. Ligand süstitüsyon derecesinin artması sonucu bağlanma kapasitesi bir noktadan sonra sabit kalır. Fakat etkileşim afinitesi artar [28]. Özellikle bu koşullar altındaki proteinlerin çok noktalı bağlanma yapmasından kaynaklı, elüe edilmeleri zordur [29].

2.2.3.2. Matris Çeşidi

Matrisin katkısını gözden kaçırmamak gereklidir. En çok kullanılan iki destek maddesi güçlü hidrofilik karbohidratlar (çapraz bağlı agaroz gibi) ve sentetik kopolimer malzemelerdir. Aynı ligand türünün sentetik kopolimer ve çapraz bağlı agaroz destek üstündeki seçiciliği aynı değildir. Agaroz bazlı matriste bir kopolimer destekteki gibi sonuçların elde edilmesi için adsorpsiyon ve elüsyon koşullarını değiştirmek gereklidir.

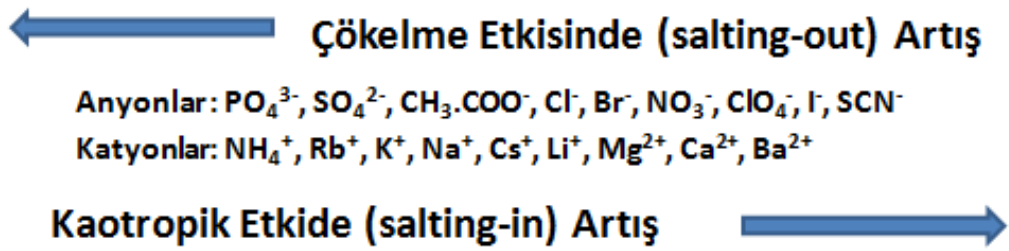


Şekil 2.11. Agaroz matris [30].

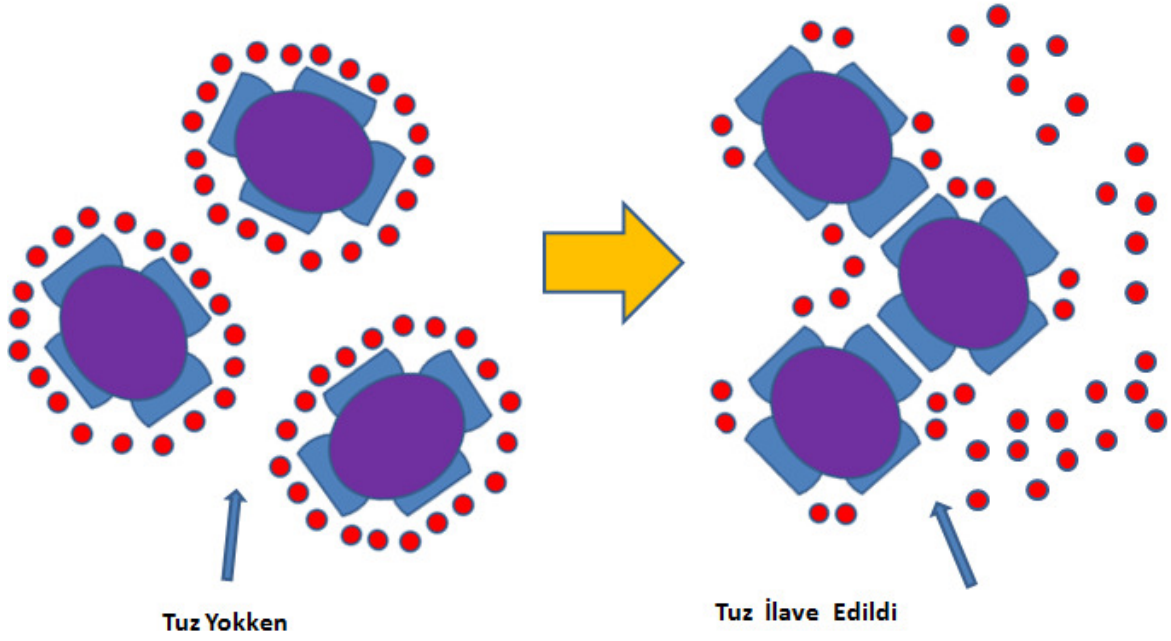
2.2.3.3. Tuz Derişiminin ve Türünün Etkisi

HEK'de örnek çözelti ve dengelenme tomponuna çeşitli tuzların (salting-out) eklenmesi, ligand protein etkileşimini teşvik eder [31]. Tuz derişiminin artması, bağlanan protein miktarının spesifik tuz derişimine kadar doğrusal bir şekilde artmasını sağlarken, yüksek derişimlere devam edilmesi bu artışı üstel bir hale sokar. Yüksek iyonik şiddette, protein çökmesi gözlenebilir.

Şekil 2.12.' de Holfman serisi bazı anyon ve katyonların protein çökmesi üstündeki etkilerini göstermektedir.



Şekil 2.12. Hoffman Serisi.



Şekil 2.13. Tuz etkisi.

Sodyum, potasyum ve amonyum sülfat yüksek çöktürme etkisine sahip olmasına rağmen, bu tuzlar hidrofobik etkileşimi teşvik eder. Nötral pH'lardaki su ve seyreltik tampon ile bağlı biyomoleküller elüsyon edilir.

Adsorpsiyon kapasitesindeki önemli artış, tuz derişiminin çökeltme sınırının üzerine çıkmasıyla görülebilir. Yüksek tuz derişiminde biyomoleküllerin çöktürülmesine salting out denilir. Bu işlem biyomoleküllerin çözünürlüğünü azaltır fakat yapılarında herhangi bozulmaya sebebiyet vermez. Düşük tuz derişiminde biyomoleküllerin çözünmesine ise salting in adı verilmektedir.

2.2.3.4. pH etkisi

pH'ın hidrofobik etkileşim kromatografisi üstündeki etkisini göz önünde bulundurmak gerekir. Genel olarak, pH'ın artması hidrofobik etkiyi azaltıcı şekilde sonuçlar doğurur. Muhtemelen yüklü grup titrasyonunun artmasının bir sonucu olarak, proteinlerin hidrofilitliğinde bir artma oluşur. Bu artış proteinden proteine farklılık gösterir. Başka bir ifade ile pH'ın düşmesi hidrofobik etkiyi artırıcı bir etmen oluşturmaktadır. Böylelikle nötral pH'larda bağlanamayan molekül, asidik pH'larda bağlanmayı gerçekleştirir [32]. HEK'de hareketli fazlar genellikle pH 5-7

aralığında ve sodyum veya potasyum fosfat tamponu halindedir. Elüsyonda genel olarak pH gradienti kullanılmaz.

2.2.3.5 Sıcaklık Etkisi

Hidrofobik çözünen maddelerin su içindeki etkileşimi için geliştirilen teorilere dayanarak, [36] Hjerten HEK adsorbentine proteinin bağlanması entropi tarafından gerçekleştirilen bir süreç olduğunu söylemektedir ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Bu denklem ile birlikte sıcaklıkta artış, etkileşimin artmasına sebep olur sonucunu çıkartmaktadır. Deneysel kanıtlar Hjerten [34] ve Jenissen [35] tarafından gösterilmiştir. Hidrofobik etkileşimine katkıda bulunan van der Waal's kuvvetleri de sıcaklıktaki artışın sonucu olarak artmaktadır [36]. Visser ve Strating [37] tarafından karşı bir etkileme rapor edilmiştir. Bu da HEK'de sıcaklık etkisinin karmaşık bir nitelik taşıdığını belirtir. İki zıt görüşün olmasının muhtemel nedeni sıcaklığın farklı proteinlerin yapısal durumuna ve sulu çözeltilerdeki çözünürlüklerine maruz bıraktığı farklı etkilerden kaynaklanmaktadır.

Gerçekte bakıldığında oda sıcaklığında geliştirilmiş aşağı akışlı bir saflaştırma işleminin soğuk ortamda tekrar üretilmeyeceğinin veya tam tersi işlemin yapılamayacağını bilincinde olmak gereklidir.

2.2.3.6. Katkı Maddeleri

HEK'de kullanılan sulu çözelti halindeki kaotrapik (salting in) tuzlar, deterjanlar ve su ile karışım yapabilen alkollerin düşük derişimli halleri; bağlı çözünenlerin desorpsiyonuna neden olduğu için hidrofobiteyi azaltır. Deterjanlar ve alkollerin apolar bölgeleri, dolgu malzemesi üzerindeki adsorpsiyon noktaları için afinite halindeki biyomoküllerle etkin bir yarışmaya girerek, biyomoleküllerin afinite bölgesindeki yerinden çıkmasına neden olur. Su ve afinite halindeki biyomoleküllerin düzenli dizilimi kaotrapik tuzlar tarafından bozulur. Katkı maddeleri suyun yüzey gerilimini düşürür. Yüzey geriliminin düşmesi hidrofobik etkiyi azaltarak ligand-biyomolekül arasındaki afinitenin bozulmasına neden olur.

Çizelge 2.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde bazı çözücülerin fiziksel özellikleri [38].

Çözücü	Viskozite (cP)	Dielektrik Sabiti	Yüzey Gerilimi (dyne/cm)
Su	0.89	78.30	72.00
Etilen Glikol	16.90	40.70	46.70
Dimetil Sülfoksit	1.96	46.70	43.54
Dimetil Formamit	0.796	36.71	36.76
n-propanol	2.00	20.33	23.71

Desorpsiyon esnasında seçiciliği etkilemek için elüsyon tamponu içerisinde katkı maddeleri kullanılabilir. Ancak biyomoleküllerin bu tür kimyasalların yüksek derişimlerine maruz bırakılarak denatüre olabileceği veya etkisini kaybedebileceği riski bulunmaktadır. HEK kolonlarının temizlenmesi ve rejenerasyonunda katkı maddeleri kullanmak etkili sonuçlar ortaya çıkaracaktır.

2.3. Monolitler

Yunanca dilinden günümüze gelen monolit, kelime olarak yekpare, bir taş, tek bir parça şeklinde tercüme edilmektedir. Monolitik kolonlar yekpare şekilde gözenekli organik polimer veya silikadan oluşmaktadır. Bu birbirine bağlı halde bulunan destek yapısı geleneksel partikül dolgulu kolonlardan farkını ortaya koymaktadır. Monolitin yekpare yapısında bir takım avantajlar karşımıza çıkmaktadır. Bu avantajlar; kolay hazırlanma yöntemi, farklı pH'lara karşı direnç, düşük geri basınç, frite ihtiyaç duymaması ve partikül kolonlara göre yüksek geçirgenliğe sahip olması şeklinde sıralanabilir [39].

Monolitik kolonlar birçok kromatografik ayırma tekniklerinde kullanılmasının yanında son zamanların popüler araştırma konularından olan moleküler baskılama tekniğinde kullanılmaya da oldukça elverişlidir. Ayırma tekniklerinin dışında numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemlerinde de monolitik yapı kullanılmaktadır.

2.3.1. Monolitik Yapılı Kolonların Tarihi

Robert Synge 1950'lerde monolit tarzındaki yapılara atıfta bulunan ilk kişidir. 1967'de Kubin ve arkadaşları poliüretan köpükten boyut dışlama kolonları geliştirmiştir [40]. 1970'lerin başlarında Ross ve arkadaşları GC ve HPLC'yi

poliüretan köpük ile tanıştırdı [41]. 1979'da ilk sürekli, gözenekli silika bazlı köpükler GC için kromatografik destek olarak öne sürüldü. Bu yapıyı oluşturan sürfektantlar tanımlanamadığı için kromatografik olarak değerlendirilemedi. 1989'da Hjerten ve arkadaşları sürekli yataklar olarak ifade ettikleri şişmiş, sıkıştırılmış, yumuşak jelleri araştırdılar [42]. Köpük ve yumuşak jeller yüksek akışlardaki basınçlara dayanamıyorlardı. Analiz hızları bu durumda kısıtlanıyordu. Svec ve Frechet 1990'da bu soruna gönderme yaparak kapiler elektrokromatografi için katı, polimer monolitleri bilim dünyası ile tanıştırdı [43]. Nakanishi ve Soga HPLC'de kullanılacak gözenekli silika monolitler için bir teknik geliştirdi [44]. Bu monolit yüksek geçirgenliğe, gözenekli yapıya ve dar gözenek dağılımına sahipti. Fakat zorluklar 1996'ya kadar gelişmeleri erteledi. 1996'da silika bazlı monolitler için ikinci bir yöntem öne sürüldü. 2000 yılında Nakanishi'nin yöntemi temel alan silika bazlı monolitik HPLC kolonları ticari olarak satışa sunuldu. 1996 yılı monolitik teknolojilere olan ilginin hızlı büyümeye başladığı yıl olarak gösterilmektedir.

Günümüzde ticari olarak da satılan monolitik kolonlar özellikle kirli numunelerde, pomat, şurup, plazma gibi viskoz matrislerde kullanılmakta ve oldukça iyi sonuçlar vermektedir.

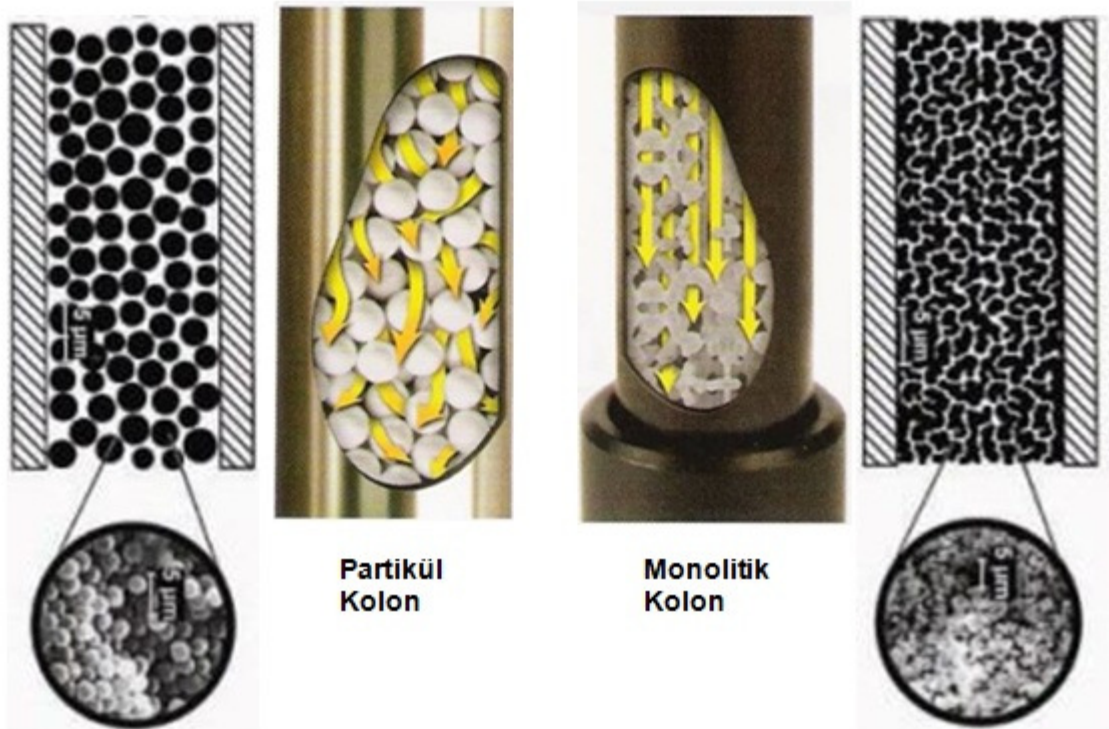
2.3.2. Monolitik Yapılı Kolon Dolgu Malzemeleri

Monolitler partikül yapıları kolonlara kıyasla birtakım avantaja sahiptirler. Partikül kolonlarla alakalı başlıca problem, partiküller arasında var olan boş hacimlerdir. En iyi partikül kolonlarda bile %35-40 oranında boş hacim vardır [45]. Bu bandın genişlemesine ve verimliliğin düşmesine neden olur [46]. Monolitler yekpare yapıdan oluştuğu için partiküller arası boşluğa bağlı bant genişlemesinin etkisi ortadan kalkmaktadır. Partikül bazlı kolonlarda analit partikülün iç gözeneklerine doğru difüzlenmektedir, bu ayırma hızını yavaşlatıcı bir etki oluşturmaktadır. Bu etkinin oluşmaması monolitik kolonların avantajlarından bir diğeridir [47]. Partikül kolonlarda ayrılma difüzyon hızına bağlıdır ve bu büyük moleküller için yavaş ve olumsuz bir etki oluşturmaktadır. Monolitlerde elüent monolit gözenekleri boyunca akmaya zorlanır ve bu kütle aktarım hızını artırır [48]. Analitin, eluent ile sabit faz arasındaki kütle aktarımı hızlı ve sürekli olmalıdır. Monolitik yapı analitin bu kütle aktarımını destekleyici etki göstermektedir. Aynı zamanda elüent ile sabit

faz sürekli bir etkileşim ortamı sağlandığı için yüksek akışlar kullanıldığında bile kütle aktarımının artması sağlanmış olur.

