

**SÜREKLİ VE KESİKLİ SİSTEMLERDE BORAT AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İÇİN SABİT FAZLARIN SENTEZİ
VE AYIRMA PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ**

**SYNTHESIS OF STATIONARY PHASES FOR
BORONATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN
BATCH AND CONTINUOUS SYSTEMS AND
DETERMINATION OF THEIR SEPARATION
PERFORMANCE**

HİLAL GÜLÜŞÜR

PROF. DR. SÜLEYMAN ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. F. ÇİĞDEM KİP

Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

SÜREKLİ VE KESİKLİ SİSTEMLERDE BORAT AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İÇİN SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE AYIRMA PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ

Hilal GÜLÜŞÜR

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Eş Danışman: Doç. Dr. F. Çiğdem KİP

Haziran 2021, 112 sayfa

Borat afinite kromatografisi günümüzde çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında borat afinite kromatografisinde sabit faz olarak kullanılmak üzere monodispers gözenekli silika (SiO_2) ve manyetik silika (MagSiO_2) mikroküreler (MagSiO_2) sentezlenmiştir. Mikrokürelere 3-aminofenilborik asit (APBA) ligandı kovalent olarak bağlanmış sırasıyla APBA bağlı silika mikroküreler (SiO_2APBA) ile APBA bağlı manyetik silika mikroküreler ($\text{MagSiO}_2\text{APBA}$) elde edilmiştir. Sorbentlerin borat afinite kromatografisinde kullanılmak üzere uygunluğu diol grubu içeren ribonükleik asit (RNA) ve β -nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD) biyomoleküllerinin adsorpsiyon desorpsiyon davranışları ile incelenmiştir. Adsorpsiyon çalışmaları pH 8,5'ta ve oda sıcaklığında yürütülmüş, adsorpsiyon tamponu olarak HEPES tamponu kullanılmıştır. SiO_2APBA mikroküreler kullanılarak biyomoleküller

için kantitatif desorpsiyon verimleri elde edilmiş, RNA ve β -NAD için maksimum denge adsorpsiyon değerleri sırasıyla 60 ve 159 mg biyomolekül/g sorbent olarak bulunmuştur.

Desorpsiyon çalışmalarında öncelikle pH 10,2 borat tamponu kullanılmış; desorpsiyon verimlerinin düşük bulunduğu SiO_2APBA mikrokürelerin adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri RNA ve β -NAD için yarışmalı diol olarak farklı miktarlarda sorbitol eklenen pH 7,0 fosfat tamponu ile tekrarlanmıştır. Yarışmalı diol içeren desorpsiyon tamponu ile SiO_2APBA mikrokürelerde kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ise pH 10,2 borat tamponu ile kantitatif desorpsiyon verimlerini sağlamıştır.

SiO_2APBA mikrokürelerin 300 μm çapında mikrokolona doldurulmasıyla ayrıca sürekli sistem çalışmaları yapılmıştır. RNA ve β -NAD biyomolekülleri için farklı başlangıç konsantrasyonları kullanılarak; sürekli sistemde de SiO_2APBA mikroküreler ile tatmin edici izolasyon ve desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. Örneklerde eser miktarlarda bulunan cis-diol grubu içeren biyomoleküllerin oluşturulan sürekli sistem yardımıyla düşük konsantrasyonlarda bile izolasyonunun sağlanabileceği görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen sabit fazların örnek seçilen RNA ve β -NAD biyomoleküllerin üzerinde adsorpsiyon ve desorpsiyon performansları incelenmiş, borat afinite kromatografisi için uygunluğu değerlendirilmiştir. Farklı biyomolekül ve sorbent konsantrasyonlarında alınan sonuçlar önerilen sistemin düşük hacimli örneklerden düşük konsantrasyonlarında bulunan cis-diol gruplu değerli biyomoleküllerin izolasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Borat afinite kromatografisi, fenilborik asit, sabit faz, cis-diol izolasyonu, mikroakışkan sistem, adsorpsiyon-desorpsiyon

ABSTRACT

SYNTHESIS OF STATIONARY PHASES FOR BORONATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN BATCH AND CONTINUOUS SYSTEMS AND DETERMINATION OF THEIR SEPARATION PERFORMANCE

HİLAL GÜLÜŞÜR

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Co- Supervisor: Doç. Dr. F. Çiğdem KİP

June 2021, 112 pages

Boronate affinity chromatography is being widely used in various applications in many different areas. In this study, monodisperse porous silica (SiO_2) and magnetic silica (MagSiO_2) microspheres were synthesized to utilize as a stationary phase in boronate affinity chromatography. The 3-aminophenylboronic acid (APBA) ligand was covalently attached to the microspheres, resulting in APBA-attached silica microspheres (SiO_2APBA) and APBA-attached magnetic silica microspheres ($\text{MagSiO}_2\text{APBA}$). The suitability of sorbents to use in boronate affinity chromatography was investigated through the adsorption-desorption behaviors of two target biomolecules; ribonucleic acid (RNA) and β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD). Adsorption studies were carried out at pH 8.5 and room temperature, HEPES buffer was used as the adsorption

buffer. The maximum equilibrium adsorption for RNA and β -NAD using SiO₂APBA microspheres were found as 60 and 159 mg biomolecules / g sorbent, respectively, with quantitative desorption.

In the beginning, desorption studies run with pH 10.2 borate desorption buffer. Due to low desorption yields, the desorption studies of SiO₂APBA were repeated with pH 7.0 phosphate buffer including different amounts of sorbitol as a competing diol. With the usage of the mild elution medium quantitative desorption efficiencies were obtained with SiO₂APBA microspheres. MagSiO₂APBA microspheres generally achieved quantitative desorption yields with pH 10.2 borate buffer.

Microfluidic system studies were carried out with a 300 μ m diameter microcolumn which is filled with SiO₂APBA microspheres. Different feed concentrations were prepared for both RNA and β -NAD, where satisfactory isolation and desorption yields have been acquired. With the proposed microfluidic system, it is possible to recover valuable cis diol groups even if the sample volume is low.

Consequently, the adsorption desorption behaviors of the stationary phases synthesized were evaluated on RNA and β -NAD biomolecules for the boronate affinity chromatography. The results obtained at different biomolecule and sorbent concentrations indicated that the proposed system is very promising for the isolation of the cis-diol groups at low concentrations from very low volume of samples.

Keywords: Boronate affinity chromatography, phenylboronic acid, stationary phase, cis-diol isolation, microfluidic system, adsorption- desorption.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve tecrübesiyle hep yanımda olan, çalışmalarımın her noktasında sabrıyla ve engin bilgisiyle yol gösteren Saygıdeğer Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali TUNCEL'e;

Doktora Tez İzleme Komiteleri'nde yönlendirmeleriyle bana destek olan, yapıcı yorumları ve güler yüzleriyle beni her zaman motive eden değerli TİK komitesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Tülay DURUSOY ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seda ÖZGEN'e,

Bu süreçte çalışmalarına yaptığı değerli katkılarından ve emeklerinden dolayı eş danışmanım Doç. Dr. F. Çiğdem KİP'e,

Birlikte kısa bir süre de olsa çalışma şansı bulduğum Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan GÖKALTUN'a ve Dr. Öğr. Üyesi K. Özlem HAMALOĞLU'na,

Acı tatlı anılarla aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Teşekkürün asla yeterli olamayacağı canım eşime,

Canım aileme,

Birlikte geçirdiğimiz zamanın kıymetini anlatmak için kelimelerin asla yeterli olmayacağı, arkadaştan öte, canlarım Melda'ya ve Gözde'ye

Ev ve sınıf arkadaşlığıyla başlayan süreçte her zaman beni cesaretlendiren, elimden tutan sevgili arkadaşım Didem'e; sevgi ve desteğini hep yanımda hissettiğim arkadaşım A.Akhtar'a

Bu süreçte desteklerini benden esirgemeyen yöneticilerime ve iş yerindeki arkadaşlarıma,

Tüm kalbim ve en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

HİLAL GÜLÜŞÜR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kromatografi	3
2.1.1. İyon Değişirme Kromatografisi (IEX)	5
2.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC).....	5
2.1.3. Afinite Kromatografisi	6
2.1.3.1. Borat Afinite Kromatografisi	10
2.2. Ekstraksiyon	18
2.2.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)	18
2.2.1.1. Kesikli ve Sürekli Akış Sistemleri	19
2.3. Mikroküre Sentezi	20
2.3.1. Polimerik Mikropartiküllerin Sentezi.....	20
2.3.1.1. Dispersiyon Polimerizasyonu.....	21
2.3.1.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu.....	23

2.3.2.	Silika Mikroküreler.....	25
2.3.3.	Manyetik Silika Mikroküreler	27
2.4.	Biyomoleküller	28
2.4.1.	Ribonükleik asit (RNA).....	28
2.4.2.	β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid (β -NAD)	30
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32
3.1.	Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre Sentezi.....	32
3.1.1.	Materyal.....	32
3.1.2.	Çıkış Lateksi Poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi	32
3.1.3.	Kalıp Olarak Kullanılacak Poli(MAA-Co-EDMA) Polimerik Mikrokürelerin Sentezi	33
3.1.4.	Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre (SiO_2) Sentezi.....	34
3.2.	Manyetik Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre Sentezi.....	35
3.2.1.	Materyal.....	35
3.2.2.	Manyetik Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre (MagSiO_2) Sentezi	35
3.3.	Silika ve Manyetik Silika Mikrokürelere 3-aminofenilborik asit (APBA) Bağlanması.....	36
3.3.1.	Materyal.....	36
3.3.2.	Monodispers Gözenekli Silika Mikrokürelere APBA Bağlanması (SiO_2APBA).....	36
3.3.3.	Monodispers Gözenekli Manyetik Silika Mikrokürelere APBA Bağlanması ($\text{MagSiO}_2\text{APBA}$)	37
3.4.	Silika ve Manyetik Silika Mikrokürelerin Karakterizasyonu	38
3.4.1.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	38

3.4.2.	Yüzey Alanı Ölçümü.....	39
3.4.3.	X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	40
3.4.4.	Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM).....	40
3.5.	Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları	40
3.5.1.	Materyal	40
3.5.2.	Kesikli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları.....	41
3.5.2.1.	pH Etkisi.....	42
3.5.2.2.	Sıcaklık Etkisi	43
3.5.2.3.	Sorbent Konsantrasyonu Etkisi	44
3.5.2.4.	Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi	44
3.5.2.5.	Tekrarlanabilirlik Deneyleri	45
3.5.3.	Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları.....	46
3.6.	Adsorpsiyon İzotermi.....	48
3.6.1.	Langmuir izotermi.....	48
3.6.2.	Freundlich İzotermi	50
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	52
4.1.	Karakterizasyon Çalışmaları	52
4.1.1.	SiO ₂ ve SiO ₂ APBA Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	52
4.1.2.	MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA Mikrokürelerin Karakterizasyonu	56
4.2.	Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları.....	61
4.2.1.	SiO ₂ ve SiO ₂ APBA Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu	61
4.2.1.1.	pH Etkisi.....	61
4.2.1.2.	Sıcaklık Etkisi	63
4.2.1.3.	Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi.....	64