Partikül kolonlarda akış düfüzif etki gösterip kıvrımlar yaşarken, monolitik kolonlarda akış doğrusal şekilde olmaktadır. Bu lineer etkiyi farklı geometrik şekillerden oluşmuş kanal yapısı sağlamaktadır. Bünyesindeki farklı boyuttaki gözenekli yapıları sayesinde yüzey alanı da arttığı için seçiciliği yüksektir. Aynı zamanda gözenekli yekpare yapısından kaynaklı geri basıncı da düşüktür. Monolitler farklı gözenek büyüklükleri, farklı yüzey alanları, farklı uzunluk ve çaplarda üretilebildikleri için seçicilikleri de arttırılıp, azaltılabilir. Yüksek akış hızlarında bile seçicilik yüksektir. Yüzey alanları geniştir ve kısa analiz sürelerine sahiptirler.

Kromatografi için polimer ve silika bazlı monolitik kolonlar bulunmaktadır.



Şekil 2.14. Partikül ve Monolitik kolon karşılaştırması [49, 50].

2.3.3. Monolitlerin Yüzey Alanı ve Gözenek Özellikleri

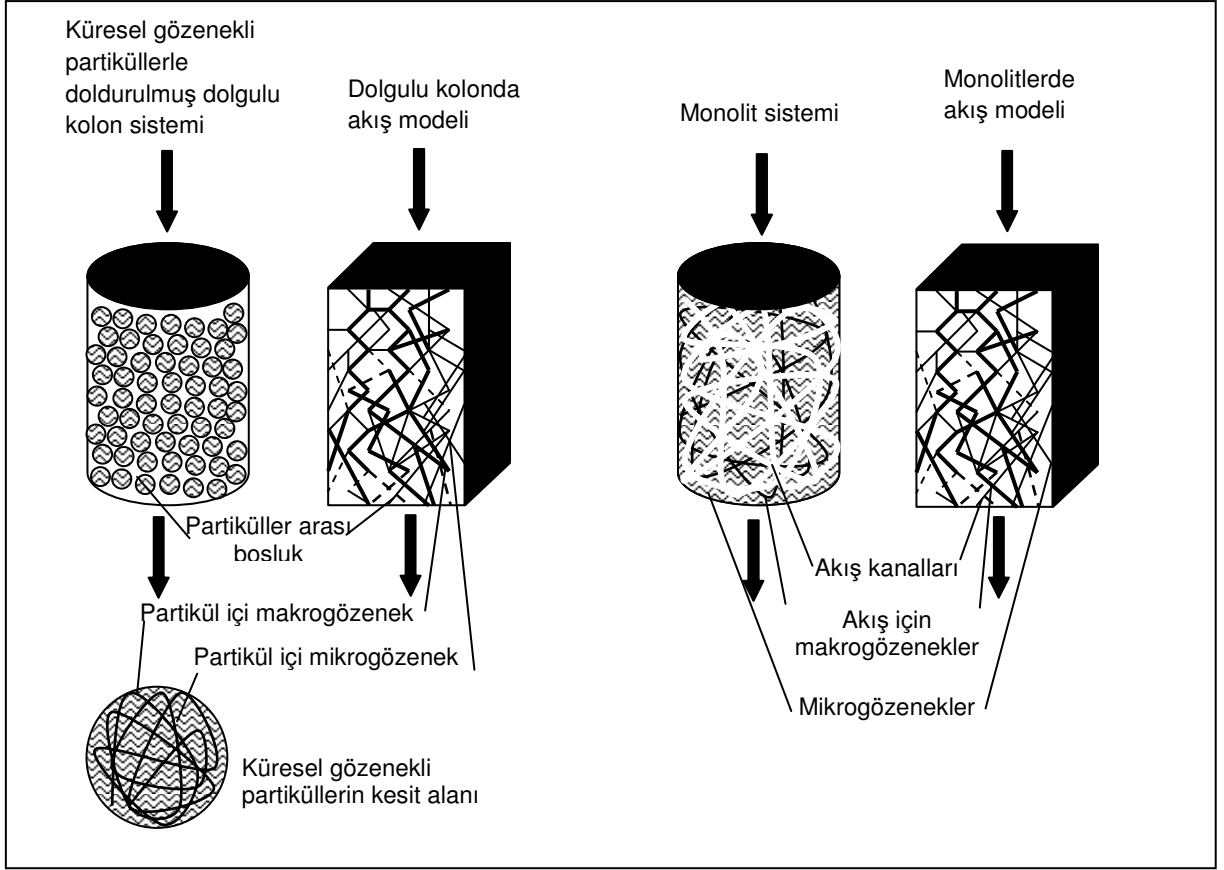
Monolitik kolon kullanımındaki esas ayırt edici noktalardan biri yüksek akış hızlarına karşın, düşük geri basınç özelliği görebilmektir. İşte bu yüzden ki

UPLC sistemlerine düşman olarak doğmuş bir kolon şeklinde pazarlama faaliyetleri sürdürülmektedir. Yüksek akış hızlarına çıkabilmek dayanıklı ve sağlam bir gözenek yapısının oluşturulmasıyla elde edilir.

Monolitik kolonlarda gözenek yapıları boyutsal olarak 3 farklı başlık altında incelenebilir. Gözenek yapılarının boyutlarının değişmesi aynı zamanda bu gözeneklerin işlevlerinin değişmesi anlamına da gelmektedir. Makro gözenek, mezo gözenek ve mikro gözenek şeklinde boyutsal bir ayırım söz konusudur. Monolit içerisinde makro gözeneklerin ortalama büyüklüğü 2µm'dir. Makro gözeneklerin esas amacı ise yapı desteğinde büyük kanalları oluşturarak akışın hızlı ve istenilen bir şekilde geçebilmesini sağlamaktır. Mezo gözeneklerin ortalama büyüklükleri 10-13nm arasındadır. Monolit içerisindeki esas görevleri ise monolitik desteğin yüzey alanını genişleterek adsorbsiyon yapılabilecek bölge sayısını arttırmaktır [51]. Yüzey alanının genişlemesi seçiciliği doğrudan etkileyen bir parametredir. 2nm ve daha küçük ölçekli gözenekler mikro gözenekler olarak sınıflandırılır. Mikro gözenekler nispeten büyük moleküllerin adsorblanacağı yüzey alanını azaltır ve kinetiği düşürür [52].

Monolitlerdeki bu gözenekli yapı akış tarafından gerçekleşen iletimle kütle aktarımını sağlar. Partikül kolonlarda ise bu kütle aktarımı, partiküldeki gözeneklerin içerisindeki difüzyonla gerçekleşmektedir (Şekil 2.14) [53].

Genel olarak monolitler %80'den fazla gözenekli yapıya sahiptirler ve yüzey alanları ortalama 300m²/g değerindedir [54]. Monolitlerin bu gözenek yapısı, sentez basamaklarında kullanılan yöntemle yakından ilişkilidir. Öyleki polimerizasyon sıcaklığı, gözenek oluşturucu çözücü miktarı, çapraz bağlayıcı ve monomer oranları gözenek boyutuna direk olarak etki eden parametrelerdir [55].



Şekil 2.15. Partikül ve Monolitik kolon karşılaştırması; dolgu kolon ve monolit sistemlerin gözenek ağ modelinin şematik gösterimi [56].

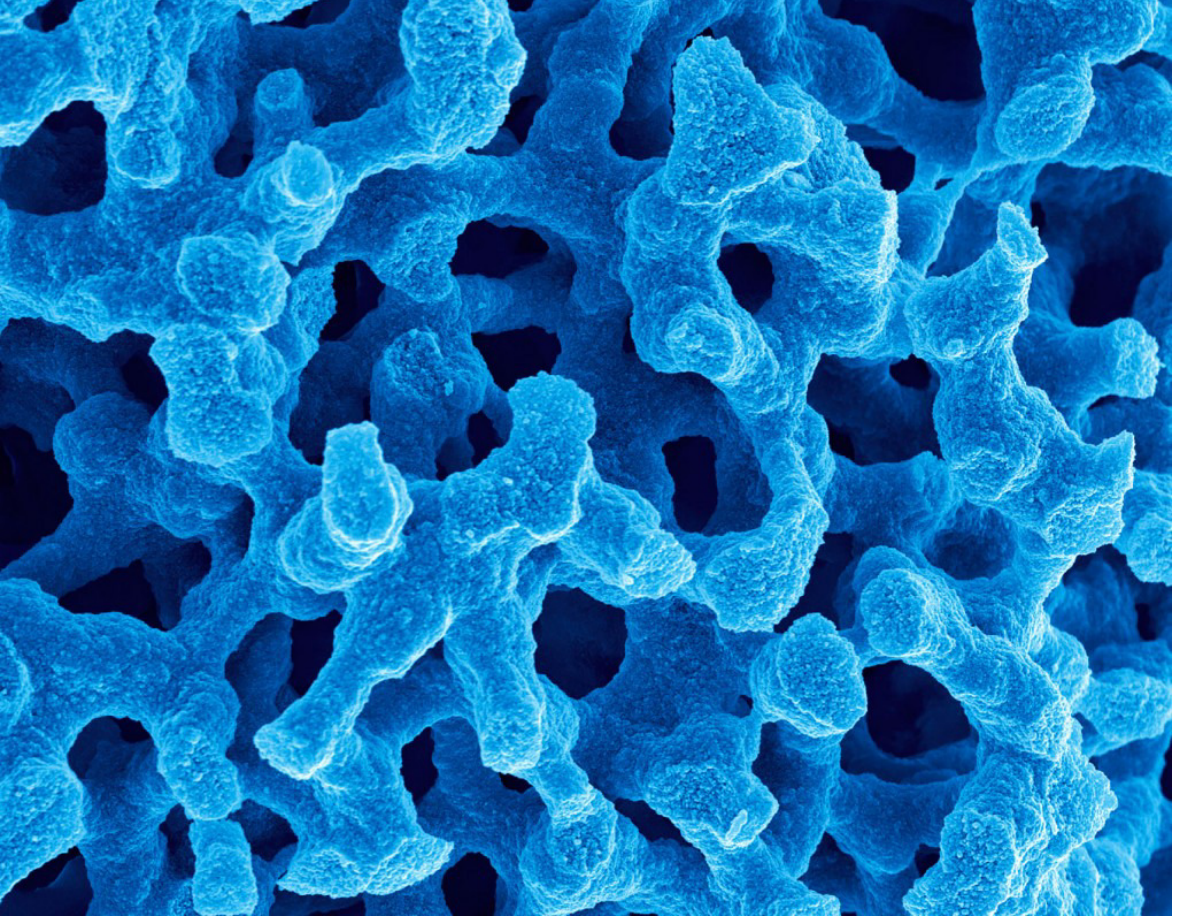
2.3.4. Monolitlerin Türleri

Günümüzde kromatografi sektöründe iki ana çeşit üzerinde monolitik materyal üretimi ve geliştirilmesi yapılmaktadır. Bu iki ana çeşidi silika bazlı monolitik kolonlar ve polimer bazlı monolitik kolonlar oluşturmaktadır. Her iki yapı üstünde araştırma ve geliştirme çalışmaları yapılmasına rağmen, inorganik matris üzerinde araştırmalar da yoğunlaşmıştır.

2.3.4.1. Silika Monolitler

Gözenekli silika partikül hazırlamak için ardaşık hidrolizli sol gel yöntemi ve organo silika bileşiklerin polikondenzasyonu kullanılmaktadır [57, 58, 59]. Silika monolitlerde ise tepkime karışımı silika içeren bir birleşik, suda çözünen bir gözenek yapıcı ve asetik asitten oluşmaktadır. Gözenek yapıcı madde makro gözenekleri oluşturur. Oluşan makro gözenekler TMOS (tetrametil ortosilikat)

içeren ethanol su çözeltisi ile yıkanarak mezo gözeneklere dönüşür. Bu üretim patenti Merck firması tarafından alınmış ve ticarileştirilmiştir.



Şekil 2.16. Tipik bir monolitik kolondaki gözenek yapılarının SEM görüntüsü [60].

Yukarıdaki gözenekli yapı silika bazlı bir monolitik kolona aittir. Monolitik destekteki gözenekli yapı ile her bir mm de 100-150 arasında teorik plaka olduğu tanımlanmıştır. Bu değer monolitik kolonun ayırma gücünü göstermektedir. Bu güçlü ayırma özelliğinin yanında silika bazlı monolitlerin en büyük dezavantajı limitli pH çalışma aralığıdır. Silika monolitler pH 2-8 aralığında çalışmaya uygundur. Bu pH aralığında, özellikle küçük moleküllerin analizlerinde kullanılmaktadır. Protein gibi büyük yapıli moleküllerin analizinde yüksek başarıda sonuçlar vermemektedir.

2.3.4.2. Polimer Monolitler

Polimer kolonlar geniş pH çalışma aralığına sahiptir. (pH=1-12) Polimer monolitlerde mezo gözenekli yapıların olmaması nedeniyle büyük moleküllerin ayrımının yapılabilmesi için kütle aktarımı arttırılmıştır [61, 62].

Bu da protein gibi büyük moleküllerin analizinde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Metakrilat polimer monolit üretiminde kullanılan polimerizasyon karışımının içerisinde monomer, çapraz bağlayıcı, gözenek oluşturucu ve serbest radikal başlatıcı bulunur [63]. Kullanılan monomer monolitin polaritesini belirler. Gözenek yapısı kullanılan gözenek oluşturucu çeşiti; çapraz bağlayıcı derişime göre değişir. Başlatıcının seçimi polimerizasyon çeşidine göre belirlenir.