4.2.1.4.	Sorbent Konsantrasyonu Etkisi.....	72
4.2.1.5.	Tekrarlanabilirlik Davranışı.....	76
4.2.2.	SiO ₂ APBA mikroküreler ile kesikli sistemde biyolojik örneklerden RNA izolasyonu [69]	78
4.2.3.	MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu	78
4.2.3.1.	pH Etkisi	79
4.2.3.2.	Sıcaklık Etkisi	80
4.2.3.3.	Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi	81
4.2.3.4.	Sorbent Konsantrasyonu Etkisi.....	88
4.2.3.5.	Tekrarlanabilirlik Davranışı.....	93
4.2.4.	MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA Mikroküreler için Adsorpsiyon İzotermi.	94
4.2.5.	SiO ₂ APBA Mikroküreler ile Sürekli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu ..	96
5.	GENEL SONUÇLAR.....	101
	KAYNAKLAR	104
	EKLER.....	112
	EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	112

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Ligand ve biyomolekül arasındaki etkileşimin şematik gösterimi. (A) Direkt olarak matrise bağlanmış ligand, (B) Matrise uzantı kolu (spacer arm) yardımıyla bağlanmış ligand. Uzantı kolu kullanılmasıyla daha etkili bağlanma görülmektedir [2]. 8
- Şekil 2.2. Afinite kromatografisinin aşamaları. (1) Afinite ortamı tampon çözelti ile şartlanır, dengeye getirilir. (2) Hedef molekülün liganda bağlanmasını sağlayan koşullar altında örnek kolona verilir. (3) Hedef moleküller spesifik ve geri dönüşümlü olarak liganda bağlanırken diğer moleküller kolondan yıkanmış olur. (4) Hedef molekülleri geri kazanmak için ortam koşulları değiştirilir. Yıkama spesifik olarak bir karşı ligand kullanılarak ya da spesifik olmayan şekilde pH, iyonik kuvvet ya da polarite değiştirilerek yapılır. Hedef molekül saflaştırmış ve elde edilmiş olur [13]......9
- Şekil 2.3. Sulu çözelti içerisinde, fenilborik asit ve cis-diol grupları arasındaki esterleşme mekanizması [7]...... 11
- Şekil 2.4. Dispersiyon polimerizasyonunun şematik olarak gösterimi [42]. (A) Dağıtma ortamında monomer, başlatıcı ve stabilizör çözünmüş haldedir. (B) Dağıtma ortamında hala çözünür olan oligomerler oluşmaktadır. (C) Çekirdeklenme basamağıdır. Uzunluk arttıkça polimer zincirleri çöker ve stabilizör tarafından stabil hale getirilen çekirdekler oluşur. Gerekirse çapraz bağlayıcı ajan eklenebilir. (D) Partiküller ortamdaki monomer ve oligomerleri tutarak büyür [42, 43].22
- Şekil 2.5. Gözenekli partiküllerin eldesi için süspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi. İlk basamakta çekirdek oluşturulurken ikinci basamakta çekirdekler önce aktivatör ile ardından yeni bir monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek yapıcı ajanlar ile şişirilir [42]......24
- Şekil 2.7. RNA'nın kimyasal yapısı [59].29
- Şekil 2.8. Örnek bir nükleotit adenozin-5'-trifosfat (ATP)'in şematik yapısı [60]......30
- Şekil 2.9. Sol tarafta bulunan adenin bazı ve sağ tarafta bulunan nikotinamidin fosfat bağı ile bağlandığı β -NAD yapısı [61]......31
- Şekil 3.1. Silika mikrokürelere GPTMS eklenmesinin şematik gösterimi [69]......37

Şekil 3.2. GPTMS ekli kürelere APBA bağlanmasının şematik gösterimi [69].....	37
Şekil 3.3. Diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonunda kullanılan sürekli mikroakış sistemi [69].	46
Şekil 4.1. (A) SiO ₂ ve (B) SiO ₂ APBA mikrokürelerin SEM görüntüleri (Büyütme Oranı: 20.000X) (C) SiO ₂ ve (D) SiO ₂ APBA mikrokürelerin boy dağılımı (Büyütme Oranı: 2.500X) [69].....	53
Şekil 4.2. SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikroküreler için gözenek boyutu dağılım grafiği [69].	54
Şekil 4.3. (A), (B) MagSiO ₂ ve (C), (D) MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme Oranı: (A) 2500X, (B) 20000X, (C) 2500X (D) 17500X.	57
Şekil 4.4. MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikroküreler için gözenek boyutu dağılım grafiği	58
Şekil 4.5. MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin titreşimli örnek magnetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri.	60
Şekil 4.6. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun ortam pH'ı ile değişimi. 50 mM HEPES, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat [69].....	62
Şekil 4.7. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun ortam sıcaklığı ile değişimi. 50 mM MgCl ₂ içeren 1 mL pH 8,5 HEPES adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat [69].	63
Şekil 4.8. Kesikli sistemde SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].	64
Şekil 4.9. Kesikli sistemde SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69]......	68
Şekil 4.10. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].	73

Şekil 4.11. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].	75
Şekil 4.12. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun tekrar sayısı ile değişimi (Adsorpsiyon koşulları: Hacim: 1 mL, Sorbent konsantrasyonu: 10 mg/mL, Ortam: 50mM HEPES buffer+ 50mM MgCl ₂ , pH 8.5. Sıcaklık: 22 °C, Çalkalama hızı: 120 cpm, Süre: 2 saat. Desorpsiyon koşulları: Hacim: 1 mL, Desorpsiyon ortamı: 100 mM fosfat tamponu, pH 7.0 Sorbitol konsantrasyonu: RNA: 100 mM, β-NAD: 200 mM, Sıcaklık: 22 °C, Çalkalama hızı: 120 cpm, Süre: 2 saat [69].	77
Şekil 4.13. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD denge adsorpsiyonunun ortam pH'ı ile değişimi (β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 50 mM MgCl ₂ içeren 1 mL adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat)	79
Şekil 4.14. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun ortam pH'ı ile değişimi (RNA konsantrasyon: 2 mg/mL, 50 mM MgCl ₂ içeren 1 mL adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).	80
Şekil 4.15. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun ortam sıcaklığı ile değişimi (RNA başlangıç konsantrasyonu: 2 mg/mL, 50 mM MgCl ₂ içeren 1 mL pH 8,5 HEPES adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, 120 cpm, 2 saat).	81
Şekil 4.16. Kesikli sistemde MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat)	82
Şekil 4.17. Kesikli sistemde MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç RNA konsantrasyonu ile	

değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).....	85
Şekil 4.18. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).....	89
Şekil 4.19. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).....	91
Şekil 4.20. Kesikli sistemde MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun tekrarlı deney sayısı ile değişimi (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat, β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL ve RNA konsantrasyon: 2 mg/mL).....	93
Şekil 4.21. Mikroakışkan borat afinite sisteminde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sabit faz olarak kullanıldığı durumda mikrokolon çıkış konsantrasyonunun (C, µg/µL) zaman ile değişimi. C ₀ : β-NAD'ın besleme konsantrasyonu, Akış hızı: 5 µL/dk (0,05 µg/µL için 2 µL/dk), Kolon boyutları: 300 µm iç çap x 50 mm uzunluk, Mobil faz: 50 mM pH 8,5 HEPES, 50 mM MgCl ₂ içeren tampon, 22 °C [69]......	97

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çeşitli Kromatografi Türlerinin Ayırma Prensipleri [11, 12].	4
Çizelge 2.2. Afinite kromatografisinde sıklıkla kullanılan biyolojik etkileşimler [11, 12]	7
Çizelge 4.1. SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin boyut ve gözenek özellikleri [69].	54
Çizelge 4.2. SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin XPS kullanılarak elde edilen atomik yüzey kompozisyonu [69].	55
Çizelge 4.3. MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin boyut ve gözenek özellikleri	58
Çizelge 4.4. MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin XPS kullanılarak elde edilen yüzey kompozisyonu verileri.	59
Çizelge 4.5. Kesikli sistemde SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).	65
Çizelge 4.6. SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin sorbitol konsantrasyonu ile değişimi (β-NAD konsantrasyonu:1 mg/mL, sorbitol eklenmiş 1 mL, pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].	66
Çizelge 4.7. Kesikli sistemde SiO ₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi, (200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, MSS < %3) [69].	67
Çizelge 4.8. β-NAD biyomolekülü için SiO ₂ APBA mikroküreler kullanılarak elde edilen desorpsiyon ve izolasyon verimleri (BT: 1 mL, pH 10,2 borat tamponu, FT: 200 mM sorbitol, 1 mL, pH 7 fosfat tamponu) [69].	67

Çizelge 4.9. Kesikli sistemde SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).....	69
Çizelge 4.10. SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin sorbitol konsantrasyonu ile değişimi (Sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].	70
Çizelge 4.11. Kesikli sistemde SiO ₂ ve SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (100 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7,0 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].....	71
Çizelge 4.12. RNA için SiO ₂ APBA mikroküreler kullanılarak farklı desorpsiyon ortamları ile elde edilen izolasyon verimleri. verimleri (BT: 1 mL, pH 10,2 borat tamponu, FT: 200 mM sorbitol, 1 mL, pH 7 fosfat tamponu) [69].	72
Çizelge 4.13. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD % desorpsiyon verimleri (β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, 10 mg sorbent, BT; 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı MSS < % 4, FT; 200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı MSS < % 3, KD: Kantitatif Desorpsiyon) [69].	74
Çizelge 4.14. Kesikli sistemde SiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA % desorpsiyon verimleri (RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, 10 mg sorbent, BT; 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, FT; 200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı) [69].....	76
Çizelge 4.15. Kesikli sistemde MagSiO ₂ ve MagSiO ₂ APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).....	83
Çizelge 4.16. β-NAD için MagSiO ₂ APBA mikroküreler kullanılarak farklı β-NAD başlangıç derişimleri ile elde edilen izolasyon verimleri (%).	84

Çizelge 4.17. Kesikli sistemde MgSiO_2 ve $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).	86
RNA için $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak elde edilen izolasyon verimleri ..	86
Çizelge 4.18. RNA için $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak elde edilen desorpsiyon verimleri (%) ile izolasyon verimleri (%)	87
Çizelge 4.19. Kesikli sistemde $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda % desorpsiyon verimleri (β -NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4)	90
Çizelge 4.20. Kesikli sistemde $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda % desorpsiyon verimleri (RNA konsantrasyon: 2 mg/mL, 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).....	92
Çizelge 4.21. MgSiO_2 ve $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak β -NAD ve RNA biyomolekülleri için elde edilen izoterm parametreleri	95
Çizelge 4.22. Sürekli mikroakış sisteminde SiO_2APBA mikroküreler kullanılarak β -NAD ve RNA için hesaplanan denge adsorpsiyon değerleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri [69].	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
L	: Litre
mg	: Miligram
g	: Gram
mM	: Milimolar
cpm	: Dakikada çalkalama hızı (Circulation/counts per minute)
rpm	: Dakikada dönme hızı (Rounds per minute)
D_n	: Ortalama çap değeri (μm)
D_i	: Çap değeri (μm)
N_i	: D_i değerine sahip mikroküre sayısı
CV	: Değişim katsayısı
N_T	: Toplam mikroküre sayısı
Q	: Adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
A_0	: İnkübasyon ortamının başlangıçtaki absorpsansı
A_f	: Adsorpsiyondan sonra absorpsans değeri
C_0	: Biyomolekülün başlangıç konsantrasyonu (mg/mL)
V	: İnkübasyon çözeltisinin hacmi (mL)
M_s	: Sorbent miktarı (g)
η	: Desorpsiyon verimi (%)
$M_{\text{bm, yüklenen}}$: Mikrokolona yüklenen biyomolekül miktarı (mg)
Q_A	: Adsorpsiyon ortamı akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dak}$)
t	: Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)