Polimerizasyon aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilir.

- Termal Polimerizasyon; Karışımın ısıtılmasıyla polimerizasyon başlar. Yüksek sıcaklığın kinetik enerji etkisinden kaynaklı hızlı bir şekilde polimerizasyon gerçekleşir. Bu da monolitteki gözenek yapısını küçültücü ve sayısını azaltıcı bir etkiye sahiptir [64].
- Foto Polimerizasyon; Serbest radikal oluşturmak için UV ışığı kullanıldığı polimerizasyon çeşididir. Nispeten düşük sıcaklıklarda tepkime ortamı oluştuğu için ucucu gözenek oluşturucular da kullanılabilir. Homojenliği yüksek ürünler ortaya çıkar [65].
- Radyasyon Polimerizasyon; Gama ışınlarıyla serbest radikal oluşturmayı hedefleyen bir yöntemdir. Başlatıcı eklenmez. Işının dozajı serbest radikal oluşumunu etkilediği için polimer oluşum hızı ve polimer içerisindeki çapraz bağ yoğunluğu da artar. Bu artış da büyük yapılı gözenek oluşumuna katkıda bulunur [66].

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Gerçekleştirilen deneysel çalışmaları 4 ana işlem altında toplamak mümkündür. Bu ana işlemler:

- Fonksiyonel monomer olan N-metakriloil-L-triptofan'ın (MATrp) sentezi,
- Yalancı spesifik ligand MATrp ve poli(HEMA-MATrp) monoliti karakterizasyonu,
- Monolitik kolon ile sulu çözeltilerden amoksisilin adsorpsiyonu ve desorpsiyonunun incelenmesi,
- Monolitik kolon ile sulu çözeltilerden amoksisilin adsorpsiyonunun kesikli ve sürekli sistemde incelenmesi,

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Poli(HEMA-MATrp) monolitlerin sentezinde ana bileşen olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Fluka AG (İsviçre) firmasından sağlanmıştır. Amoksisilin, Sigma Chemical Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Monomerler kullanılacak ana dek buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir. Potasyum persülfat (KPS), potasyum karbonat ve diğer kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta seçilmiş olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) isimli firmadan temin edilmiştir. Deneyslerde kullanılan su; ultra saf su özelliğini taşımaktadır

3.2. N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) monomerinin sentez yöntemi şu şekildedir: %5 (w/v) lik 30ml K_2CO_3 çözültesi içerisine 5g L-triptofan ve 2g $NaNO_3$ eklenerek çözülmüştür. Çözelti 0°C'ye soğutulmuştur. Bu soğutma işlemi sonrasında, azot (N_2) gazı ortamında 4ml metakriloil klorür damla damla çözeltilere eklenmiştir. Elde edilen çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır ve sonrasında % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 7 (asidik ortamda metakriol

grubunun olası polimerleşmesini engellemek için pH 7 civarında tutulmalıdır) olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözelti etil asetat ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Sıvı faz evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Kalan katı faz dietil eter ve sikloheksan üzerinden kristallendirilerek MATrp elde edilmiştir [67].

3.3. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik HPLC Kolonların Hazırlanması

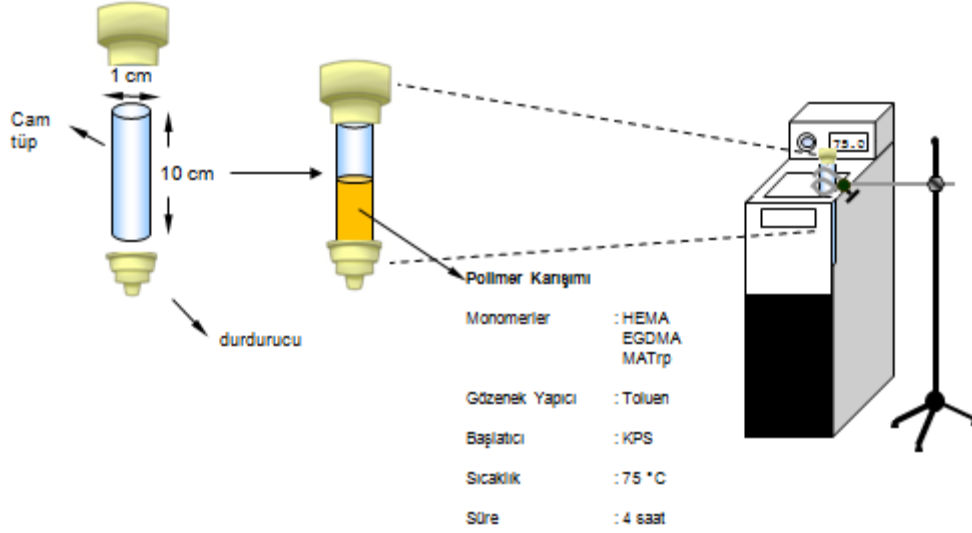
Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolon cam kolonların içerisinde hazırlanmıştır. Monolit, N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'ın yoğun polimerizasyonu ile potasyum persulfat başlatıcı varlığında hazırlanmıştır. Toluene gözenek oluşturucu olarak, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) da çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Monolitik kolonun hazırlandığı düzenek Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Çizelge 3.1'de polimerizasyon şartları ve monolitik kolonun hazırlanma prosedürü verilmiştir. Polimerizasyon tepkimesi sonucunda su ve etil alkol ile yıkama yapılarak, tepkimeye girmemiş olan safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3.1. Polimerizasyon şartları ve prosedürü.

Polimer karışımı	Polimerizasyon Koşulları
100 mg MATrp 1 mL HEMA 0.25 mL EGDMA 0.5 mL toluen 0.5 mL HEPES (% 0,9'luk) 17 mg KPS	Kolon hacmi: 1.6 mL Sıcaklık ve zaman: 4 saat 75°C.

Boş cam kolonların içerisinde monolitik kolon hazırlanmıştır. Gözenek oluşturucu (toluen:0.5mL) ve yapı monomerleri (HEMA: 1mL ve EGDMA: 0.25mL) içerisinde başlatıcı olan Potasyum persülfat çözünmüştür. HEPES (0.5mL) içerisinde fonksiyonel monomer olan 100mg MATrp çözünmüştür. Oda sıcaklığında yapı ve fonksiyonel monomer içeren çözeltiler karıştırılmış ve daha sonra karışım azot

altında 15 dk bekletilmiştir. Devam eden süreçte karışım cam kolon içerisine boşaltılmıştır. Cam kolon içerisinde yüreyen polimerizasyon reaksiyonu 4 saate ve 75°C lik su banyosu içerisinde gerçekleşmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra su ve etil alkol ile yıkama yapılarak tepkimeye girmemiş olan safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Monolitik kolon hazırlama sistemi.

3.4. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

3.4.1. FTIR ile Yapı Analizi

Poli(HEMA-MATrp) monolitinin yapısındaki karakteristik fonksiyonel gruplar FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) ile analiz edilmiştir. Analiz öncesi monolit parçaları etüvde 18 saat kurutulmuştur. 3mg monolit, 97mg KBr ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve bu karışım pelet haline dönüştürülmüştür. Hazırlanan pelerlerden FTIR analizi yapılarak spektrum elde edilmiştir.

3.4.2. NMR Çalışmaları

MATrp monomerinin ^{13}C ve ^1H NMR spektrumu, DMSO- D_6 ve D_2O içerisinde Bruker 500 MHz (ABD) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. İç referans olarak içerisinde döteryum bulunmayan CHCl_3 den yarırlanılmıştır. Ppm cinsinde derişimi olan kimyasak kaymalar (δ) iç referansa göre değerlendirilmiştir.

3.4.3. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi

Akış hızı – geri basınç ilişkisi elde edilen monolitik kolon üzerinde incelenmiştir. Farklı akış hızlarında (0.50-2.5mL/dk) oluşan geri basınçlar kaydedilmiş ve veri olarak değerlendirilmiştir.

3.4.4. Yüzey Morfolojisi

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) yardımıyla poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonunun yüzey morfolojisi incelenmiştir. SEM görüntüsü almak için sentezlenen monolitden ince bir yüzey kesilmiş ve bu yüzey SEM'in plakası üstüne yerleştirilmiştir. İnce altın bir tabakayla kaplanan yüzey vakum altına alınmıştır. Hazır edilen örneklerin SEM de görüntülerine bakılmıştır. (JEOL, JEM 1200EX, Tokyo, Japonya).

3.4.5. Yüzey Alanı Ölçümleri

Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) cihazı yardımıyla poli(HEMA-MATrp) monolitinin yüzey alanı ölçümleri yapılmıştır. Cihazın numune ölçme kısmına monolitler tartılarak konulmuştur. 90°C'de 11 saat boyunca numuneler azot gazı ortamında tutulmuştur. -210°C'de gaz adsorpsiyonu yapılmış, desorpsiyon ise 25°C'de gerçekleşmiştir. Yüzey alanı hesaplanmasında kullanılan veriler, desorpsiyon aşamasında elde edilen verilerdir.

3.4.6. Elementel Analiz

Elementel analiz poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu içerisinde bulunan MATrp değerinin belirlenebilmesi için uygulanmıştır. Kurutulan molit, 1 mg olacak şekilde tartılmıştır. Cihaza konulan (Leco, CHNS-932, ABD) hazırlanmış örnek yakılarak, örnek içerisinde bulunan oksijen, karbon, hidrojen ve azot değerleri belirlenmiştir. MATrp'in sadece azot kaynağı olması önemlidir, HEMA yapısında azot bulunmamaktadır.

3.5. Adsorpsiyon – Desorpsiyon Çalışmaları

3.5.1. Amoksisilinin Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu

Kesikli sistemde amoksisilinin poli(HEMA-MATrp) monolitine sulu çözeltilerden adsorpsiyonu incelenmiştir. Monolitik poli(HEMA-MATrp) kolonlarda amoksisilin derişiminin (10-500 mg/mL) ve sıcaklıktaki değişimlerin (4°C-40°C) adsorpsiyon kapasitesi ve hızı üzerindeki etkileri pH=7’de incelenmiştir. Amoksisilin derişimleri 230nm ölçülmüştür. Fonskiyonel ligand MATrp ile amoksisilin arasında gerçekleşen etkileşimin kinetiği, izoterm modeli ve termodinamik verileri açığa çıkarılmıştır. Kütle-denge denklemi ile adsorpsiyon kapasitesi hesaplanmıştır.

$$q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.1)$$

Bu denklemde; q monolit birim kütesinin adsorpladığı amoksisilin miktarının mg/g cinsinden göstergesidir. Amoksisilinin başlangıç derişimi C₀, belirli bir süre uygulandıktan sonraki amoksisilin derişimi ise mg/ml cinsinden C olarak tanımlanır. Sulu çözeltilerin hacmi V ve kullanılan monolit kütesi m (g) şeklindedir.

3.5.2. Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Karşılaştırması

Poli(HEMA-MATrp) monolitine amoksisilin adsorpsiyonu kesikli ve sürekli sistemlerde incelenmiştir. Bu bağlamda 100mg/L derişimde amoksisilin çözeltisi, pH 7 de tampon ve sıcaklık 25°C’de olacak şekilde koşullar ayarlanmıştır. Kesikli sistemde çalışmaları için kolon içerisindeki tüm monolit öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki monolit hazırlanan amoksisilin çözeltisi içerisinde konularak rotatörde farklı sürelerde (0-60dk) tutulmuştur. Süre bitimlerinde santrifüj ile partiküller çöktürülmüş ve adsorplanan amoksisilin değerleri (mg/g) 230nm’ de ölçülmüştür.

Sürekli sistemde monolitik kolon üzerine 0.5ml/dk akış hızında hazırlanan çözelti verilmiştir. Farklı sürelerdeki (0-60 dk) poli(HEMA-MATrp) monolitine adsorplanan amoksisilin değerleri (mg/g) 230nm’ de ölçülmüştür.

3.5.3. Desorpsiyon Çalışmaları

1.0 M Gilisin hidroklorür (Glycine HCl) kullanılarak Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonlardan amoksisilin desorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Amoksisilin adsorplanmış poli(HEMA-MATrp) monolitlerden 0.5 mL/dk akış hızında, 6 dk

boyunca 25°C de desorpsiyon ajanı olarak kullanılan 1.0 M'lık glisin hidroklorür çözeltisi geçirilmiştir. Amoksisilin derişim 230nm de ölçülmüştür. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak adsorblanan ve desorbe olan amoksisilin miktarından desorpsiyon oranı hesaplanmıştır.

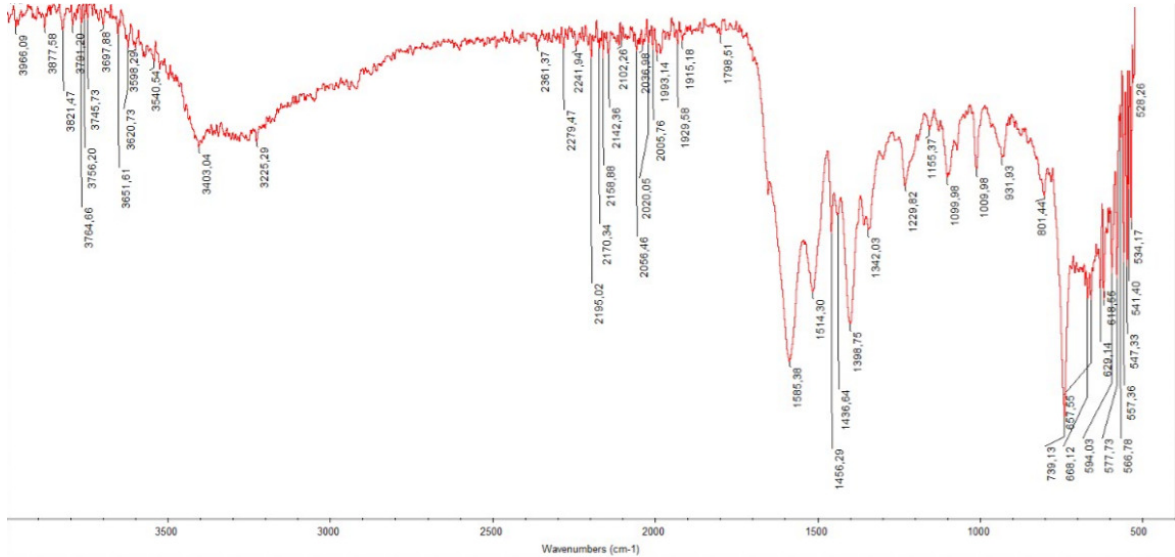
$$\text{Desorpsiyon \%} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamındaki Amoksisilin}}{\text{Adsorplanan Amoksisilin}} \times 100 \quad (3.2)$$

Tekrar kullanılabilirlik çalışması için, sentezlenen aynı monolitik poli(HEMA-MATrp) kolonu 5 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuştur. Deneysel işleyiş aynı şekilde uygulanmıştır. 50mM NaOH ve deiyonize su ile kolon yenilenmesi ve temizlenmesi için yıkanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

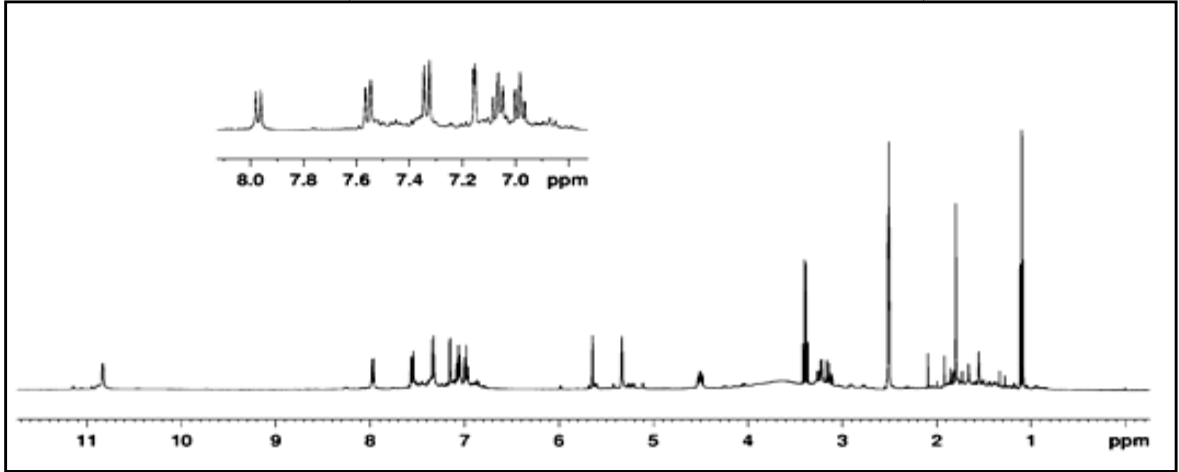
4.1. N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) Monomerinin Karakterizasyonu.