C_0	: Adsorpsiyon ortamındaki biyomolekül derişimi (mg/ μ L)
$M_{\text{bm, adsorplanmayan}}$ (mg)	: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin biyomolekül miktarı
V_A	: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (μ L)
C_A (mg/ μ L)	: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin biyomolekül derişimi
Q_e (mg/g)	: Birim adsorban üzerinde adsorplanan maddenin denge derişimi
Q_{max} ajan/g sorbent)	: Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi (mg adsorplanan
b (mL/mg)	: Adsorpsiyon enerjisine bağlı Langmuir adsorpsiyon sabiti
Q_e (mg/g)	: Denge anında birim adsorbent için adsorblanmış molekül miktarı
C_e (mg/L) (mL/mg)	: Denge durumunda çözeltide kalan molekül konsantrasyonu
K_F	: Adsorpsiyon kapasitenin ölçütü olan Freundlich sabiti (L/g)
n	: Adsorpsiyon şiddetinin ölçütü olan Freundlich sabiti
KD	: Kantitatif desorpsiyon

Kısaltmalar

SiO_2	: Silika mikroküre
SiO_2APBA	: APBA bağlanmış silika mikroküre
MagSiO_2	: Manyetik silika mikroküre
$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$: APBA bağlanmış manyetik silika mikroküre
RNA	: Ribonükleik asit
β -NAD	: β nikotinamid adenin dinükleotid
APBA	: 3-aminofenil borik asit
TEOS	: Tetraetoksisilan
EDMA	: Etilen glikol dimetakrilat

PVP-K30	: Poli(vinil pirolidon)
SLS	: Sodyum lauril sülfat
AIBN	: Azobisisobütironitril
EB	: Etil benzen
BPO	: Benzoil peroksit
PVA	: Poli(vinil alkol)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
THF	: Tetrahidrofuran
TBAI	: Tetrabütülamonyum iyodat
GPTMS	: (3-glisidiloksipropil)trimetoksisilan
HEPES	: N-[2-Hidroksietil]piperazin-N-[2-etan sülfonik asit]
PBA	: Fenil borik asit
PDBA	: Fenildiborik asit
FPBA	: 4-formilfenil borik asit
AAPBA	: 3-akrilamidofenilborik asit
poly(HEMA)	: poly(2-hydroxyethylmethacrylate)
PEI	: Polietilenimin
MES	: 2-morfolino-etan sülfonik asit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
VSM	: Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample
Magnetometer)	
BET	: Brunauer-Emmett-Teller

1. GİRİŞ

Ayırma tekniklerinin arasında afinite kromatografisi en yaygın kullanılan tekniklerdendir. Biyoteknoloji ve ilgili birçok alanın gelişmesiyle de daha önemli hale gelmektedir. Biyolojik moleküller iç ve dış yapılarında eşsiz bir set halinde moleküller arası bağlama kuvvetleri içermektedir. Bu da afinite ayrıştırması kavramına bir temel oluşturmaktadır. Bir moleküldeki kuvvetlerin spesifik bir noktası ile başka bir molekülün kuvvetleri ile uygun bir pozisyon oluşturduğunda aralarında bir etkileşim meydana gelebilmektedir. Bu etkileşim yalnızca bu moleküllere özgü olacaktır ve bu spesifik mekanizma moleküler tanınma yardımıyla karşılıklı bir bağlama sistemine dönüştürülebilir. Bu sistem moleküllerden birinin inert bir matrise yerleştirilerek kolona doldurulduğu ve aradaki etkileşim kullanılarak diğer molekülün yakalanması için kullanılacak bir bağlanma sistemidir. Bu şekilde afinite yardımıyla ayırma sağlayan bu teknik kromatik yöntemlerin içerisinde kolay kategoride sınıflandırılmaktadır [1, 2].

Karbonhidratlar, enzimler, glikoprotein – glikopeptidler, nükleik asitler, nükleositler ve RNA gibi diol grubu taşıyan birçok molekül biyolojik işlemlerdeki rollerinden dolayı gün geçtikçe daha fazla öne çıkmaktadır. Örneklerde genelde eser miktarlarda, çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaları ve aynı zamanda izolasyonu zorlaştıran farklı moleküllerin de örnek içerisinde mevcut olması nedeniyle bu moleküllerin spesifik olarak izolasyonu analizler ve yeni teknolojiler için kritik önem taşımaktadır [3, 4]. Diol grubu içeren çeşitli moleküllerin izolasyonunda kullanılan birçok farklı teknik olmasına rağmen borat afinite kromatografisi yeni ve önde gelen tekniklerden biridir. Yöntemin temel prensibi alkali koşullarda borik asitin hidroksil grupları ile biyomoleküllerin diol grupları arasında geri dönüşümlü ester kompleksinin oluşmasıdır. Borik asitlerin spesifik seçiciliğini destekleyen bu özellik ile pH değiştirildiğinde kompleks ayrılır. Bu esterleşmeye dayanarak diol taşıyan moleküllerin uygun materyaller üzerine adsorpsiyonu sağlanabilir [3-7].

Tez kapsamında biyomolekül olarak kullanılan ribonükleik asit (RNA) diğer birçok fonksiyonu yanı sıra genetik materyal transformasyonunda rol oynamaktadır. RNA'nın tanımlanmamış fonksiyon ve özelliklerini anlamak için biyokimyasal ve yapısal analizler umut vericidir ve bu tür bir karakterizasyon için RNA saf halde elde edilmelidir. Geleneksel yöntemlerin zaman alıcılığı ve birçok zaman RNA'nın denatürasyonuna sebep vermesinden dolayı izolasyon için borat afinite kromatografisi, diğer yöntemlere göre avantaj sağlayan etkin bir tekniktir [6].

Bu çalışma kapsamında incelenen diğer bir biyomolekül β -nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD) ise örnek bir nükleotit olarak seçilmiştir. β -NAD, özellikle hidrojen atomları ile elektronların taşınmasında rol alan, canlı organizmalarda bulunan elektron taşıyıcılarının en önemlilerinden biridir. Birçok reaksiyonda görev alan ve yüzlerce enzimin kofaktörü olan β -NAD, özellikle enzim biyosensörleri ve biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesinde önem taşımaktadır [8].

Bu çalışmada borat afinite kromatografisinde sorbent olarak kullanılmak üzere makrogözenek ve mezogözenek dağılımına sahip, mikron boyutlu silika mikroküreler (SiO_2) ile manyetik silika mikroküreler (MagSiO_2) çok basamaklı hidroliz kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Bu mikrokürelere aminofenil borik asit (APBA) bağlanması ile elde edilen mikroküreler (SiO_2APBA ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$) ile RNA ve örnek bir nükleotit olarak seçilen β -NAD üzerinde ayırma performansları uygun kesikli ve sürekli sistemlerde belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromatografi

Gerçek dünyada kullanılan birçok örnek çeşitli kimyasal maddelerden oluşmaktadır. İlaç, kan, kozmetik ve gıda ürünleri gibi birçok örnek aslında kompleks kimyasal karışımlardır. Bu tür örneklerin analizlerine; kandaki ilaç seviyelerinin ölçülmesi, gıdadaki pestisit seviyelerinin belirlenmesi ve benzinin bileşenlerinin tanımlanması gibi birçok örnek gösterilebilir. Kromatografi analiz izolasyon ve saflaştırma işlemlerinin yapıldığı kimyasal laboratuvarların yanısıra hem küçük hem de büyük ölçekli üretim yapan kimya endüstrisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ölçek olarak bir analiz boyunca çok kısa sürelerde 1 nanogramdan bile daha küçük ürünler ayrıştırılabilirken diğer taraftan yüzlerce kilogram büyüklüğünde de ürün ayrıştırılabilmekte ve çeşitli ürünlere işlenebilmektedir. Kromatografi, karmaşık bir karışımda bulunan her bir bileşeni ayırabilen bir tekniktir. Bu ayırmalar dispersiyon, hidrojen bağı ve dipol-dipol kuvvetleri gibi temel moleküller arası etkileşimler tarafından yürütülmektedir. Bu basamakta ayrılan bileşenler tanımlanabilirken ayrıca miktar olarak da ölçülebilir. Kromatografinin her bileşeninin çeşitliliği ve bu işlemin kolaylığı ile bileşenleri ayırma, miktar belirleme ve tanımlama kabiliyetinden dolayı farklı teknikleri ayırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta ve en önemli analiz yöntemlerinden biri olmaktadır [1, 9].

Kromatografi bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması yöntemidir. Sabit faz bir kolona yerleştirilmiş parçacıklardan oluşur ve kromatografi hareketli fazın sabit faz üzerinden geçerken maddelerin değişik hızlarla sürüklenmeleri ya da hareket etmeleri esasına dayanır. Bu hareket farklılığının sebebi moleküllerin tutunma, dağılma, afinite özellikleri ya da molekül ağırlığı farklılıkları olabilir. Ayırma prensibine göre bazı kromatografi türleri Çizelge 2.1’de verilmiştir. Kromatografi tekniği sabit faz, hareketli faz ve ayrılmış moleküllerin toplamı olarak incelenebilir. Hareketli faz her zaman sıvı ya

da gaz iken; sabit faz her zaman katı ya da katı bir dolgu maddesi üzerine adsorbe edilmiş bir tabaka halindedir [10].

Çizelge 2.1. Çeşitli Kromatografi Türlerinin Ayırma Prensipleri [11, 12].

KROMATOĞRAFI	AYIRMA PRENSİBİ
İyon (Anyon/Katyon) Değişirme Kromatografisi	Yük
Hidrofobik/Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi	Hidrofobisite
Ters Faz Kromatografi	Hidrofobisite
Jel Filtrasyon/Boyut Ayırma Kromatografisi	Molekül Boyutu
Afinite Kromatografisi	Moleküler Tanınma
Dağılım Kromatografisi	Dağılım Katsayısı

Kromatografi, biyolojik moleküllerin ve biyofarmasötiklerin saflaştırılmasında diğer yöntemlere avantajlarıyla üstünlük sağlayan, yüksek çözünürlükte bir tekniktir. Benzer özelliklere sahip kompleks karışımlardaki moleküller arasında bile yüksek ayırma verimi sağlayabilir. Ekstraksiyon ve membran filtrasyon tekniklerinden farklı olarak birçok farklı plaka kullanılabilmesinin avantajını taşır. Ayrıca çok seyreltik çözeltilerde, biyomoleküller çok düşük konsantrasyonlarda iken bile biyomoleküllerin seçilip yakalanmasını sağlayan yüksek kapasiteli reçinelerle doldurulabilir. Ayrıca sabit fazlar oldukları yerde kolayca temizlenip rejenere edilebilir. Bunun yanında deneyimle geliştirilmiş olan birçok ekipman ve adsorban sayesinde kromatografik metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır [10].

Analitler ve sabit faz arasındaki non-kovalent etkileşimler kromatografinin çeşidine göre iyonik ya da non-iyonik olabilir. Sabit fazla zayıf bağ yapan bileşenler güçlü bağ yapanlara göre daha hızlı bir şekilde kolondan geçerler. Ayrılacak karışım hareketli fazla beraber kolona yüklenir. Bileşenlerin yıkanarak ayrılması (elüsyon) ya kolondaki bileşiklerin alıkonma süresine göre hareketli faz sabit tutularak ya da sabit faza tutunmuş bileşenlerin ayrılmasını kolaylaştırmak için hareketli faz sürekli değiştirilerek yapılabilir. Kolondan çıkan elüent ise belli bir hacimde toplanarak sürekli analiz edilir [10].

Kromatografi günümüzde polar – apolar, elektriksel yüklü – yüksüz, küçük – büyük makromoleküller gibi geniş bir bileşen kitlesine uygulanabildiğinden dolayı diğer ayırma tekniklerine nazaran daha yaygın olarak kullanılmaktadır [10-12].

2.1.1. İyon Değişirme Kromatografisi (IEX)

İyon değişirme kromatografisi kolaylığı, geniş kitlelere uygulanabilirliği, ölçeklendirmenin mümkün olması ve diğer kromatografik metotlara göre ucuz olmasıyla en yaygın kullanılan kromatografik yöntemlerdendir. Bu yöntemin temeli belli pH ve iyonik kuvvet altında iyon değişirme ligandları ve protein yüzeyindeki yük arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır [10].

İyon değişirme kromatografisi genelde beş ana fazdan oluşmaktadır. Başlangıç aşaması iyon değişirme kolonunun başlangıç tamponu ile pH ve iyonik kuvvet yönünden istenen koşullara getirilmektedir. Bu aşamada iyon değıştiricinin yüklü grupları kolayca değıştirebilecek klorür veya sodyum gibi basit iyonları bağlamaktadır. İkinci aşama örneğın sisteme verilmesi ve ayrılacak iyonların kolona tersinir olarak bağlanması ile devam eder. Kolona bağlanmayan kirlilikler, kolonun başlangıç tamponu ile yıkanması ile kolondan uzaklaştırılır. Üçüncü ve dördüncü fazlar tampon koşulları değıştirilerek bağlı moleküllerin desorpsiyonunu sağlayan elüsyon fazıdır. Elüsyon en kolay haliyle iyonik kuvvet değıştirilmesiyle sağlanabilir, bu durumun alternatifi ise pH değışimidir. Elüsyon pH ya da iyonik kuvvetin sürekli değıştirildiğı aşamalı elüsyon şeklinde de yapılabilir. Bu durumda kolona zayıf bağlı moleküller kolondan ilk ayrılan moleküller olacaktır. Beşinci faz ise rejenerasyon fazıdır ve başlangıç tamponuyla yıkanan kolonun başlangıç koşullarına geri dönmesi sağlanır [13].

2.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)

Hidrofobik etkileşimler biyolojik sistemlerde son derece önemlidir. Ayrıca son derece seçici bu etkileşimler antikor antijen reaksiyonları, enzim katalizi gibi bir çok biyolojik

proseslerde rol oynamaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi biyomolekül üzerindeki apolar gruplarla jel matrise bağlı ligandlar arasındaki etkileşime dayanmaktadır. Protein moleküllerinin tamamen hidrofobik adsorbanlarla etkileşime girebilme özelliği ve bu özelliğin çözeltinin tuz konsantrasyonuna bağlı olması bu yöntemin prensibini oluşturur. İyon değiştirme kromatografisinden sonra yaygın kullanılan bir teknik olmasına rağmen prensipleri tamamen farklıdır. Biyomoleküllerin; proteinlerin hidrofobik kısımlarının ligandlara adsorpsiyonu yüksek tuz konsantrasyonu ile sağlanırken, tuz konsantrasyonunun düşürülmesi bağlı moleküllerin elüsyonunu gerçekleştirecektir. Protein ve ligand arasındaki etkileşimler yumuşak olduğu için bu kromatografi türünde proteinlerin biyolojik aktivitelerini kaybetmeden, doğal yapılarını koruyarak saflaştırılması mümkündür. HIC antikolar, rekombinant protein ve DNA gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında kullanılmakta olup kullanılan tuz çeşidi ve konsantrasyonundan başka ligand miktarı ve tipi, ana matris tipi, pH, sıcaklık gibi parametrelerin de kullanılacak biyomoleküle göre ayarlanması gerekmektedir [10, 14, 15].

2.1.3. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi hedef bir molekülün kolondaki ligand molekül tarafından tanınıp tutulmasını temel alan, biyolojik moleküllerin ayrılması ve analizinde yaygın olarak kullanılan bir sıvı kromatografi yöntemidir. Kullanılmaya başladıktan kısa süre sonra biyomoleküllerin sıcaklık, pH, iyonik kuvvet, tuz gibi parametrelerle çöktürülerek ayrılmasını kullanan geleneksel saflaştırma tekniklerinin yerine geçmiştir. Saflaştırılmak istenen moleküllerin genelde doğal ya da yapay bir moleküle bağlanan özgün bir tanıma grubu olduğundan dolayı protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikor saflaştırılmasında kullanılabilen; biyokimya, eczacılık, biyoteknoloji ve çevre mühendisliği gibi bilimler için geniş bir uygulama alanı oluşturmaktadır [2, 11].

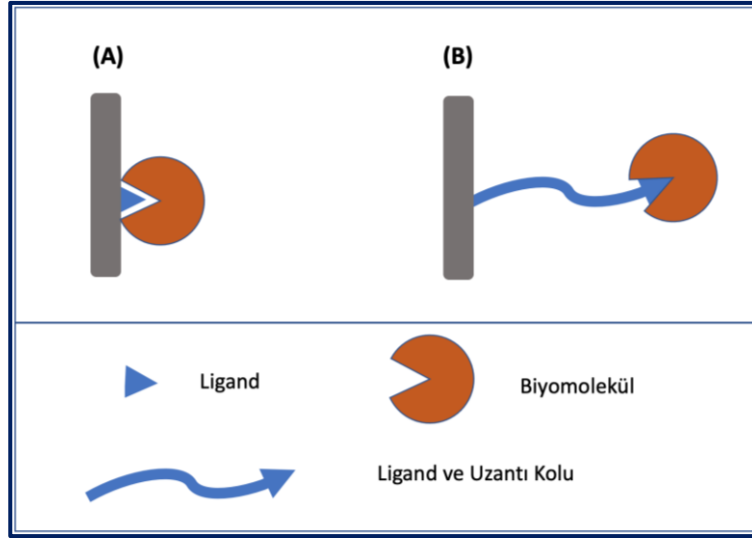
Biyomoleküllerin ayrılması, enzim ve substrat gibi, iki molekül arasında meydana gelen yüksek seçicilikteki biyolojik etkileşimlere dayanır. Bu etkileşimler geri dönüşümlüdür ve ayırma, hedef molekül mobil faz içerisindeyken afinite ligandı adı verilen etkileşen molekülden birinin durgun fazı oluşturan katı bir ortama yerleştirilmesiyle olur. Afinite kromatografisinde saflaştırma için çok çeşitli moleküller kullanılır ve en yaygın kullanılan etkileşimler Çizelge 2.2’de özetlenmiştir. Afinite kromatografisi bu etkileşimlere göre biyoafinite, immunoafinite, lektin afinitesi, borat afinitesi, metal iyonu afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmaktadır. Tüm teknikler istenen molekülün karışımdan ayrılmasını sağlayabilecek yüksek çözünürlüğe sahiptir [11, 12].

Çizelge 2.2. Afinite kromatografisinde sıklıkla kullanılan biyolojik etkileşimler [11, 12]

Ligand Çeşitleri	Hedef Moleküller
Enzim	Substrat benzerleri, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre ve yüzey reseptörleri
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Nükleik asit	Tamamlayıcı baz dizisi, histonlar, nükleik asit bağlayıcı proteinler
Metal iyonları	Polihistidin etiketli proteinler
Boratlar	Katekoller, glikoproteinler, polisakkaritler, diol grupları
Sentetik boyalar	Dehidrojenazlar, kinazlar

Afinite kromatografisinde bir destek materyali (matris), bir bağlayıcı ve bir ligand göz önüne alınmalıdır. Afinite kromatografisinde genellikle agaroz, polimetakrilat, poliakrilamid, selüloz ve silika gibi gözenekli destek malzemeleri kullanılabilir, bu materyaller farklı partikül ve gözenek boyutları ile ticari olarak da temin edilebilir şekildedir. Ayrıca gözeneksiz destekler, membranlar, monolitik destekler gibi başka türlerde destek materyalleri de geliştirilmektedir [2].

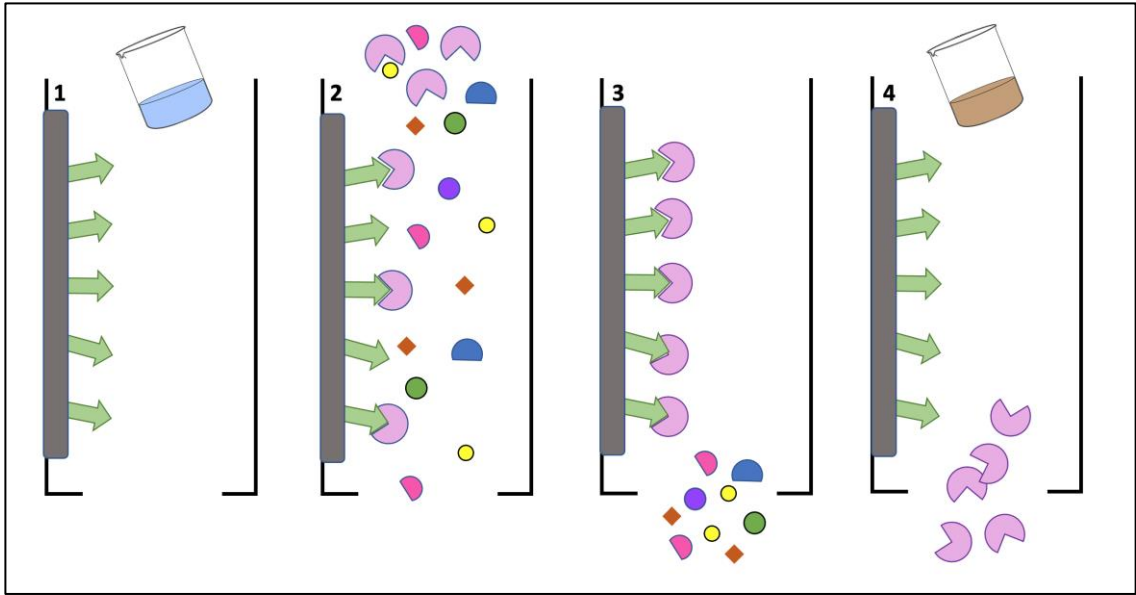
Hedef molekülün bağlanma bölgelerinin bazen derin bir şekilde yerleşmiş olması ve sterik engelden dolayı erişim zor olmaktadır. Verimli bağlanmayı kolaylaştırarak daha etkili bir bağlanma ortamı oluşturmak için genellikle matris ve ligand arasına bir uzantı kolu eklenir (Şekil 2.1). Bu uzantı kolu çok uzun ya da çok kısa olduğunda bağlanmada sıkıntılara ya da spesifik olmayan bağlanmalara neden olabilir, bu yüzden uzantı kolu uzunluğu son derece önemlidir [2].