FTIR spektrofotometre yöntemi ile fonksiyonel monomer olan MATrp'nın yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. MATrp fonksiyonel monomerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir. NH gerilmesi (3403 cm^{-1}), amidin CO gerilmesi (1585 cm^{-1}), asitten kaynaklı CO gerilmesi (1798 cm^{-1}), aromatik halkaya ait CN gerilme (1456 cm^{-1}), NH bükülmesi (1514 cm^{-1}), asitten kaynaklı CO bükülmesi (1229 cm^{-1}) ve aromatik halkaya ait gerilme (1155 cm^{-1}) spektrumda görülmektedir.



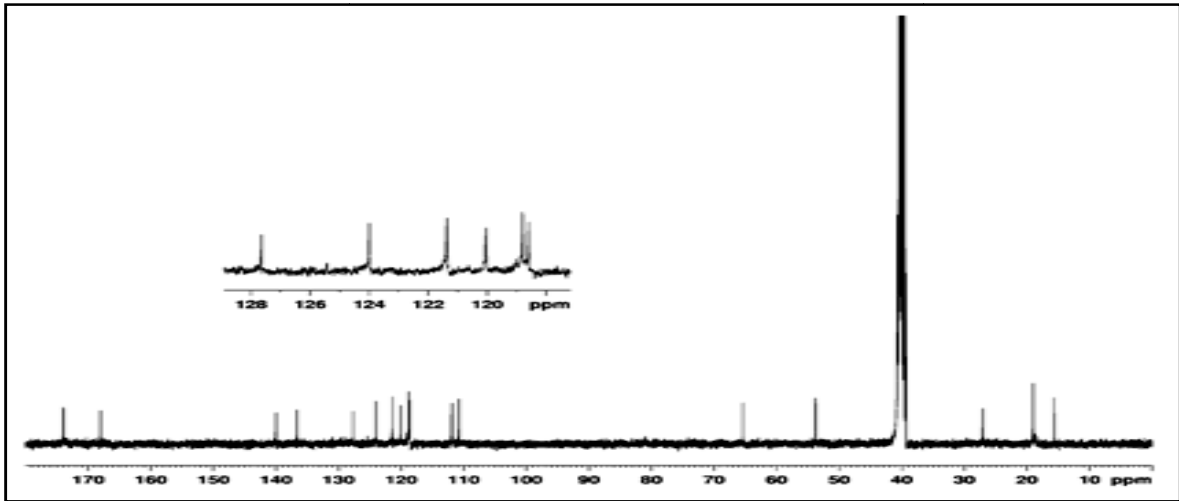
Şekil 4.2. MATrp monomerinin FTIR spektrumu.

^{13}C NMR ve ^1H -NMR; fonksiyonel monomer olan MATrp'nın yapısal noktalarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Şekil 4.3.'de verilen spektuma göre MATrp monomerinin ^1H -NMR spektrumundaki karakteristik pikleri şu şekilde incelenmiştir. 2H, $^{10}\text{CH}_2$ 3.42-3.36 (q), 3H, $^{17}\text{CH}_3$ 1.80 (s), 1H, $^{16}\text{CH}_2$ 5.33 (s), 1H, ^{11}CH 4.50-4.51 (m), 1H, $^{16}\text{CH}_2$ 5.64 (s), 1H, ^{12}OH (asit) 11.1 (s), 5H, 4,5,6,7,2 -indol 7.15-7.57 (m), 1H, ^{13}NH (amid) 7.15 (d), 1H, ^1NH (indol) 8.25(d).



Şekil 4.3. MATrp monomerinin ¹H-NMR spektrumu (DMSO).

Şekil 4.4.'de verilen spektruma göre MATrp monomerinin ¹³C-NMR spektrumundaki karakteristik pikleri şu şekilde incelenmiştir. C (vinil), 110.7 ppm; CH, 53.7 ppm; CH₂, 65.3 ppm; CH₃, 18.8 ppm; CH (indol), 111.9 ppm; CH (benzen halkası), 118.9 ppm; CH (benzen halkası), 121.36 ppm; C (indol), 127.7 ppm; C=O (amit), 167.9 ppm; CH (benzen halkası), 118.7 ppm; CH (benzen halkası), 139.9 ppm; CH₂ (vinil), 120.1 ppm; CH (benzen halkası), 124.0 ppm; C=O (asit), 173.8 ppm ve C (benzen halkası), 136.6 ppm şeklindedir.

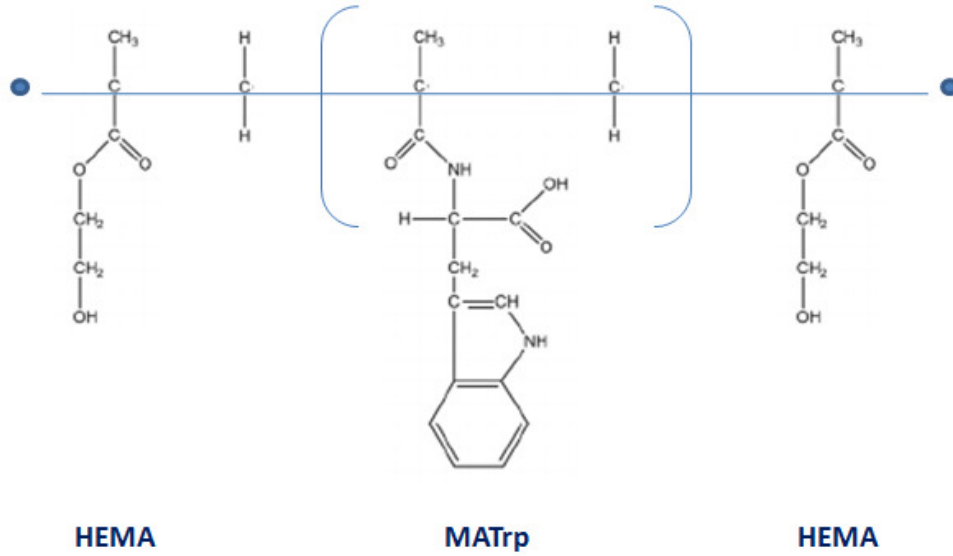


Şekil 4.4. MATrp monomerinin D₂O içinde ¹³C-NMR spektrumu.

4.2. Poli(HEMA-MATrp) Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

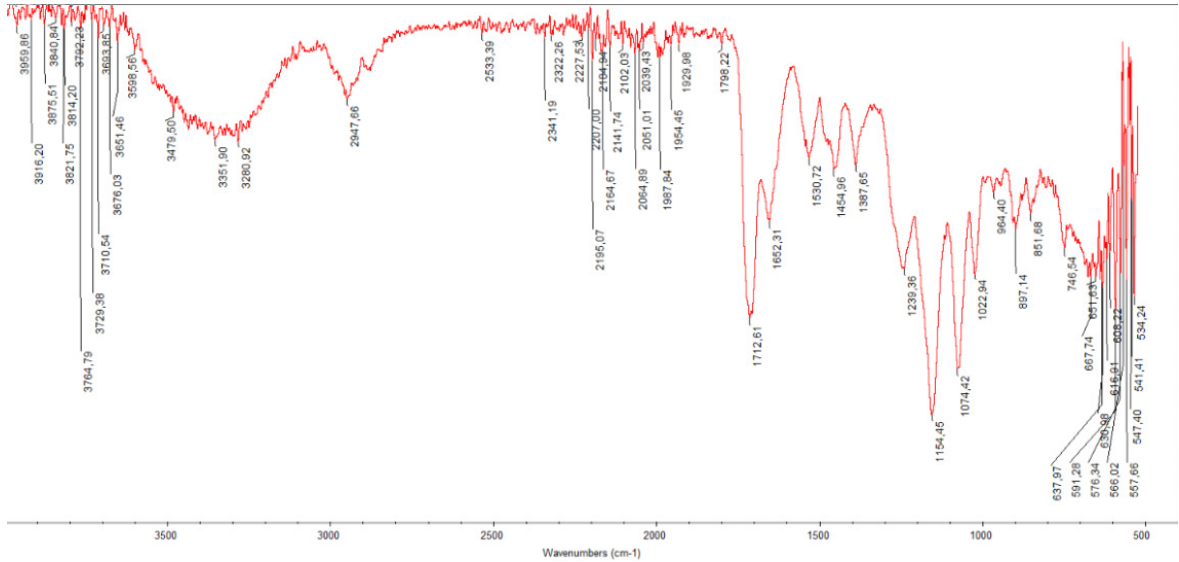
4.2.1. FTIR (Fourier Transform İnfared Spektroskopisi) Analizleri

İlk olarak; pseudospesifik ligand N-metakriloil-L-triptofan (MATrp) sentezlenmiştir. Daha sonra, yapı monomeri olan HEMA ile poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-L-triptofan) [poli(HEMA-MATrp)] monolitik kolonlar yığın polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. Şekil 4.5'de poli(HEMA-MATrp)'nin molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA-MATrp)'nin molekül yapısı.

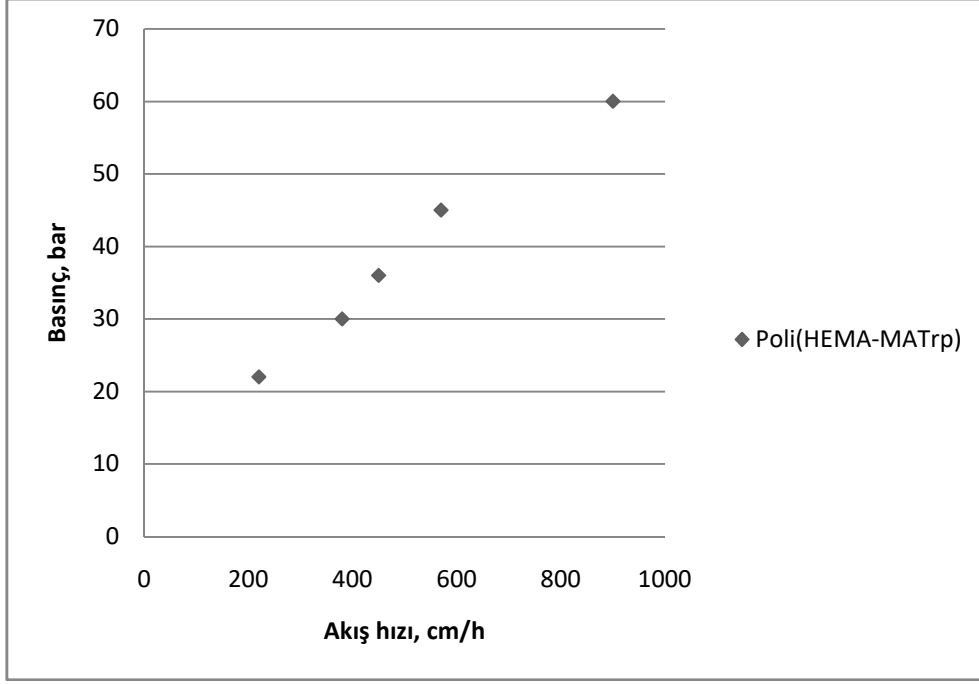
Şekil 4.6'da görüldüğü gibi poli(HEMA-MATrp) monolitine ait spektrumda -OH gerilmesi 3350 cm^{-1} de, alifatik alkile ait -CH gerilmesi 2947 cm^{-1} de, -C=O gerilmesi 1712 cm^{-1} de, -C=C gerilmesi 1652 cm^{-1} de, amite ait -C-N gerilmesi 1454 cm^{-1} ve 1387 cm^{-1} de, aromatik halkaya ait gerilme ise 1154 cm^{-1} de görülmektedir. C=C, amite ait C-N ve aromatik halkaya ait gerilmeler HEMA yapısı içerisinde fonksiyonel monomer MATrp'nın bulunduğu kanıtı olarak gösterilir.



Şekil 4.6. Poli(HEMA-MATrp) monolitine ait FTIR Spektrumu.

4.2.2. Geri Basınç-Akış Hızı İlişkisinin İncelenmesi

Poli(HEMA-MATrp) monolitinde akış hızı 0.5-2.5 mL/dk değişken değerlerde geri basınç-akış arasındaki bağlantı incelenmiştir. Artan akış hızıyla birlikte poli(HEMA-MATrp) monolitinde doğrusal bir şekilde geri basınç da artmaktadır. Şekil 4.7.'de bu geri basınç-akış hızı arasındaki bağlantı gösterilmektedir. Monolitik kolonun gözenekli yapısından kaynaklı olarak yüksek akışlarda geri basınç artmasına rağmen; oluşan bu basınç standard bir HPLC sistemi pompası ve sistemini zorlamayacak değerlerdedir. Bu nokta da bize poli(HEMA-MATrp) monoliti ile yüksek akışlarda çok rahat bir şekilde analizin gerçekleştirilebileceği, ayrıca sistemin de zorlanmayacağını gösterir.