Şekil 2.1. Ligand ve biyomolekül arasındaki etkileşimin şematik gösterimi. (A) Direkt olarak matrise bağlanmış ligand, (B) Matrise uzantı kolu (spacer arm) yardımıyla bağlanmış ligand. Uzantı kolu kullanılmasıyla daha etkili bağlanma görülmektedir [2].

Bir polimer üzerine immobilize olmuş bir ligand (bu immobilizasyon için genelde kovalent etkileşimler kullanılır) bir kolona doldurulduğu takdirde liganda afinitesi olan yapıları ve diğer maddeleri ayırmak mümkündür. Biyolojik olarak aktif olan maddeler uygun ortamda, sıvı olarak, sıvı fazda çözünmeyen kolondan geçirildiğinde, bu aktif maddeler kolonda tutulurken; liganda afinitesi olmayan maddeler kolondan geçerek uzaklaştırılacaktır. Sonrasında pH, çözücü, sıcaklık benzeri ortam koşulları değiştirilerek kolonda tutulan bileşikler ligandan kolaylıkla ayrıştırılabilir. Sonuç olarak, moleküler tanıma ile afinite kromatografisini birlikte kullanarak aktif bir analiti izole ederek

saflaştırmak mümkündür. Şekil 2.2’de afinite kromatografisinin aşamaları anlatılmıştır [11].



Şekil 2.2. Afinite kromatografisinin aşamaları. (1) Afinite ortamı tampon çözelti ile şartlanır, dengeye getirilir. (2) Hedef molekülün liganda bağlanmasını sağlayan koşullar altında örnek kolona verilir. (3) Hedef moleküller spesifik ve geri dönüşümlü olarak liganda bağlanırken diğer moleküller kolondan yıkanmış olur. (4) Hedef molekülleri geri kazanmak için ortam koşulları değiştirilir. Yıkama spesifik olarak bir karşı ligand kullanılarak ya da spesifik olmayan şekilde pH, iyonik kuvvet ya da polarite değiştirilerek yapılır. Hedef molekül saflaştırmış ve elde edilmiş olur [13].

Afinite kromatografisi kullanımı kolay ve yüksek seçiciliğe sahip bir tekniktir. Ayırmadaki en önemli faktör ligandın afiniteye uygun bir şekilde seçilmesidir ve iyi bir kolon matrisinin de inert, kararlı, rigid yapıda, büyük gözenekli ve hidrofilik olması istenmektedir. Akış hızına, basınca ve ayrılmak istenen moleküle göre agaroz, dekstran, selüloz, silika veya sentetik polimer esaslı destek materyalleri kullanılabilir [16].

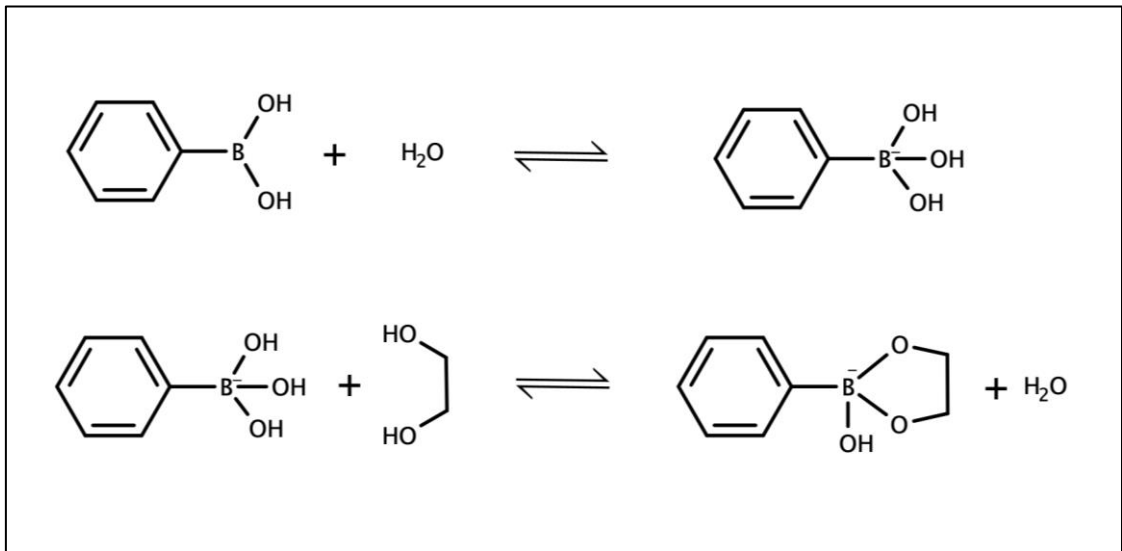
2.1.3.1. Borat Afinite Kromatografisi

Borat afinite kromatografisi ilk olarak 1970 yılında Weith ve arkadaşları [17] tarafından nükleik asit bileşenlerinin ve karbohidratların separasyonu için kullanılmıştır. O zamandan bu yana boratın seçiciliği çok çeşitli çalışmalarda cis-diol içeren bileşiklerin ayrılmasında kullanılmaya devam etmektedir [7]. Borat afinite kromatografisi cis-diol grubu taşıyan biyomoleküllerin tanınması ve ayrılmasında önemli bir role sahiptir. Borat afinite sistemleri yüksek seçiciliği nedeniyle glikoproteinlerin, enzimlerin, nükleositlerin ve karbohidratların ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Cis-diol taşıyan bu bileşiklerin tanınması, ayrılması ve saflaştırılması biyoteknolojik amaçlarla kullanıldıkları için büyük önem taşır [5].

Borat afinite kromatografisinin en basit anlatımı; diol ve borik asit moleküllerinin her yöne hareket ettiği bir çözelti içerisinde, iki molekülün doğru kimya ile birbirine reaksiyon göstererek bağlanmalarıdır. Tabii ki bu durum için birçok faktör devreye girmektedir. Örneğin konsantrasyon ve moleküllerin hareket ettiği bir solüsyonda reaksiyon ihtimali daha fazladır. Aynı zamanda diol grubunun bağlanabilmesi için borik asidin pKa değeri düşük olmalıdır. Borik ester etrafında çok fazla veya daha asidik borik asit grupları ya da tam tersi çok fazla veya daha iyi yapıya sahip dioller bulunuyorsa moleküller kendilerine en uygun şekilde eşleşebilirler [18].

Ortam pH'nın borik asidin pKa değerinden büyük olduğu durumda borik asidin hidroksil grupları ile biyomoleküllerin cis-diol grupları arasında halkalı ester oluşur ve bu esterleşme yöntemin temel prensibini teşkil eder. Kompleks oluşumu ortamın asitlik ya da bazlığına göre değişir ve bu reaksiyon tersinirdir. Borat ve cis-diol etkileşimi için diol grubunun iki hidroksil grubu birbirine komşu karbon atomları üzerinde ve aynı düzlemde olmalıdır. Bu grup 1,2-cis-dioldür ve 1,3-cis-diollerle de etkileşim olmasına rağmen en güçlü ester bağlarını bu grup oluşturur. Borat; normalde üçgen, üç köşeli (trigonal) şekilde iken sulu çözeltilerde, bazik koşullarda hidroksillenerek dört yüzlü (tetrahedral) borat anyonuna dönüşür ve bu şekliyle cis-dioller ile ester oluşturabilir (Şekil 2.3). Ortaya

çıkan bu halkalı diester asidik koşullarda hidrolize olur ve reaksiyonu tersine çevirir. Borik asidin pH'a bağlı bu özelliği moleküler tanı için mükemmel bir avantaj sağlar ve borat afinite kromatografisini cis-diol içeren bileşiklerin spesifik olarak yakalanıp ayrılmasında ideal bir teknik yapar. Bu teknikte ayrıca hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları, aromatik borat ligandında bulunan fenil halkasındaki hidrofobik etkileşimler ve aktif tetrahedral borat üzerindeki negatif yüklerin iyonik etkileşimleri gibi ikincil etkileşimler de ortaya çıkar. Hidrofobik etkileşimler genellikle fenil gruplarından ya da neredeyse tüm borat ligandlarının içerdiği aromatik borat halkalarından kaynaklanmaktadır. İyonik etkileşimler tetrahedral boratın negatif yükünden kaynaklanır ve itici ya da çekici olabilir. Borik asit iki (aktif tetrahedral formda üç) adet hidroksil bulundurduğundan hidrojen bağları için uygun bölgeler bulundurur. Bu etkileşimler analitlerin spesifik olmayan adsorpsiyonlarına neden olabilir [7, 19, 20].



Şekil 2.3. Sulu çözelti içerisinde, fenilborik asit ve cis-diol grupları arasındaki esterleşme mekanizması [7].

Borat afinite kromatografisinin uygulandığı biyomoleküller; karbonhidratlar, nükleosit, nükleotid ve nükleik asitler, glikoprotein ve enzimler, bunların dışarısında kalan diğer küçük moleküller olmak üzere dört ana grupta incelenebilir [7].

Cis-diol içeren karbonhidratlar, borat afinite jellerine bağlanabilir ve bağlanma kuvveti, molekül içerisinde bulunan cis-diollerin sayısı ile orantılıdır. 1960'lı yıllarda Bourne ve arkadaşları [21], kağıt kromatografisinde çözücülere fenilborik asit ekleyerek, cis-diol veya cis-triollere sahip olan şekerlerin hareketliliğini artırabildiğini bulmuşlardır. Bu durum oluşan borat esterlerine dayandırılmıştır. Borat afinite kromatografisinde, monosakaritlerin ve oligosakaritlerin ayrılmasında borat kısmına güçlü şekilde bağlanan cis-1,2-diol bağı içeren bileşiklerden de yardım alınmaktadır. Güçlü bağlanmalarından dolayı, sorbitol veya mannitol gibi karbonhidratlar sıklıkla çeşitli analitlerin elüsyonunda yarışmalı dioller olarak kullanılmaktadır. Glikosidik bağları cis-diol sayılarını azalttığından polisakkaritler monosakkarit bileşenlerinden daha kısıtlıdır. Pek çok yaygın polisakkaritin (nişasta, agaroz, metilselüloz gibi) borat ile etkileşime girmemesinin nedeni bu olabilir [7, 22].

Riboz molekülünün 2', 3' pozisyonunda borat ile güçlü etkileşimlere neden olan 1,2- cis-diol grupları bulunmaktadır, bu nedenle, borat afinite kromatografisi, ribonükleozidlerin, ribonükleotitlerin ve RNA'nın ayrılmasında başarıyla kullanılmıştır. Ayrıca deoksiribonükleik asitte (DNA) 3'-hidroksil grubu bulunmadığından borat grupları ile esterleşemez, bu yüzden borat afinite kromatografisi ile RNA, DNA'dan kolaylıkla ayrılabilir. Oligonükleotitler ve büyük RNA molekülleri sadece 3'-terminalinde cis-diol içerdiği için borat jellere bağlanmaları zayıftır. Zincir uzunluğu arttıkça bağlanma kuvveti düşer. NAD(H), NADP(H) ve FAD gibi dinükleotit kofaktörleri birden fazla erişilebilir cis-diol içerdiğinden, borat gruplarına mononükleitlerden veya oligonükleotitlerden daha güçlü bağlanırlar [7].

Borat afinite kromatografisinin en önemli kullanım alanlarından biri diyabetin yönetilmesinde önemli bir gösterge olan glikozile hemoglobinin glikozile olmayan hemoglobinden ayrılmasıdır. Normalde borat ile etkileşime girmeyen proteinlerin izolasyonunda ligand aracılı kromatografi kullanılabilir. Bu işlemde borat kolonu önce cis-diol içeren bir afinite ligandı ile doyurulur. Kolona beslenen çözeltideki diğer tüm proteinler kolondan yıkanırken hedef protein ligand ile etkileşime girerek kolonda tutulur

ya da geciktirilir. Kolonun tampon ya da yarışmalı cis-dioller ile yıkanması sonucu bağlanmış hedef protein desorbe edilir [7, 23].

Birbirine bağlı çeşitli monosakaritlerin oluşturduğu glikanlar, birçok proteinde dolayısıyla glikoproteinlerde bulunur. Kompleks karışımlardan glikoproteinlerin geri dönüşümlü olarak ayrıştırılması için bu bileşiklerin teşhis, analiz veya saflaştırılmasını kolaylaştıracak borik asit gruplarını içeren çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Ayrıca borik asitle işlevselleştirilmiş yüzeyler üzerinde immobilize edilmiş glikoproteinler, yüzeye bağlı antikoların kullanımı yoluyla antijenlerin saptanması gibi, bu glikoproteinlerin özelliklerine dayanan başka uygulamaları da mümkün kılar. Bunun yanında glikanlar hücre yüzeylerinde de bulunduğundan, yüzeylerinde belirli glikanları gösteren kanser hücrelerinin tespiti veya yakalanması için borik asit içeren malzemeler geliştirilmektedir [18].

Borat afinite kromatografisi ile izole edilebilen düşük molekül ağırlıklı moleküllerin başında katekolaminleri (dopamine, epinefrin, norepinefrin gibi) içeren katekoller gelir [7]. Fonksiyonel grupların moleküller arası etkileşimlerinin anlaşılmasıyla moleküler bazda tanıya olanak sağlayan seçici reseptörler geliştirilmektedir. Borik asitler bu fonksiyonel grupların en önemlilerindedir ve karbonhidrat, glikoprotein, nükleosit gibi bileşiklerin cis-diol grupları ile oluşturduğu borat esteri ile birçok biyosensör uygulamasında kullanılabilir. Son zamanlarda spesifik şekerler için seçici olması amacıyla borik asit bazlı sensörlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Sıklıkla kan şekerinin ve insülin düzeyinin düzenli izlenmesini gerektiren tip-1 diyabetin teşhisi, takibi ve hatta tedavisi başta olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada sıcaklığa ve sakkaritlere duyarlı hidrojel, sensor ve nanomalzemeleri içeren makromoleküller kullanılmaktadır [4, 7, 24, 25].

Borik asitler aynı zamanda hücre yüzeyindeki glikoproteinlerin diollerini ile etkileşimlerinden dolayı hücrelerle güçlü şekilde etkileşebilecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde de kullanılabilirler. İlaç taşıyıcı sistemler alanında özellikle hedeflenen

moleküllere duyarlı; özellikle kan şekerleri ya da katekoller gibi belli biyoanalitlerin varlığında ilacı bırakabilen materyallerin geliştirilebilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Borik asitlerin dioller ile oluşturdukları denge komplekslerinin sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve yarışmalı diol içeriği gibi parametrelere bağlı olması bu konuda avantaj sağlamaktadır. Yukarıda belirtilen sensörlerin yanı sıra artan kan şekeri konsantrasyonuna yanıt olarak insülini serbest bırakan materyallerin tasarlanmasında borik asitler şeker bağlama parçaları olarak kullanılabilir. Kataoka ve arkadaşları insülini borik asit grupları içeren bir jel içerisine hapsederek glikoz ile karşılaştığında bırakılmasını sağlayan bir sistem geliştirmiş ve bu ilke üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır [26, 27].

Borik asitler, çok yaygın olmamakla birlikte gen terapisi alanında vektörün hedefleyici bileşene bağlanmasında da kullanılmıştır ve bu teknikteki en büyük sınırlayıcı faktör, iletim vektörünün seçimidir. Hem hücresel düzeyde hem de bir bütün olarak organizmada olumsuz etkiler yaratmayacak güvenli ve etkili gen iletim vektörleri oluşturulmalıdır. Viral vektörler verimli olmalarına rağmen oluşturulma ve hedeflemede zorluk, toksisite gibi dezavantajları vardır ve bu sınırlamaları aşmak için de viral olmayan vektörlerden yararlanılmaktadır. Viral olmayan vektörlerde DNA ile polietilenimin (PEI) gibi polimerler kullanılmaktadır. Buradaki sorun hedeflenmeden gönderilen vektörlerin akciğerlerde birikmesidir ve bu sorun için en iyi çözüm vektörün tümöre özgü bir belirtece hedeflenmesi olabilir. Moffat ve arkadaşları fenildiborik asit (PDBA) ve diol içeren salisilhidroksamik asit (SHA) arasındaki afiniteden de yararlanarak tümöre spesifik olarak verilebilecek yeni bir PEI/DNA vektörü geliştirilmesi için çalışmalar yapmıştır. Vektörün hedefleyici peptide bağlanmasında ve bütünlüğünün korunmasında borat diol arasındaki güçlü afiniteden destek alınmış, oluşturulan yeni materyal fareler üzerinde tümör çalışmalarda kullanılmıştır. Grup sonraki çalışmalarını insan prostat kanseri üzerinde devam ettirmiştir. PDBA ve SHA kompleksinin pH gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişen sulu çözeltilerde kararlı olması, onu biyolojik makromolekül çalışmalarında kullanılmaya uygun hale getirmektedir [28-31].

Okutucu ve arkadaşları nükleosit izolasyonunda kullanmak üzere poly(2-hidroxyetilmetakrilat) [poli(HEMA)] nanopartikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve fenil borik asit (PBA) ligandı ile fonksiyonel hale getirmiştir. Bu eşboyutlu küresel partiküller gözeneksiz ve yaklaşık 200 nm çapındadır. Adsorpsiyon çalışmaları biyomolekül miktarı, pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet parametreleri değiştirilerek yapılmıştır. Maksimum nükleosit adsorpsiyonu pH 6'da MES (2-morfolinoetan sülfonik asit) tamponunda elde edilmiştir. Maksimum nükleosit kapasitesi 0,1 nM nükleosit konsantrasyonu için 35,6 mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur [5].

Özdemir ve arkadaşları katekollerin izolasyonu için borik asit ile fonksiyonelleştirilmiş poli(3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat) polimerik mikrokürelere yeni bir alternatif sorbent olarak kullanmıştır. Katekoller fenil halkaları içeren ve vücutta önemli fizyolojik rolleri olan biyolojik amin gruplarıdır, dopamin (DA), epinefrin (E) ve norepinefrin (NE) bu gruba dahildir. Katekoller, belli hastalıkların tanı ve tedavisinde biyomarker olarak kullanılırlar ve bu yanlarıyla izolasyonları birçok araştırmaya temel oluşturur. Bu çalışmada Poli(HPMA-Cl) mikrokürelere süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve amid bağları ile kovalent olarak APBA bağlanmıştır. APBA ile fonksiyonelleştirilmiş bu kürelerin ortalama boyutu $205 \pm 35 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. pH 8,5'ta katekolaminlerin bağlanma kapasitelerinin başlangıç katekolamin içeriğiyle doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiş ve maximum bağlanma kapasiteleri gram adsorbent başına dopamin için 61 mg, epinefrin için 7 mg ve norepinefrin için 8 mg olarak bulunmuştur. Salım çalışmalarında adsorbe edilen katekolaminlerin asidik solüsyonda (pH 5) kolaylıkla %90'a varan oranlarda bırakıldığı gözlenmiştir [24].

Gao ve arkadaşları cis-diol içeren bileşiklerin izolasyonunda kullanılan teknikler arasında lektin ve antikor kullanılanların hazırlaması zor olmasının yanısıra kararsız olduğunu, hidrofilik etkileşim kromatografisinde ise seçiciliğin düşük olduğunu belirtmişler ve bu tekniklerle karşılaştırılarak borat afinite kromatografisinin düşük maliyetli, pH değişimi ile kolayca ayarlanabilen seçiciliği yüksek bir yöntem olarak tanıtmışlardır. Çalışmalarında dendrimer ile modifiye edilen bir borat afinite materyali kullanmışlardır.

Ana yapı olarak kullanılan küresel silika partiküller ticari olarak elde edilmiş; PAMAM ve FPBA (4-formilfenil borik asit) ile fonksiyonelleştirilen materyal yardımıyla katekol, dopamin ve adrenalin izolasyonu incelenmiştir. Dendrimer kullanılması ile amin gruplarının artırılması ve dolayısıyla borat grupları ile fazla sayıda bağlanma noktaları elde edilmesi amaçlanmıştır. Fonksiyonel grupların yoğunluğu, yüksek çözünürlükleri ile dendrimerlerin adsorban olarak kullanışlı olduğu belirtilmiştir. 3 bileşiğin 0–1500 mg/mL aralığında farklı konsantrasyonları incelenmiş, adsorpsiyon kapasitelerinin platoya ulaşmaya kadar arttığı ve plato noktasında maksimum adsorpsiyon kapasiteleri birim partikül başına katekol için 74,52 mg/g, dopamin için 118,15 mg/g ve adrenalin için 141,06 mg/g olarak bulunmuştur. Sonuç olarak hazırlanan adsorbanın yüksek seçicilik ve bağlanma kapasitesi gösterdiği belirtilmiştir [32].