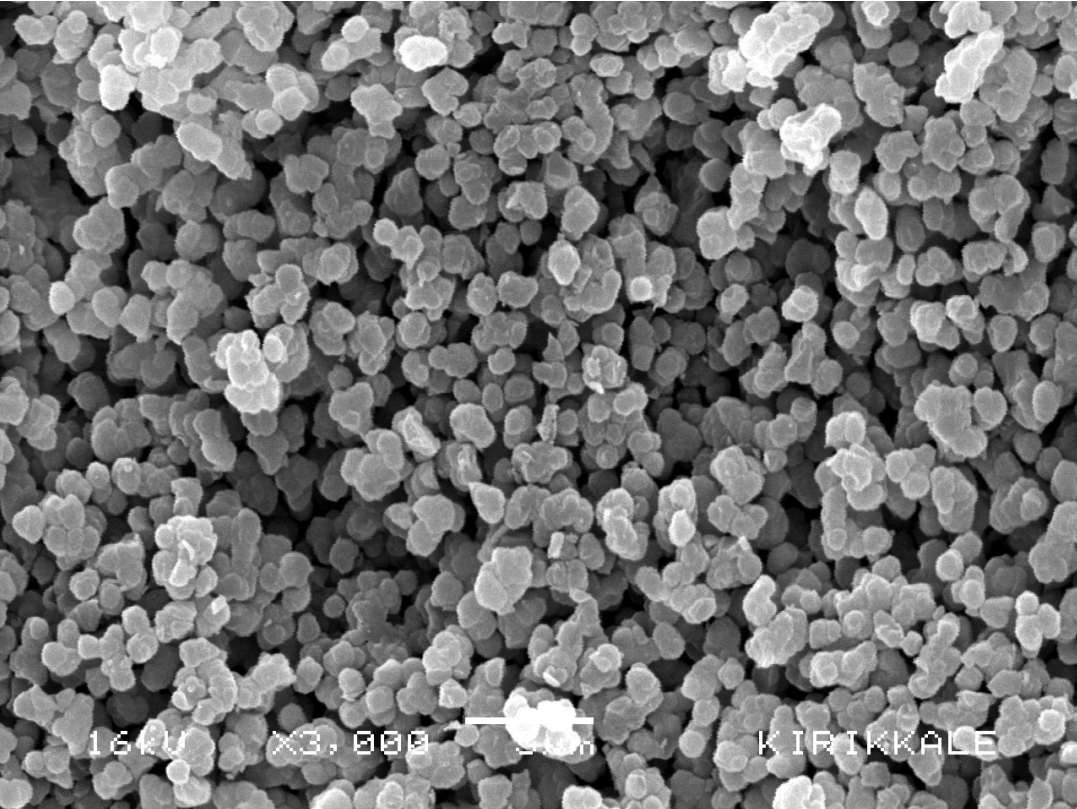
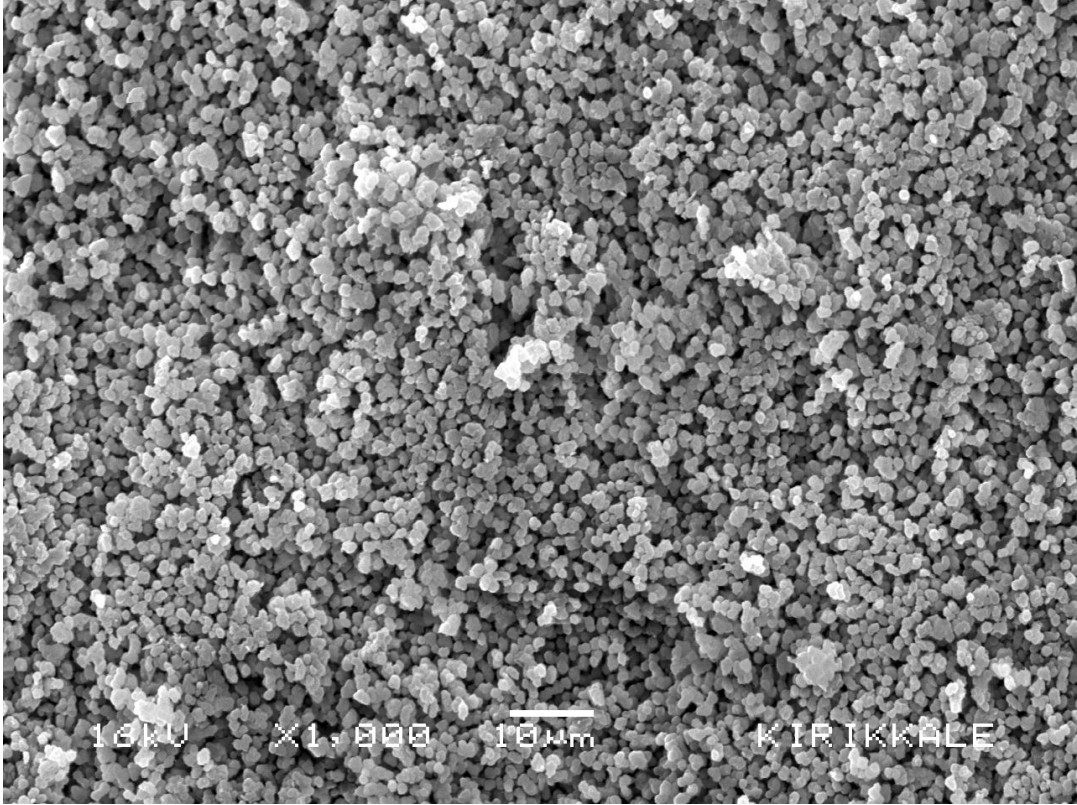
Şekil 4.7. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda geri basınç-akış hızı arasındaki bağlantının incelenmesi.

4.2.3. Yüzey Morfolojisi

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonların yüzey morfolojisi incelenmiştir. Yiğın polimerizasyonu ile sentezlenen monolitik kolonlar Şekil 4.8.'de görüldüğü üzere nispeten dar gözenekli fakat oldukça pürüzlü yapıdadırlar. Pürüzlü yapısı nedeniyle oldukça büyük yüzey alanına sahiptirler. Monolitik kolon sahip olduğu yüzey alanı sayesinde, amoksisilinin kütle aktarımını kolaylaştırmış ve dolayısıyla da adsorpsiyon kapasitesini arttırmıştır.

4.2.4. Yüzey Alanı Ölçümü

Yiğın polimerizasyonu sonucu elde edilen, HEMA ve MATrp'nın ana bileşenini oluşturduğu monolitin yüzey alanı $14.2 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak gözlemlenmiştir. Düşük kütle aktarım sınırlamaları gösterdiğinden dolayı, gözlemlenen büyük yüzey alanı değeri yüksek adsorpsiyon değerlerine ulaşılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bulunan geniş yüzey alanı değeri, düşük kütle aktarım sınırlamaları oluşturduğundan dolayı oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılabilmesini sağlamaktadır [68, 69].



Şekil 4.8. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonların SEM fotoğrafları.

4.2.5. Elementel Analiz

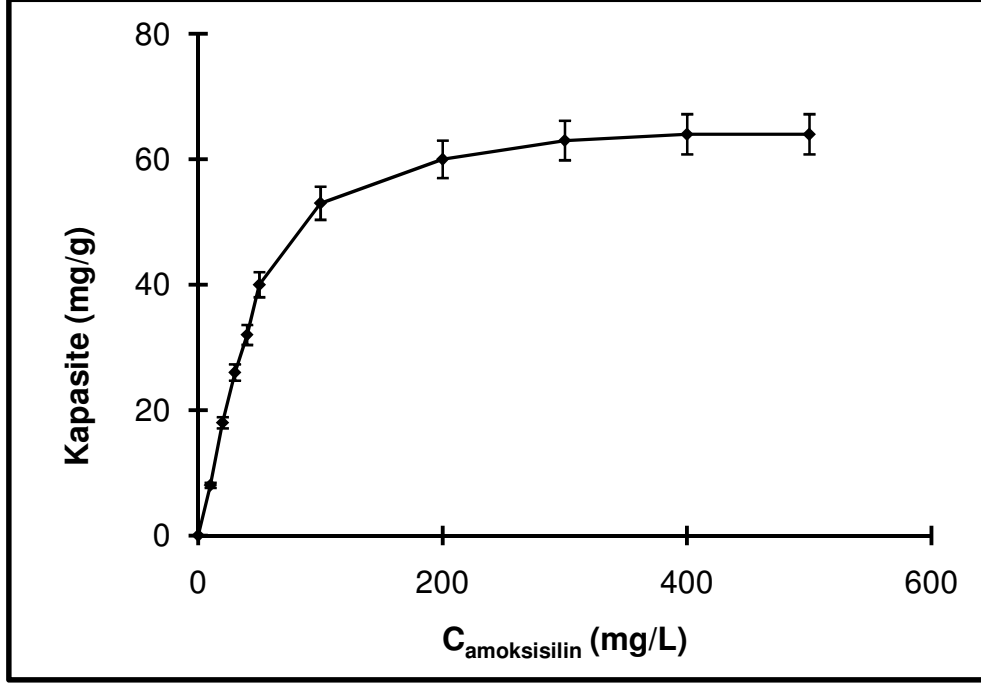
Elementel analiz ile sentezlenen poli(HEMA-MATrp) monolitik sorbentin içeriğine katılmış fonksiyonel monomer olan MATrp miktarını belirlenmiştir. Yakma sonucunda stokiyometrik oranlar kullanılarak azot esas alınmış ve MATrp miktarı azota göre hesaplanmıştır. Monolitik sorbentin içeriğindeki tek azot kaynağının fonksiyonel monomer olması önemlidir. Yapı itibari ile HEMA'nın içeriğinde azot bulunmamaktadır. Buna göre MATrp miktarı 375 µmol/g monolit olarak hesaplanmıştır.

4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.3.1. Amoksisilin Poli(HEMA-MATrp) Üzerine Adsorpsiyonu

4.3.1.1. Amoksisilin Derişim Etkisinin İncelenmesi

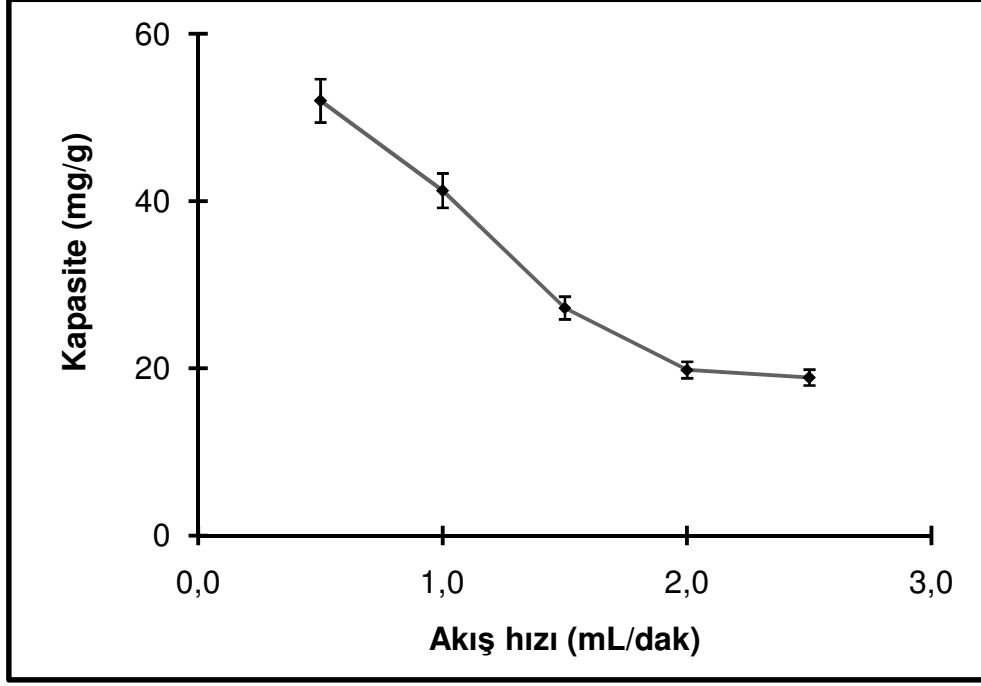
Amoksisilin derişiminin Poli(HEM-MATrp) kolonda amoksisilin adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda 0-500 mg/L derişimindeki amoksisilin değişen değerlerdeki adsorpsiyon değerlerine bakılmıştır. Şekil 4.9.'da amoksisilin başlangıç derişiminin amoksisilin ile monolitik kolon üzerindeki adsorpsiyon ilişkisine etkisi gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü gibi yaklaşık 300 mg/L amoksisilin derişimden sonra denge değerine ulaşmaktadır. Bu durum ortamdaki aktif spesifik ligandların tamamen amoksisilinle etkileştiği, bu derişimden sonra etkileşebilecek noktaların kalmadığını göstermektedir.



Şekil 4.9. Poli(HEMA-MATrp) monoliti ile amoksisilin arasındaki adsorpsiyona amoksisilin başlangıç derişimi etkisi; pH 7.0, T: 25°C, akış hızı: 0.5mL/dk, adsorpsiyon süresi: 60dk

4.3.1.2. Akış Hızı Etkisinin İncelenmesi

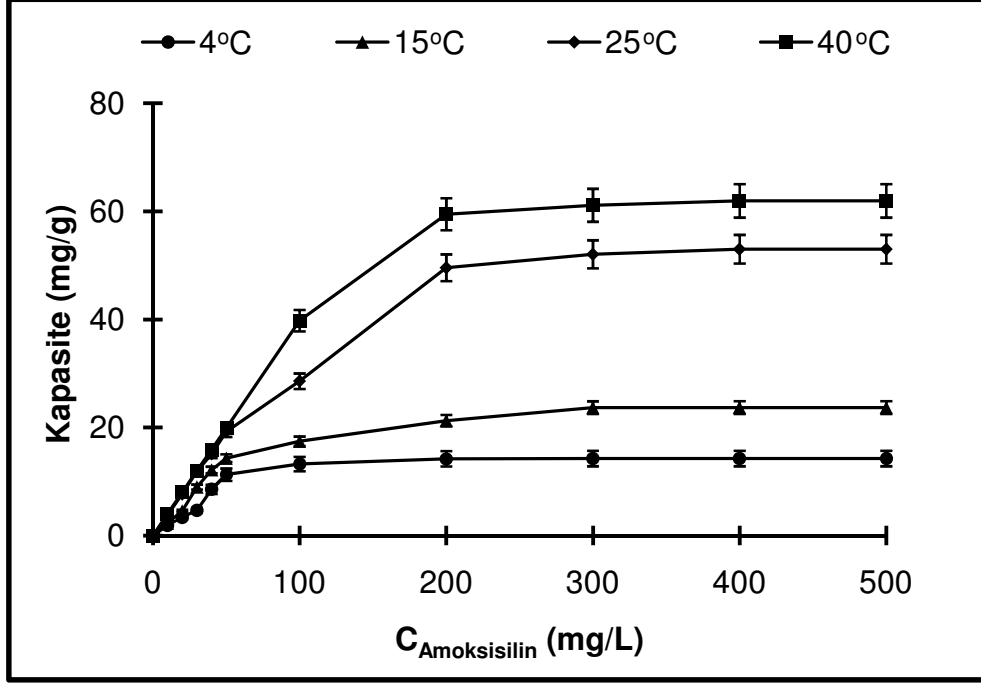
Akış hızının poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda amoksisilin adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda 100mg/L derişimdeki amoksisilin çözeltisi; akış hızı 0.5-2.0mL/dk olacak şekilde monolitik kolondan geçirilmiş ve adsorpsiyon değerlerindeki değişim gözlemlenmiştir. Akış hızlarındaki farklılığın amoksisilin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi Şekil 4.10'da verilmektedir. Amoksisilin adsorpsiyon kapasitesi 0.5 mL/dk akışı hızında 52.0 mg/g değerinden 2.5 mL/dk akış hızında 18.9 mg/g değerine azalmaktadır. Akış hızının artmasıyla amoksisilin moleküllerinin monolitik kolondaki MATrp fonksiyonel grubuyla etkileşebileceği süre azalmaktadır. Etkileşebilecek süre azaldığı için de amoksisilin monolitik kolondaki alıkonma süresi akış hızını artmasıya azamıştır.



Şekil 4.10. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda amoksisilin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Amoksisilin derişimi: 100.0 mg/L; pH 7.0; Sıcaklık: 25°C.

4.3.1.3. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

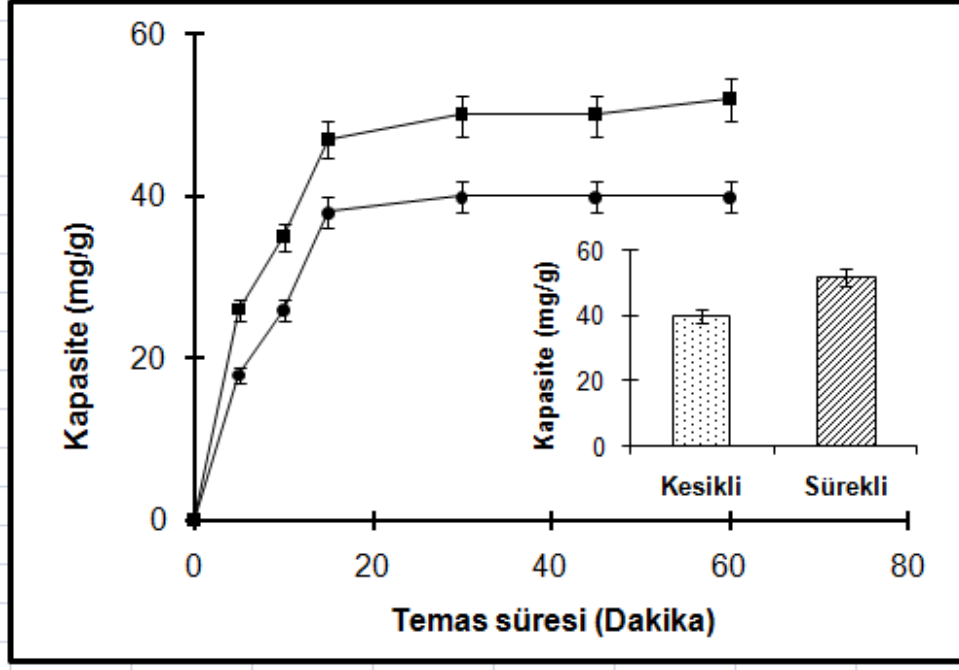
0-500mg/L derişim değerleri arasında değişen amoksisilin adsorpsiyonuna, 4-40 °C arasındaki farklı değerlerde değişin sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Artan sıcaklıkla Şekil 4.11.'de de görüldüğü gibi monolitik kolondaki amoksisilin adsorpsiyon değerleri artmıştır. Adsorpsiyon temelindeki etkileşimin açığa çıkartılabilmesi için sıcaklık etkisinin ortaya konulması oldukça önemli bir parametredir. İyonik etkileşimler ve hidrojen bağları baskın etkileşimler ise adsorpsiyon kapasitesindeki değişimler sıcaklıkla ters orantılıdır [70, 71]. Hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri baskın etkileşim ise adsorpsiyon kapasitesindeki değişimler sıcaklıkla doğru orantılıdır [72].



Şekil 4.11. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonda farklı derişimlerideki amoksisilin adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi; pH 7.0; Akış hızı: 0.5mL/dk.

4.3.1.4. Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Karşılaştırması

Farklı süreler sonucunda kesikli ve sürekli sistemde adsorpsiyon kapasitesi değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre sürekli sistemdeki adsorpsiyon kapasitesi, her süre ve genel adsorpsiyon kapasitesi olarak kesikli sistemden daha iyi sonuçlar vermiştir. Sürekli sistemde çalışmak poli(HEMA-MATrp) monoliti üzerine olan amoksisilin adsorpsiyon kapasitesini arttırmıştır. Bunun nedeni de sürekli sistem içerisindeki devamlı akışın, kütle transferini destekleyici nitelikte olmasındandır.



Şekil 4.12. Kesikli ve sürekli sismtede poli(HEMA-MATrp) monolitinde amoksisilin adsorpsiyon kapasitesi, derişim: 100mg/L pH 7.0, T: 25°C, akış hızı: 0.5mL/dk

4.3.2. Adsorpsiyon Termodinamiği

Termodinamik; sıcaklık, basınç, kimyasal kompozisyon gibi değişkenlerin bir fonksiyonu olarak maddenin davranışını tanımlar. Sistemlerin kimyasal durumunun bir süreklilik tanımlamasıdır. Atomik sıkaladaki elemental haldeki süreçleri veya atomik boyuttaki mikroskopik ayrıntıları tanımlayamaz ve ön göremez. Poli(HEMA-MATrp) ile amoksisilin adsorpsiyonu arasındaki ternodinamik değişkenlerin hesaplanması için, sıcaklık değişimi ve amoksisilin derişimi verileri üzerinde değerlendirme yapıldı.

Sıcaklıkla değişebilen denge sabitleri kullanılarak ΔG , ΔH ve ΔS temodinamik değerleri hesaplanabilmektedir.

Adsorpsiyondaki entalpi değişimine göre sıcaklık fonksiyonu olarak denge sabiti aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$d \ln b / dT = \Delta H / RT^2 \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; ΔH adsorpsiyon entalpisi (J/mol), gaz sabiti olarak R (J/mol.K), b ise Langmuir sabitidir. ΔH değerinin pozitif veya negatif olmasına göre Langmuir sabiti (b)'nin sıcaklıkla olan etkileşimi incelenir. Eğer endotermik bir adsorpsiyon

oluşuyorsa ΔH 'ın işareti pozitif, eğer ekzotermik bir tepkime oluşuyorsa ΔH 'ın işareti negatif olacaktır. Pozitif işaretli hallerdeki durumlarda Langmuir sabiti sıcaklıkla beraber artacak, negatif işaretli hallerdeki durumlarda Langmuir sabiti sıcaklığın artmasıyla azalım yönüne kayacaktır.

Kimyasal tepkimenin sahip olduğu enerjinin iş için kullanılabilme süreciyle alakalı Gibbs Serbest Enerjisi (G) kullanılır. Sistem sıcaklığı T (K) ile entropisi (S) çarpımının, sistem entalpisi (H) ile toplamı, sistemdeki serbest enerjisi (G) vermektedir.

$$G = H - TS \quad (4.2)$$

Reaksiyonun serbest enerjisi (ΔG) ise aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.3)$$

Sıcaklık, Langmuir sabiti (b) ve serbest enerjisi (ΔG) değiştirdiğine göre şu şekilde ifade edebilir.

$$\Delta G = -RT \ln b \quad (4.4)$$

$$-RT \ln b = \Delta H - T\Delta S$$

$-RT$ ye her iki taraf da bölüldüğünde eşitlik şu şekle bürünmüş olur.

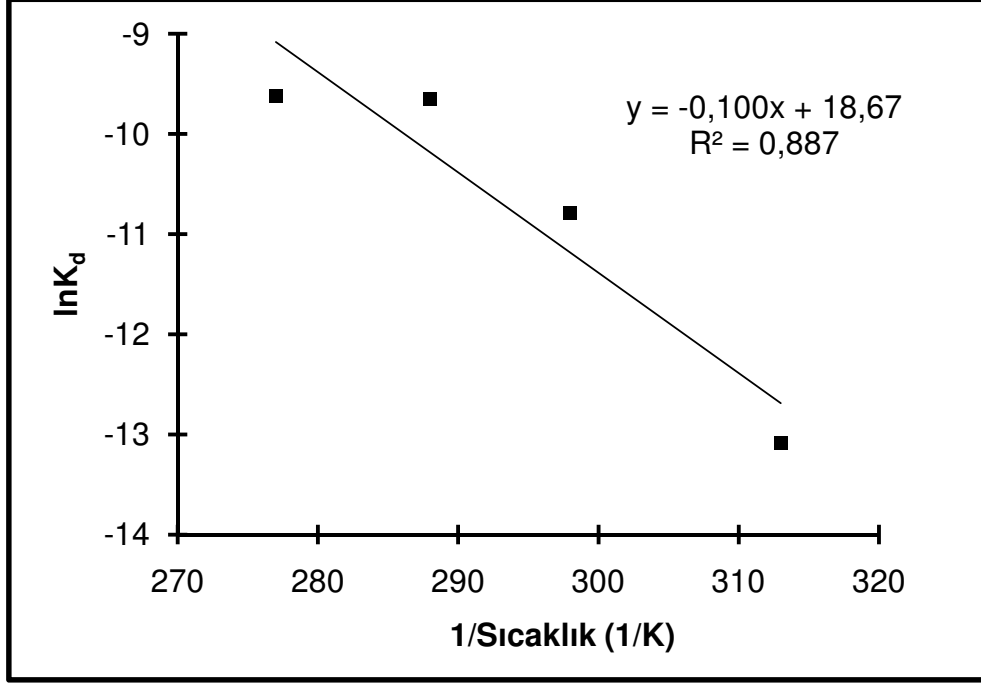
$$\ln b = \Delta S / R - \Delta H / RT \quad (4.5)$$

$\ln b$ ye karşılık $1/T$ grafiği çizimesi sonucu oluşan doğrunun eğimi adsorpsiyon entalpisini (ΔH) ve kayma değerinden de adsorpsiyon entropisi (ΔS) hesaplanır [72].

Aşağıdaki eşitlikle ifade edilen Van't Hoff denklemine göre;

$$\ln K_{eq} = -\Delta H/R \times 1/T + \Delta S/R \quad (4.6)$$

$\ln K_{eq}$ ya karşı çizilen $1/T$ grafiğinde eğim = $-\Delta H/R$ yi, kesim noktası ise $\Delta S/R$ yi vermektedir.



Şekil 4.13. Van't Hoff denkleminde ΔH 'i bulmak için çizilen grafik.

Denkleme göre 25°C de $\Delta H = 0,833$ J/mol olarak bulunmuştur. ΔH in pozitif değerde olması adsorpsiyonun endotermik bir süreçle işlediğini göstermektedir. Yine aynı sıcaklıkta $\Delta S = -89,68$ J/mol.K olarak hesaplanmıştır. ΔG ise 26,724kJ/mol.K olarak hesaplanmıştır. Bu veriler dâhilinde endergonik bir sistem ile adsorpsiyon oluşmaktadır. Bir başka deyişle dışarıdan enerji isteyen bir sistemdir.

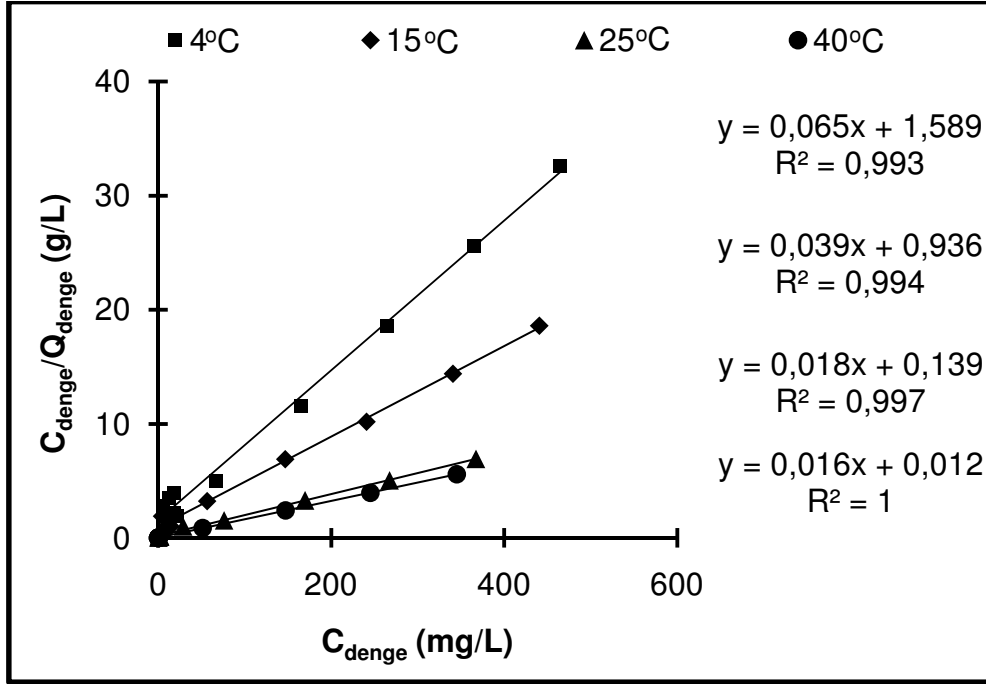
4.3.3. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi; iki katı faza adsorplanan iyonların miktarı ile denge halindeki çözeltideki iyonların arasındaki bağlantıyı tanımlar. Başka bir deyişle adsorpsiyon izotermi adsorpsiyon türünü karakterize etmek için kullanılır.

Adsorpsiyon modellerinden Langmuirde moleküller, sayısı belli noktalara ve bu noktalarda tek bir molekülün adsorplanabileceğini temel alır. Komşu bölgelerdeki adsorplanan moleküller arasında herhangi bir etkileşim olmadığı ve adsorpsiyon noktalarının enerjilerinin eşit olduğu varsayılır [73]. Aşağıdaki eşitlikle Langmuir İzoterm modeli tanımlanmıştır. Dengedeki sonuçların eşitliğe göre uygulanmasının neticesinde doğrusal bir grafik elde ediliyorsa, bu sistemdeki adsorpsiyon modelinin Langmuir modeline uygun olabileceği sonucu çıkmaktadır.

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{mak} \cdot b) + C_{eq}/Q_{mak} \quad (4.7)$$

Bu eşitlikteki; Q adsorplanmış amoksisilin miktarını (mg/g), C_{eq} denge amoksisilin derişimini (mg/L), b langmuir sabitini ve Q_{max} adsorpsiyon kapasiteni (mg/g) göstermektedir. Y eksenini kesen nokta $1/Q_{max} \cdot b$ değerini ve eğimin $1/Q_{max}$ değerini, C_{eq}/Q_{eq} ya karşı çizilen C_{eq} grafiği vermektedir.



Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklardaki poli(HEMA-MATrp) monoliti için Langmuir izoterm modeli.

Farklı sıcaklık dęerlerindeki adsorpsiyonların verileri grafiğe geçirilerek elde edilen sonuçlar yukarıdaki şekilde gösterilmiştir. Kolerasyon katsayısı (R^2) her dört sıcaklık için de yüksektir ve bu doğrusal sonuçlar Langmuir izotermine uygun bir şekilde adsorpsiyon gerçekleştiğini göstermektedir.