Ma ve arkadaşları birçok alanda kullanılan membran separasyonunu borat afinite kromatografisine uygulamak istemiş ve bunun için 4-formilfenilborik asit ile fonksiyonelleştirilmiş polietilenamin (PEI) ekli selüloz membranlar kullanmışlardır. Cis diol içeren biyomolekül olarak katekol, salbütamol sülfat, dopamin ve adenozin kullanılmış ve maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 56,26 mg/g, 34,75 mg/g, 72,45 mg/g ve 32,07 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon tamponu olarak; hafif alkali bir ortamın halkalı ester yapısının oluşmasında rol oynadığı göz önünde bulundurularak pH 8,0 fosfat tamponu kullanılmıştır. Literatür ile karşılaştırıldığında yüksek adsorpsiyon kapasiteleri veren materyalin kütle transfer hızının yüksek olmasından dolayı adsorpsiyonun 1 dk gibi kısa bir sürede dengeye ulaşması ve tekrar kullanılabilirliğinin birçok denemeden sonra hala yüksek değerler vermesi ile cis diol içeren biyomoleküllerin izolasyonunda umut verici olduğu belirtilmiştir [33].

Manyetik özellikli birçok malzeme de son zamanlarda borat afinite uygulamalarında kullanılmaktadır. Dhadge ve arkadaşları spesifik olmayan bağları elemine etmek için demir oksit partikülleri dekstran ile kaplamış, daha sonra da farklı yöntemler kullanarak APBA ile fonksiyonel hale getirmiştir. APBA bağlı bu partiküller antikörlerin ayrılmasında kullanılmıştır. Sentezlenen bu partiküllerin 173 mg antikör/g partikül

adsorpladığı ve elüsyonda ise antikorların %95'inin geri kazanıldığı gözlemlenmiştir. Ticari olarak elde edilen bazı manyetik partiküllerin deneysel olarak 109 mg/g partikül adsorpladığını göz önüne alarak ve diğer çalışmalarla karşılaştırarak sentezlenen partiküllerin antikor saflaştırılmasında iyi bir potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir [34].

Du ve arkadaşları 4-formilfenilborik asit (FPBA) ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartikülleri sentezlemiş ve diol içeren moleküller üzerinde ekstraksiyon kapasitelerini ölçmüşlerdir. Seçiciliğin ölçülmesi için hem diol içeren hem de içermeyen moleküllerin karışımı sisteme verilmiş ve analiz edilmiştir. Spesifik adsorpsiyonun gözlenmesi için diol içermeyen moleküllerin konsantrasyonu diol içeren katekol ve dopaminin 5 katı olarak karışım içerisine eklenmiştir. Ekstraksiyon sonrası elüent HPLC ile analiz edildiğinde diol içermeyen moleküllerin tamamına yakının sistemden uzaklaştırıldığı görülmüştür. Maksimum ekstraksiyon kapasiteleri dopamin için 12,35 mg/g ve katekol için 7,27 mg/g olarak bulunmuştur ve önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında cis diol içeren moleküllerin spesifik ayrılmasında kullanılabilir bir yöntem olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra biyolojik örnek üzerinde de çalışma yapan grup gerçek örnekler içerisindeki iz miktardaki cis diol içeren moleküllerin teşhisinde ve zenginleştirilmesinde de de potansiyel bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir [35].

Zhang ve arkadaşları glikoproteinler üzerinde bağlanma kapasitelerini test etmek üzere farklı oranlarda monomerlerin kombine edilmesiyle 3-akrilamidofenilborik asit (AAPBA) ve kopolimer ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller sentezlemiştir. Model analitler olarak ovalbumin ve transferrin kullanılmıştır. Farklı monomerler ile pH 9,0'da yapılan deneylerde bağlanma kapasiteleri sırasıyla 150-350 mg/g ve 80-230 mg/g arasında; fizyolojik pH 7,4'te ise 110-320 mg/g ve 45-200 mg/g olarak bulunmuştur. Sentezlenen malzemenin pH 9,0'da ve hatta 7,4'te bile glikoproteinlere karşı yüksek seçicilik gösterdiği gözlemlenmiş ayrıca manyetik olan nanopartiküllerin manyetik alan uygulanmasıyla tekrar kullanımı ya da geridönüşümünün mümkün olabileceği belirtilmiştir [36].

2.2. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon en basit tabiriyle bir ya da daha fazla bileşimin bir fazdan diğerine hareket etmesidir. Entropinin separasyon ile değil karışımlar ile arttığını göz önüne alındığında; ekstraksiyon metotları dengeye ulaşımın sağlanmasını baz alarak geliştirilmiştir [1].

2.2.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyonu; analitlerin izolasyonu için kullanılan, gaz veya sıvı ortamdan katı faz sorbenti üzerine aktarılıp tutunması sağlayan bir yöntemdir. SPE’de örnek çözelti ekstraksiyon cihazından geçerken, bileşenleri seçici ve geri dönüşümlü olarak yakalamak için katı destek materyali üzerinde bulunan bir katı ya da sıvı faz kullanılır. Sorbentin numuneden ayrılmasından sonra analitler desorpsiyon yoluyla geri kazanılır. SPE benzer prensipleri sebebiyle kabaca bir kromatografik yöntem olarak düşünülebilir ve kromatografide kullanılan birçok sabit faz bu yöntemde kullanılabilir. Mikroakışkan kanallarda, özellikle afinite kromatografi sistemleri ile birlikte kullanılan bir tekniktir. Seçici sabit fazlar analitlerin ayrılmasında iyonik veya hidrojen bağları, dipol etkileşimleri ya da dispersiyon kaynaklı güçleri kullanabilir. SPE ekstraksiyonu seçiciliği arttırmasının yanı sıra hızlı ve verimlidir [1].

Katı faz mikro ekstraksiyonu (SPME); SPE’nin daha özel bir versiyonu olan bir tekniktir. SPME ile küçük bir fiber üzerine kaplanan sorbent fazı numune ile temas eder. Ekstrakte edilen çözülmüş madde birçok durumda doğrudan kromatografik bir sistem ile fiberden ayrıştırılabilir. Bu teknik doğrudan analitik kromatografi ile birleştirilebilir, bu durumda tüm çözülmüş maddenin kromatografik sisteme verilmesi ve sistemin solvent gerektirmemesi sağlanabilir. SPME’nin avantajı, ekstraksiyonun doğrudan analitik kromatografi ile birleştirilmesidir. Böylece çözücünün tümü kromatografik sisteme eklenir ve sistemin solventsiz olması sağlanabilir [1].

SPE günümüzde örneklerde küçük miktarlarda bulunan analitlerin biyolojik sıvılar içerisinde derişik hale getirilmesi ve saflaştırılması için tercih edilen bir yöntemdir. SPE'nin spesifik başka bir çeşidi olan manyetik katı faz ekstraksiyonu (MSPE) ise hedef analitlerin derişik hale getirilmesi için manyetik sorbentleri kullanan bir tekniktir. MSPE geleneksel SPE'den farklı olarak sorbentlerin herhangi bir cihaz içerisinde paketlenmiş halde olması gerekmediği için çeşitli malzemelerin ayrılması için geniş bir alanda uygulanmaktadır. Bu yüzden manyetik bir çekirdek üzerine polimer ya da silika kaplanarak oluşturulan sorbentler ilgi çekici hale gelmiştir. Özellikle silika yüzeyler hem kolayca aktif hale getirilebilmeleri hem de üzerlerinde bol miktarda bulunan Si-OH grupları ile çeşitli fonksiyonel grupları tutabilmeleri ile ön plana çıkmıştır [37].

2.2.1.1. Kesikli ve Sürekli Akış Sistemleri

Ekstraksiyonları sınıflandırırken işlem modu kesikli ve sürekli olarak iki şekilde izlenebilir. Kesikli ve sürekli modlar örneğin sisteme besleme şeklini anlatır. Çoğu analitik işlem kesikli mod kullanılarak gerçekleştirilir ve genelde iki faz arasındaki çözünme oranı yüksek olmalıdır. Kesikli sistemlerde dağılım oranı, çözünürlük gibi fiziksel kimyasal özellikler incelenirken dikkat gösterilmeli, birçok değer sıcaklığın fonksiyonu olarak değiştiğinden ekstraksiyon ve örnekleme aynı sıcaklıkta gerçekleşmelidir [1].

Oranlar küçük olduğunda, ayrıca birçok üretim ölçekli sistemlerde sürekli sistemler kullanılır. Sürekli sistemler sürekli birbirinden geçen iki faz olduğu için aynı zamanda dinamiktir. Yüksek verimli sürekli ekstraksiyonlar fazların viskozitesine, denge oranlarına, dağılım oranlarına, çözücü hacimlerine ve fazlar arasındaki yüzey/temas alanına bağlıdır [1].

Örneklerin adsorpsiyonunda koşulların hedef molekül ve ligand arasındaki etkileşimin maksimum olması istenir. Bağlanma verimi etkileşimin kuvveti ve kinetiği ile ilişkilidir bu da biyomolekül miktarına, konsantrasyonuna ve çözeltinin akış hızına bağlıdır.

Bağlanma sürekli ya da kesikli biçimde olabilir. Kesikli sistemde sabit faz ve örnek sürekli karıştırıldığı için hedef ve ligand arasında maksimum temas sağlanır. Özellikle büyük hacimlerde zaman kazandıran bu işlem kullanılan sabit faz miktarı için optimizasyona gerek duyar. Yüksek miktardaki sabit faz elüsyon sırasında tekrar adsorpsiyon nedeniyle azalan hedef gerikazanımına neden olurken, spesifik olmayan bağlanmaları da arttırabilir. Bu gibi durumlarda sabit fazın bağlı hedef ile doyurulması tavsiye edilir. Sürekli sistem akış hızının ayarlanmasına ve dolayısıyla hedef ligand etkileşiminin süresini uzatmaya izin verir. Yüksek akış hızları özellikle hedef-ligand etkileşimi zayıf olduğunda ya da kolondaki kütle transferi yavaş olduğunda bağlanma verimini düşürür. Bunun yanısıra mikroakışkan sürekli sistemler kesikli sistemlere göre daha az reaktif kullanımı, hızlı tepki süresi ve yüksek verim gibi avantajlara sahiptir [1, 2, 38].

2.3. Mikroküre Sentezi

2.3.1. Polimerik Mikropartiküllerin Sentezi

Mikropartiküller 1-1000 µm arasında boyutlara sahip yapılardır. Polimer mikro ve nanopartiküllerin hazırlanmasında 3 ana teknik kullanılmaktadır.

1. Emülsiyon Polimerizasyonu
2. Dispersiyon polimerizasyonu
3. Süspansiyon polimerizasyonu

Genelde polimerizasyon terimleri karışımının ana fazı, partikül oluşum mekanizması, polimerizasyon kinetikleri ve son basamakta oluşan polimer partiküllerin boyut ve şekli ile ayrıştırılır [39, 40].

Tez kapsamında polimerik mikroküre sentezinde dispersiyon ve çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu kullanılmış, dolayısıyla bu tekniklerin detayları açıklanmıştır.