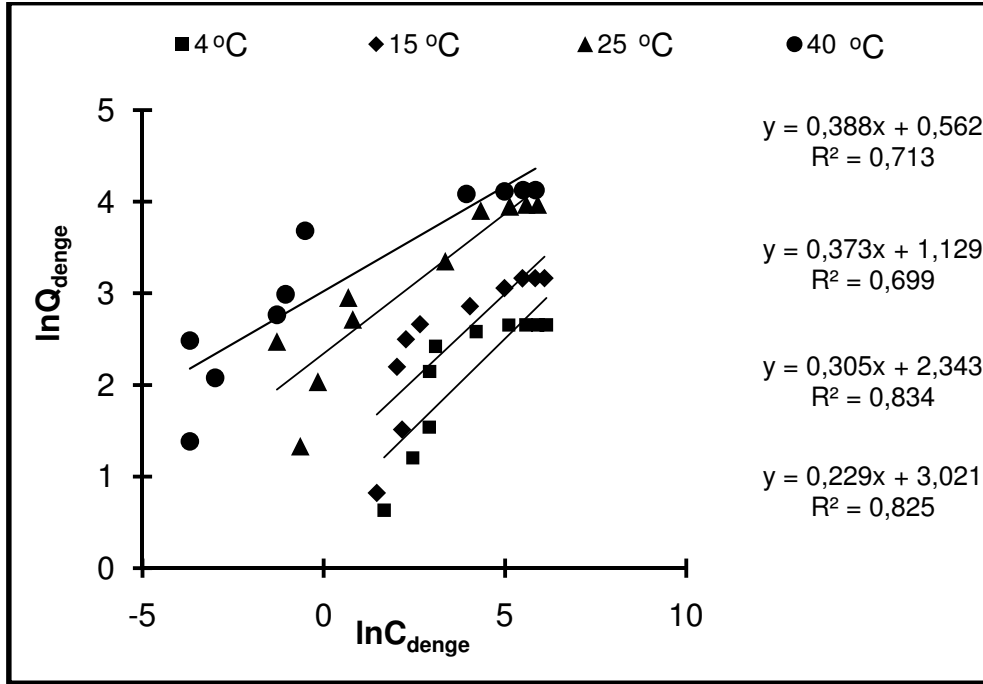
Adsorpsiyon dengesini sağlayan bilinen en eski eşitlerden biri de Freundlich adsorpsiyon modelidir [74]. Freundlich izotermi, Langmuir izotermine farklı bir formudur ve homojen olmayan yüzeydeki adsorpsiyonu tanımlamada kullanılır. Fruendlich komşu bağlanma noktalarının bağlantı yapıp, yapmadığına bağlı olarak adsorpsiyon enerjisinin değiştiğini varsaymaktadır. Aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır.

$$Q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4.8)$$

Bu eşitlikte Q_e adsorpsiyon miktarını (mg/g), C_e çözeltideki amoksisilin derişimini, K_f ve n ise Freundlich sabitidir. Eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak farklı bir forma büründürülür.

$$\ln Q_e = \ln K_f + 1/n \cdot \ln C_e \quad (4.9)$$

$\ln Q_e$ ye karşı çizilen $\ln C_e$ grafiğinin doğrusal şekilde olması Freundlich izoterm modeline uygun olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklardaki poli(HEMA-MATrp) monoliti için Freundlich izoterm modeli.

Farklı sıcaklık değerlerindeki adsorpsiyonların verileri grafiğe geçirilerek elde edilen sonuçlar yukarıdaki şekilde gösterilmiştir. Kolerasyon katsayısı (R^2) her dört sıcaklık için de Langmuir modelindeki kolerasyon katsayılarından düşüktür. Bu nedenden dolayı homojen bir yüzeyde adsorpsiyon gerçekleştiği ve çok katlı bir adsorpsiyonun oluşmadığı sonucu çıkmaktadır. Adsorpsiyon tek tabakalı şekilde gerçekleşmiştir. Bu adsorpsiyon ilişkisinde Langmuir modeli Freundlich e göre daha uygun bir modeldir.

Çizelge 4.1. Amoksisilin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich Adsorpsiyon sabitleri ve kolerasyon katsayıları.

Freundlich İzoterm Modeli			
	Kf mL/g	n	R ²
4°C	1.75	2.57	0.71
15°C	3.09	2.68	0.70
25°C	10.41	3.28	0.83
40°C	20.51	4.37	0.82

Langmuir İzoterm Modeli			
Q _{mak}	b, L/mg	K _d , mg/L	R ²
15.24	0.04	24.23	0.993
25.19	0.04	23.60	0.994
54.05	0.13	7.56	0.997
62.11	1.32	0.76	1.000

4.3.4. Adsorpsiyon Kinetiği

Birinci ve ikinci derece kinetik modellerin elde edilen sonuçlara uygulanmasıyla birlikte adsorpsiyon işlemini kontrol eden kütle aktarımı ve kimyasal tepkime gibi mekanizmalar incelenmiştir. Adsorbent yüzey derişimlerine, ölçülen derişimin eşit olduğu durumlar varsayılarak kinetik modeller uygulanır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği, sıvı çözülden çözünen adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliklerdir. Aşağıdaki eşitlikle ifade edilir.

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (4.10)$$

Eşitlikte yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti olarak k_1 (1/min), q_e denge zamanında q_t ise t anında adsorplanan amoksisilin (mg/g) miktarını göstermektedir. Sınır olarak $t=0$ da $q_t=0$ ve $t=t$ anında $q_t=q_t$ olarak kabul edilmiş ve integral uygulanarak aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.

$$\log[q_{eq}/(q_{eq} - q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.11)$$

Eşitlik tekrardan düzenlenip, doğrusal şekil yakalanırsa aşağıdaki eşitlik elde edilir

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.12)$$

Çizilen $\log(q_{eq})$ ya karşı t grafiğinin doğrusal olması kinetik modelin uygulanabilceğinin göstergesidir. T ye karşı $\log(q_{eq} - q_t)$ grafiğinin kesim noktası, gerçek-birinci derece işlemde $\log(q_{eq})$ ya eşit olmalıdır. Ayrıca yalancı ikinci derece denklem olan ve adsorpsiyon denge kapasitesine dayanan eşitlik aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq} - q_t)^2 \quad (4.13)$$

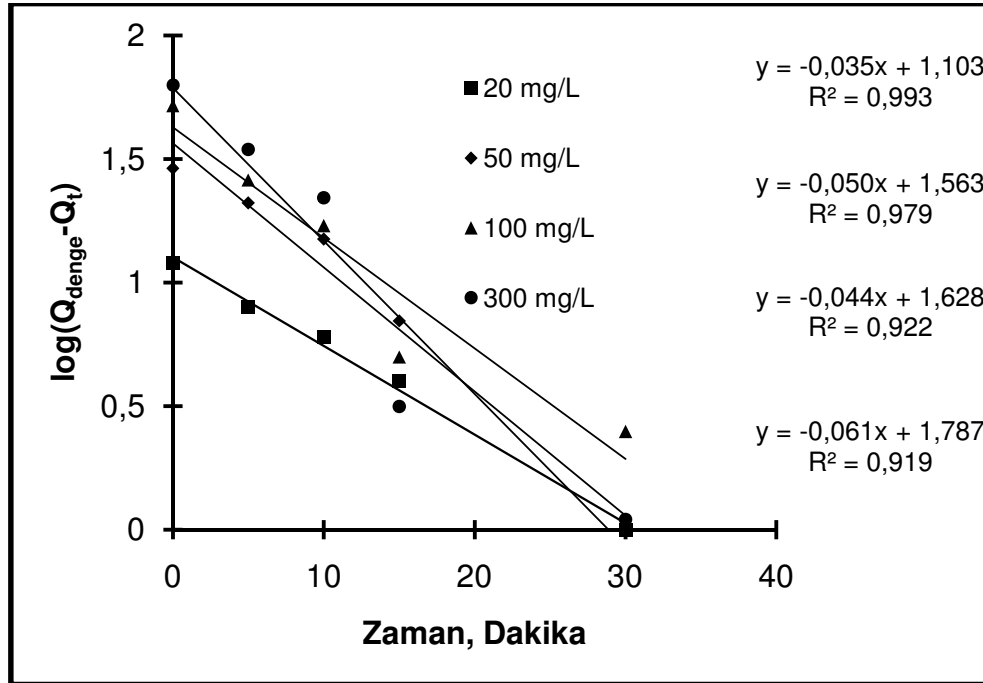
Yalancı-ikinci derece hız sabiti olarak k_2 (g/mg.g) şeklinde sembolize edilir. Sınır olarak $t=0$ da $q_t=0$ ve $t=t$ anında $q_t=q_t$ olarak kabul edilip uygulandığında aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$1/(q_{eq}-q_t) = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (4.14)$$

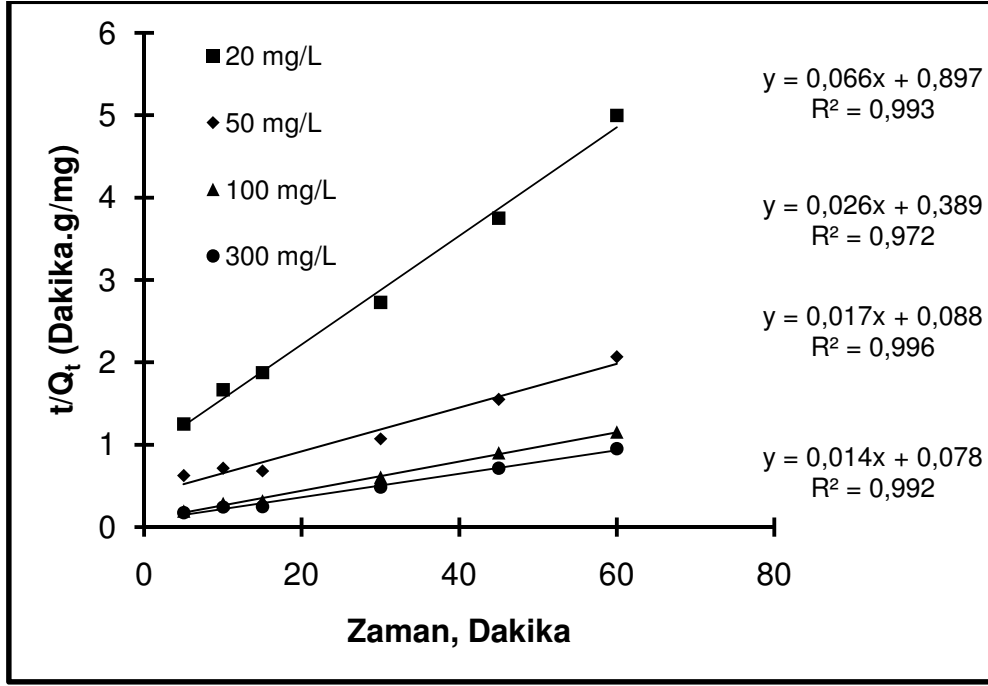
Bu eşitliğin doğrusal şekildeki hali ise şu şekildedir;

$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.15)$$

t/q_t ye karşı çizilen t grafiğinin doğrusal olması, ikinci derece kinetiğin uygulanabilmesi anlamına gelmektedir. Kesim noktası ve eğimden; hız sabiti k_2 ve denge adsorpsiyonu q_{eq} bulunur.



Şekil 4.16. Poli(HEMA-MATrp) monoliti için elde edilen verilerin yalancı-birinci derece kinetiği.



Şekil 4.17. Poli(HEMA-MATrp) monoliti için elde edilen verilerin yalancı-ikinci derece kinetiği.

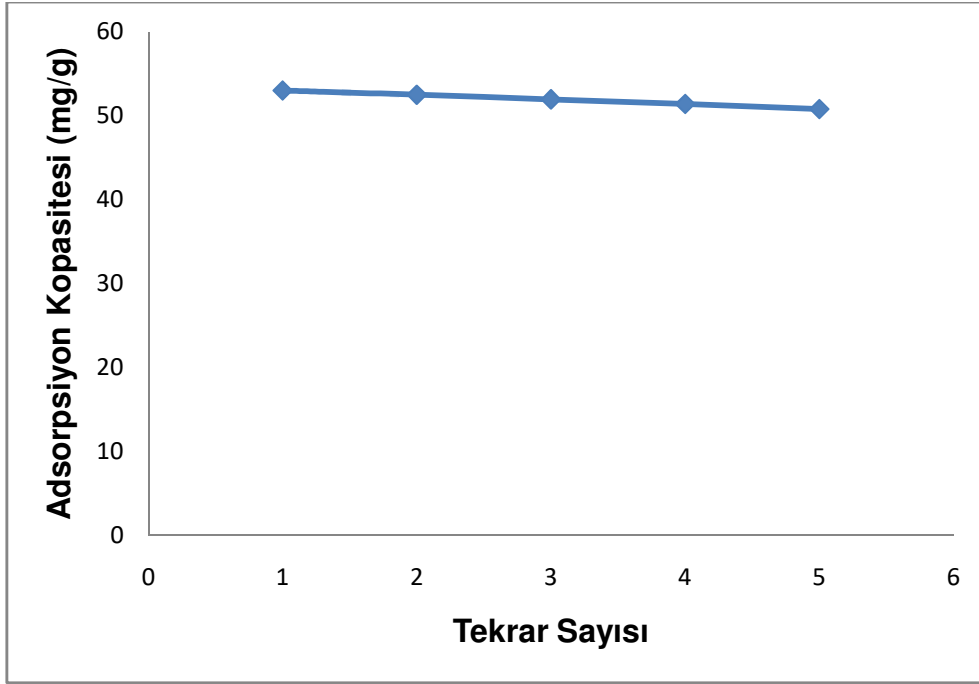
Çizelge 4.2. Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

Başlangıç Derişimi (mg/L)	Deneysel (mg/g)	Birinci Derece Kinetik			İkinci Derece Kinetik		
		K ₁ (1/dk)	Q _e (mg/g)	R ²	K ₁ (1/dk)	Q _e (mg/g)	R ²
20	18	0.0806	12.68	0.993	0.736	15.15	0.993
20	40	0.1151	36.56	0.979	0.066	38.60	0.972
100	53	0.1013	42.46	0.922	0.193	58.82	0.996
300	63	0.1404	61.23	0.919	0.179	71.43	0.992

DeneySEL değerler ile yalancı-ikinci derece kinetik denkeleminden elde edilen teorik q_e değeri bir birleri ile benzerdir. Ayrıca kolerasyon katsayısı da yüksektir. Farklı derişimlerde gözlemlenen R² değerleri 1 e yakın bir noktadır. Bu da poli(HEMA-MATrp) monolitinin ikinci-derece kinetik modele uygun olacağını göstermektedir. Difüzyon sınırlamaları bu sonuçlar ışığında amoksisilinin monolite adsorpsiyonunda ihmal edilebilir. Monolitın gözenekli yapısının amoksisilin çözeltisi üzerinde düzgün bir akışa olanak sağlaması, bu durumun açıklamasıdır.

4.3.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Sentezlenen poli(HEMA-MATrp) monolitinin desorpsiyon sonrasında tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bunun için 1.0 M glisin hidroklorür kullanılarak sürekli sistemde amoksisilin desorpsiyonu gerçekteştirilmiştir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri poli(HEMA-MATrp) monoliti üzerinde 5 defa tekrar edilmiştir. Tekrarların sonucunda kapasitede önemli bir düşüş görülmemiştir. 5. Tekrarın bitiminde %4.2 lik bir azalma ile adsorpsiyon kapasitesi 50.8 mg/g a gerilemiştir. Glisin Hidroklorürün bu sistemde desorpsiyon ajanı olarak kullanmasının uygun olduğu ortaya çıkarılmıştır. Monolitik kolon desorpsiyon sonucunda tekrar tekrar adsorpsiyonlar için kullanılabilir.



Şekil 4.18. Poli(HEMA-MATrp) monolitinin tekrar kullanılabilirliği; Amoksisilin derişimi:100 mg/L; pH 6.0; Akış hızı: 0.5 mL/dk.; desorpsiyon ajanı: 1.0 M Glisin HCL; Sıcaklık: 25°C.

5. YORUM

- Parikül kolonlara alternatif olarak; antibiyotik çeşitlerinden amoksisilin ayırımı ve saflaştırılması için yenilikçi, monolitik yapıya sahip, bünyesinde yalancı-spesifik ligand bulunan bir dolgu maddesi hazırlanması bu tez çalışmasının başlangıç noktasıdır.
- Bu kapsamda ilk basamak olarak fonksiyonel ligand olacak, aminoasit bazlı MATrp sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- İkinci adımda poli(HEMA-MATrp) monoliti sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu yığın polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Poli(HEMA-MATrp) monolitinin 14.2 m²/g olarak spesifik yüzölçümü ölçülmüştür.
- Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) görüntülerinden yola çıkarak, pürüzlü ve porlu bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir.
- Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu ile amoksisilin arasındaki adsorpsiyon çalışmaları kesikli ve sürekli sistemde yapılmıştır.
- Poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonunda amoksisilin adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH 7 de 64 mg/g olduğu hesaplanmıştır.
- Sıcaklıkla beraber poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonuna karşı amoksisilin denge adsorpsiyonunda artış gözlemlenmiştir.
- 1.0M Glisin hidroklorür desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. 5 kez tekrar edilen adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sonucunda %4.2 lik bir gerileme ile adsorpsiyon kapasitesi 50.8 mg/g'a gerilemiştir. Bunun sonucu olarak sentezlenen monolitik kolonun tekrar ve tekrar kullanılmasının uygun olacağı görülmüştür.
- Adsorpsiyon izoterm modelleri üzerinde çalışmalar yapılmış; Langmuir izotermi için 0.997 ve Freundlich izotermi için 0.83 olan kolerasyon (R²) değerleri hesaplanmıştır. Bu veriler doğrultusunda Langmuir izoterm modelinin poli(HEMA-MATrp) monolitik kolonu ile amoksisilin arasında gerçekleşen adsorpsiyona uygun bir model olduğu gözlemlenmiştir.

- Adsorpsiyon kinetikleri üzerine çalışmalar yapılmış; yalancı-birinci derece kinetik modeli ile yalancı-ikinci derece kinetik modelleri incelenmiştir. Deneysel ve teorik q_{eq} değerleri yalancı-ikinci derece kinetik modelinde daha yakın bir haldedir. Bu nedenden dolayı adsorpsiyon kinetiği yalancı-ikinci derece kinetik modeline uygundur ve kimyasal kontrollü adsorpsiyon gerçekleşmiştir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Öncül, O., *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmifl Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31 • Kasım 2002*; s. 23-38
- [2] Analysis of amoxicillin and five impurities on the Agilent 1220 Affinity LC System <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-6093EN.pdf> (Mayıs, 2017)
- [3] Cabrera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H.M., Minakuchi, H., Nakanishi, K., 2000, A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations, *J. High Resol. Chromatography* 23, (1) 93–99.
- [4] Thomashow, L. S., R.F. Bonsall and D.M. Weller. 2002. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *In Situ. Manual of Environmental Microbiology (2nd Edition) Washington, DC: ASM pres*
- [5] Yarsan, E., *Veteriner hekimlikle antibiyotikler*, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2013
- [6] ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389–395
- [7] Lindblad W. J. (2008). Considerations for determining if a natural product is an effective wound-healing agent. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. V. 7(2), P. 75–8
- [8] Forrest R. D. (1982). Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*. V. 75(3), P. 198–205
- [9] Ertan M.: *Antibiyotikler, Farmasötik Kimya*, 2 .Baskı, 1096-1173, Ankara, (2004)
- [10] Alexander Fleming, "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzas*" *The British Journal of Experimental Pathology*, 1929
- [11] Penicilin: The story of antibiotic <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/penicill.htm> (Mayıs 2017)
- [12] Kayaalp S.O.: *Rasyonel Tedavi yönünden tıbbi Farmakoloji*, 10.baskı, Hacettepe –Taş kitapçılık , Ltd. Şti., Ankara, (2002)
- [13] Amoksisilin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amoxicillin#section=Top>, (Mayıs 2017)
- [14] Öncül, O., *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmifl Enfeksiyonlar*, Sempozyum Dizisi No: 31 • Kasım 2002; s. 23-38

- [15] Hjerten, S. (1973). "SOME GENERAL ASPECTS OF HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY." *Journal of Chromatography* 87(2): 325-331.
- [16] Eriksson, K. Hydrophobic interaction chromatography. In: Janson, J-C., Ryden, L., editors. Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications. *New York7 Wiley-Liss; 1998*. p. 283– 309
- [17] Tanford, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of globular conformation of proteins. *J Am Chem Soc* 1962;84:4240– 7
- [18] Waugh, DF. Protein–protein interactions. *Adv Protein Chem* 1954;9:325 – 437
- [19] Fisher, HF. A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51:1285– 91
- [20] J. Rosengren, et al. (1974) HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY - SYNTHESIS AND USE OF SOME ALKYL AND ARYL DERIVATIVES OF AGAROSE." *Journal of Chromatography* 101(2): 281-288
- [21] Hjerten, S. (1973). "SOME GENERAL ASPECTS OF HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY." *Journal of Chromatography* 87(2): 325-331.
- [22] Fausnaugh, JL. Regnier, FE. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Chromatogr* 1986;359:131–46.
- [23] Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN." *Journal of Molecular Biology* 157(1): 105-132
- [24] Köse, K., *Lizozim Saflaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Manyetik Nanoptiküller*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Ankara, 2011.
- [25] Non-ionic adsorption chromatography of proteins. *J. Chromatog.* 159 (1978) 57–69, Hofstee, B.H.J, Otilio, N.F.
- [26] Amersham Pharmacia Biotech, *Hydrophobic Interaction Chromatography Principles and Methods*, sf15, 18-1020-90, Edition AB, 1993.
- [27] Amersham Pharmacia Biotech, *Hydrophobic Interaction Chromatography Principles and Methods*, sf16, 18-1020-90, Edition AB, 1993.
- [28] Jennisen, HP., and Heilmeyer, LM. Jr., (1975). General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes. *Biochemistry* 14, 754-760. PMID: 163642

- [29] Jenissen, HP., (1978). Multivalent interaction chromatography as exemplified by the adsorption and desorption of skeletal muscle enzymes on hydrophobic alkyl-agaroses. *J Chromatogr* 159, 71-833. PDMI: 418077
- [30] Salerno, A., Borzacchiello, R., Netti, P., Pore structure and swelling behavior of porous hydrogels prepared via a thermal reverse-casting technique, 11 agosto 2011
- [31] Porath, J., et al. (1973). Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature* 245, 465-466. PDMI: 4356152
- [32] Halperin, G., Breitenbach, M., Tauber-Finkelstein, M., Shaltiel, S Hydrophobic chromatography on homologous series of alkyl agaroses. A comparison of charged and electrically neutral column materials. *J. Chromatog.* 215 (1981) 211–228,
- [33] The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. Tanfor, C., *John Wiley & sons, New York, 1973.*
- [34] Hjertén, S Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins. Proceedings Intl. *Workshop on Technology for Protein Separation & Improvement of Blood Plasma Fractionation.* Reston, Virginia, 1977, 410–421
- [35] Jenissen, H.P. Multivalent interaction chromatography as exemplified by the adsorption and desorption of skeletal muscle enzymes on hydrophobic alkyl-ligands. *J. Chromatog.* 159 (1978) 71–83
- [36] Parsegian, V.A., Ninham, B.W. Temperature-dependent van der Waals forces. *Biophys. J.* 10 (1970) 664–674
- [37] Visser, J., Strating, M., Separation of lipoamide dehydrogenase isoenzymes by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 384 (1975) 69–80,
- [38] Amersham Pharmacia Biotech, *Hydrophobic Interaction Chromatography Principles and Methods*, sf20, 18-1020-90, Edition AB, 1993.
- [39] Z. Jiang, N. W. Smith, P. D. Ferguson, and M. R. Taylor, “Hydrophilic interaction chromatography using methacrylate-based monolithic capillary column for the separation of polar analytes,” *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 3, pp. 1243-1250, 2007
- [40] Kubin, M.; Spacek, P.; Chromecek, R. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1967, 32, 3881
- [41] Ross, W.D.; Jefferson, R.T. *J. Chromatogr. Sci.* 1970, 8, 386
- [42] Hjertén, S.; Liao, J-L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* 1989, 473, 273
- [43] Svec, F.; Fréchet, J.M.J. *Anal. Chem.* 1992, 64, 820

- [44] Nakanishi, K.; Soga, N. *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, 74, 2518
- [45] F. Svec, *Journal of Separation Science*, 27 (**2004**) 1419-1430
- [46] E. Vlakh, T. Tennikova, *Journal of Separation Science*, 30 (**2007**) 2801-2813.
- [47] E. Vlakh, T. Tennikova, *Journal of Separation Science*, 30 (**2007**) 2801-2813.
- [48] R. Wu, L. Hu, F. Wang, M. Ye, H. Zou, *Journal of Chromatography A*, 1184 (**2008**) 369-392.
- [49] Oberacher, H., Huber, G. C., Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, March **2002**
- [50] Monolithic Technology vs. Particle-Based Technology, <https://www.chromservis.eu/c/more-about-chromatography?offset=130> (Mayıs **2017**)
- [51] MerkChromolithColumn, https://www.emdmillipore.com/CA/en/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/chromolith-hplc-columns/Rk2b.gB.cMMAAAE_hPB3.Lxi,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F (Mayıs **2017**)
- [52] De Phillips , P. and Lenhoff, A. M., Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 883(1-2):39–54, **2000**.
- [53] Liapis, A.I., Meyers, J.J., Crosser, O.K., **1999**, Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths. Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *J.Chromatogr. A.*, 865 (1-2), 13-25.
- [54] D. Schaller, E. F. Hilder and P. R. Haddad, *Journal of Separation Science*, 29, (**2006**) 1705-1719.
- [55] Josic, D., Buchacher, A., Jungbauer, A., **2001**, Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion, *J. Chromatogr. B*, 752, 191–205.
- [56] Armutcu, C. , *Glikoprotein ayrılması için monolitik sıvı kromatografisi kolonları hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, **2011**

- [57] Nakanishi, K. and Soga, N., Phase-separation in gelling silica organic polymersolution - systems containing poly(sodium styrenesulfonate). *Journal of the American Ceramic Society*, 74(10):2518–2530, **1991**.
- [58] Nakanishi, K. and Soga, N., Phase-separation in silica sol-gel system containing polyacrylic-acid .1. gel formation behavior and effect of solvent composition. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 139(1):1–13, **1992**.
- [59] Nakanishi, K. And Soga, N., Phase-separation in silica sol-gel system containing polyacrylic-acid .2. effects of molecular-weight and temperature. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 139(1):14–24, **1992**
- [60] Chromolith HPLC Column, https://www.emdmillipore.com/US/en/analytcs-and-samplepreparation/chromolith-hplccolumns/Z3Sb.qB.jBsAAAFct1Um_MhK.nav, (Mays **2017**)
- [61] Q. Luo, H. Zou, X. Xiao, Z. Guo, L. Kong, X. Wao, *Journal of Chromatography A*, 926 (**2001**) 255-264
- [62] M. Y. Ding, R. Zhang, H. Peng, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37 (**2009**) 395-398
- [63] M. J. Benes, D. Horak, and F. Svec. Methacrylate-based chromatographic media. *J. Sep. Sci.*, 28(15):1855–1875, **2005**.
- [64] Y. Ueki, T. Umemura, J. Li, T. Odake, K. Tsunoda, *Analytical Chemistry*, 76 (**2004**) 7007-7012.
- [65] D. Lee, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Journal of Chromatography A*, 1051 (**2004**)
- [66] Vlakh, E.G. ve Tennikova, T.B., **2007**, Preparation of methacrylate monoliths, *J. Sep. Sci.*, 30, 2801-2813.
- [67] Erol, K., Köse, K., Köse, D. A., Avcı, G. A., Uzun, L., Separation and Purification of Lipase Using Cu Nanoparticle Embedded Poly(HEMA-MATrp) Cryogels. *Hittite Journal of Science and Engineering*, **2014**.
- [68] Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., **2006**, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chem. Eng. Sci.*, 61: 1017-1026.
- [69] Jia, H., Zhu, G., Wang, P., **2003**, Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: The effect of particle mobility, *Biotechnol.Bioeng.*, 84, 406-414.
- [70] Uzun, L., Say, R., Denizli, A., **2005**, Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, *React. Funct. Polym.*, 64, 93-102.

- [71] Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A., Denizli, A., **2005**. Antibody Purification Using Porous Metal-Chelated Monolithic Columns, *J. Appl. Polym. Sci.*, 101, 395-404.
- [72] Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A., **2005**, Synthesis of Phenylalanine-Containing Hydrophobic Beads for Lysozyme Adsorption, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44, 7049-7056
- [73] Zhu, X., Alexandratos, SD., Polystyrene-supported amines: Affinity for mercury(II) as a function of the pendant groups and the Hg(II) counterion. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2005**;44:8605-8610.
- [74] Casey, TJ., Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering, *John Wiley and Sons Ltd, England*, **1997**, pp. 113-114.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Mustafa Deniz AĞLAMAZ
Doğum yeri : Altındağ / Ankara
Doğum tarihi : 20.08.1990
Medeni hali : Bekar
E-posta : denizaglamaz@gmail.com
Adresi : Kızılcaşar Mah. 23 Nisan Cad. No:146 İncek ANKARA

Eğitim

Lisans : Kimya Bölümü, Hacettepe Üniversitesi - Ankara, 2013
Yüksek Lisans : Kimya Bölümü, Hacettepe Üniversitesi - Ankara, 2017

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Okuma, yazma, konuşma - İyi

İş Deneyimi

: Satış Mühendisi / Kimyager, Ant Teknik Cihazlar Paz. ve
Dış. Tic. Ltd. Şti. – Ankara, 2014

Deneyim Alanları

: LC ve GC kolonları, monolitik kolon, kromatografi ve
spektroskopi sarfları.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLIK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 22/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: Antibiyotiklerin Moleküler Baskılama Yöntemi İle Sıvı Kromatografi Sisteminde Ayırımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 74 sayfalık kısmına ilişkin, 22/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'mı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

22/06/2017

Adı Soyadı: Mustafa Deniz AĞLAMAZ
Öğrenci No: N13227687
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)