2.3.1.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

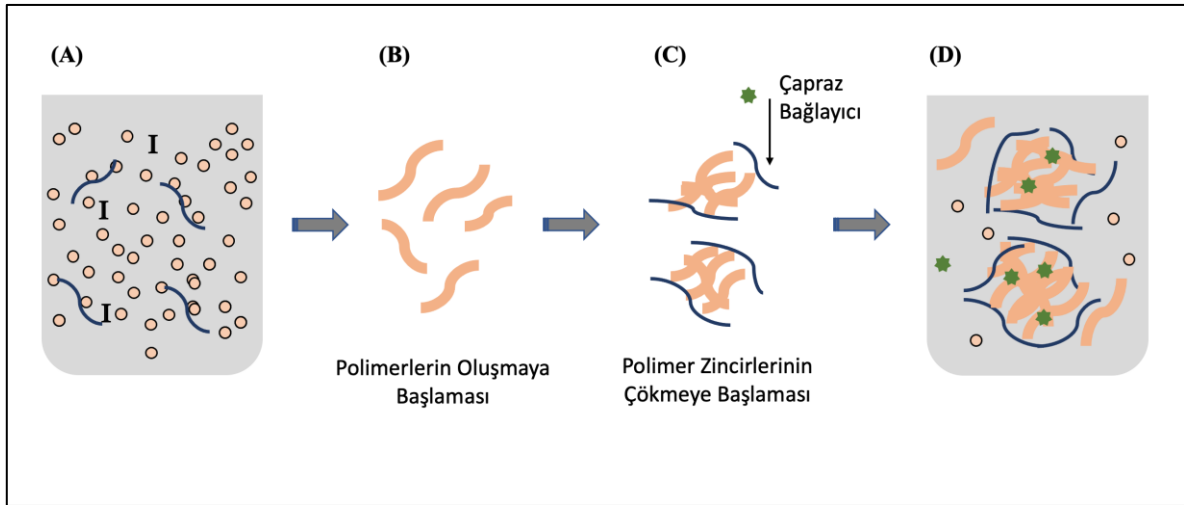
Dispersiyon polimerizasyonu, boyutu 500 – 5000 nm arasında olan monodispers formda polimerik partikül sentezi için kullanılır. Genel olarak monomerin organik bir dağıtma ortamında çözünmesiyle polimerizasyon gerçekleşir. Reaksiyon ortamında çözünebilen, uygun bir polimerik stabilizatör varlığında monomer polimerizasyonu olarak da tanımlanabilir. Reaksiyon ortamı olarak seçilen solvent monomer ve stabilizör için iyi bir çözücü olmalı fakat bu solvent oluşan polimeri çözmemelidir. Bileşenlerin (stabilizatör, başlatıcı) türleri ve derişimleri, dağıtma ortamının türü ve bileşimi, monomerin dağıtma ortamına hacimsel oranı, polimerizasyon sıcaklığı ile karıştırma hızı ve şekli gibi faktörler partikül boyu, boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü gibi birçok özelliği etkiler [41, 42].

Dispersiyon polimerizasyonu için ana bileşenleri monomer (monomer, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı), polimerik formda stabilizatör, başlatıcı ve bir dağıtma ortamından (alkol, alkol/su karışımı) oluşturur. Genel olarak dispersiyon polimerizasyonu, monomer ve başlatıcının dağıtma ortamıyla homojen karışımından polimer parçacıklarının çökmesiyle oluşur. Parçacıkların başlangıçta homojen bu ortamdan doğması faz ayrışması ya da faz inversiyonu adını alır. İlk parçacıkların oluşumu çekirdeklenme basamağıdır ve ortaya çıkan partiküller büyüyerek monodispers hale gelir. Stabilizör başlatıcıyla aynı yükü taşımaları ya da nötral olmalıdır. Başka türlü bir kombinasyonda birbirlerini nötral forma dönüştürmelerin ötürü bloklaşma oluşturular [42].

Başlatıcı dağıtma ortamına eklendiğinde başlatıcı radikalleri oluşmaya başlar. Bu radikaller monomer molekülleri ile reaksiyona girer ve başlatıcı-monomer radikalleri ortaya çıkar. Bu oligomerik radikaller monomer moleküllerinin eklenmesiyle uzar ve uzadıkça da polariteleri düşer. Dağıtma ortamları genelde polar ortamlardır. Ortamda polaritesi azalarak büyüyen bu zincir belli bir kritik molekül ağırlığına ulaştığı anda ortamda çözünmez hale gelir. Bu durumda bu zincirler kendi etraflarında toplanarak

homojen ortamda çökmeye başlarlar. Ortamdaki stabilizör birbirleriyle birleşmelerini engeller. Oligomerik radikaller polimerik yapıdaki stabilizör moleküllerinin üzerine çöker, oligomerik zincir ile stabilizör moleküllerinin birbiri içerisine geçmesinden bir yumak meydana gelir. Büyüyen oligomerik zincirlerin faz separasyonu yoluyla dağıtma ortamından ayrılıp partikül haline geldiği bu ana çekirdeklenme adı verilir. Daha sonra monomer difüzyonu ile polimerizasyon devam eder ve bir süre sonra ortamdaki bütün monomerler oluşan zincirler tarafından absorblanır.

Çekirdeklenme basamağının hızlı gerçekleşmesi ve ani olması istenir. Belirli sayıda partikül oluşuktan sonra monomerlerin tamamı dönüşüncüye, polimerizasyon sonuna kadar ortamdaki partikül sayısı değişmez. Ortamda çözülmüş monomerler ortamdaki partiküllere eşit bir şekilde dağılır ve monodispers polimerik partiküller elde edilmiş olur. Lateks görünümünde sıvı ortamda dağılmış monodispers polimerik partikülleri içeren bir görünüm elde edilir.

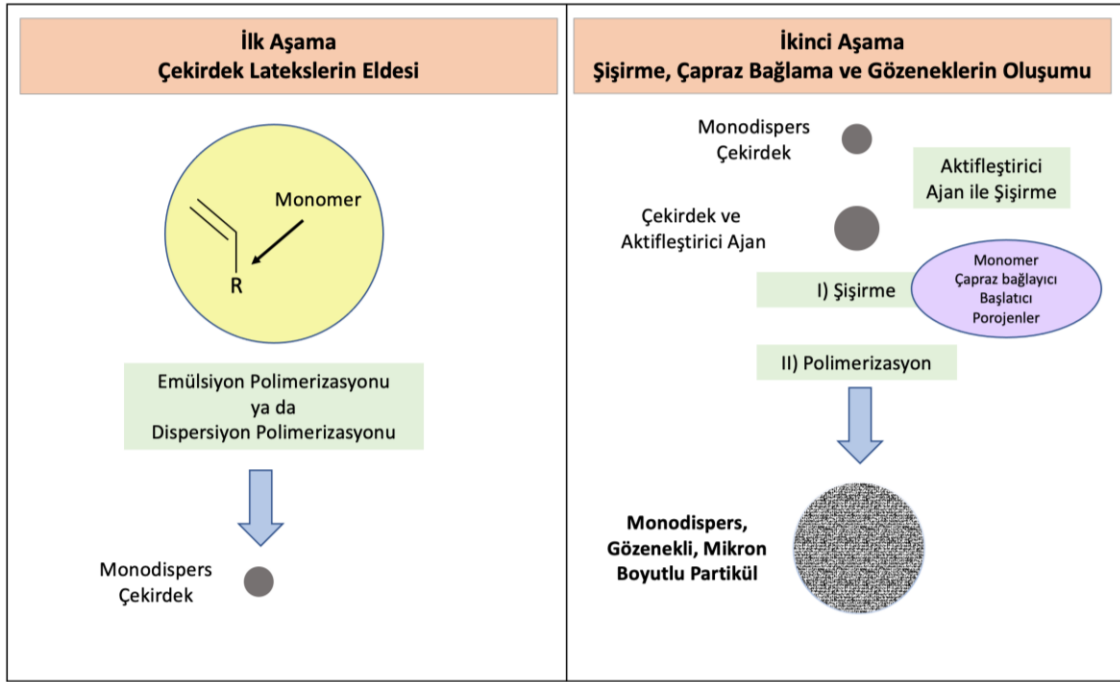


Şekil 2.4. Dispersiyon polimerizasyonunun şematik olarak gösterimi [42]. (A) Dağıtma ortamında monomer, başlatıcı ve stabilizör çözülmüş haldedir. (B) Dağıtma ortamında hala çözünen oligomerler oluşmaktadır. (C) Çekirdeklenme basamağıdır. Uzunluk arttıkça polimer zincirleri çöker ve stabilizör tarafından stabil hale getirilen çekirdekler oluşur. Gerekirse çapraz bağlayıcı ajan eklenebilir. (D) Partiküller ortamdaki monomer ve oligomerleri tutarak büyür [42, 43].

Dispersiyon polimerizasyonunda amaç dar boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Bu durumu etkileyen en önemli parametrelerden biri dağıtma ortamının özellikleridir. Ortaya çıkan partiküllerin boyutu dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü ile ortamın polaritesi tarafından etkilenmektedir ve sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenmektedir. Monomerin dağıtma ortamına hacimsel oranı arttıkça ortalama partikül boyutu artarken oranın aşırı artışı önemli ölçüde boy dağılımına sebep olmaktadır. Yüksek karıştırma hızları, oluşabilecek kayma gerilimi nedeniyle, eşboyut özelliğinin bozulmasına neden olacağından genellikle düşük karıştırma hızları ile çalışmalar yapılmaktadır [41].

2.3.1.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

Günümüzde kullanılmakta olan süspansiyon polimerizasyonu tekniğinin temelleri 1970'li yıllarda Ugelstad ve arkadaşlarının polimer bazlı partiküllerin az derecede hidrofilik molekülleri kendi hacimlerinin 100 katı kadar absorblayarak kararlı emülsiyonlar oluşturabileceğini bulması ile oluşturulmuştur. Polimerik malzemeler sentez kolaylığı, eşboyutlu olarak sentezlenebilme ve kolayca türevlendirilebilme işlemlerinden dolayı son yıllarda öne çıkmıştır ve çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi farklı fonksiyonel gruplu polimerik partiküllerin eldesine olanak sağlamaktadır [42, 44].



Şekil 2.5. Gözenekli partiküllerin eldesi için süspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi. İlk basamakta çekirdek oluşturulurken ikinci basamakta çekirdekler önce aktivatör ile ardından yeni bir monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek yapıcı ajanlar ile şişirilir [42].

Bu yöntemde öncelikle monomerlerden çıkış lateksi elde edilmektedir. Bunun için dispersiyon ya da emülsiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Önemli noktalardan biri oluşan partikül boyutu ve boyut dağılımı tamamen ilk polimer partikülleri çekirdek (seed) tarafından belirlenmesidir. Çıkış lateksinin düşük molekül ağırlıklı ajanlar kullanılarak şişirilmesi bu yöntemin ilk basamağıdır. İkinci basamakta çıkış lateksinin tekrar şişirilmesi için başlatıcı, monomer, çapraz bağlayıcı kullanılmakta ve ardından uygun sıcaklık derecelerinde stabilizör yardımıyla polimerizasyon gerçekleştirilmektedir. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yönteminin sonucunda polimerik, mikron boyutlu, gözenekli partiküller elde edilmektedir ve süspansiyon polimerizasyonu Şekil 2.5'te şematik olarak gösterilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen partiküllerin avantajı; emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyonunun monodispersitesi ile süspansiyon polimerizasyonunun porozite ve fonksiyonellik özelliklerini taşımasıdır [42, 44, 45].

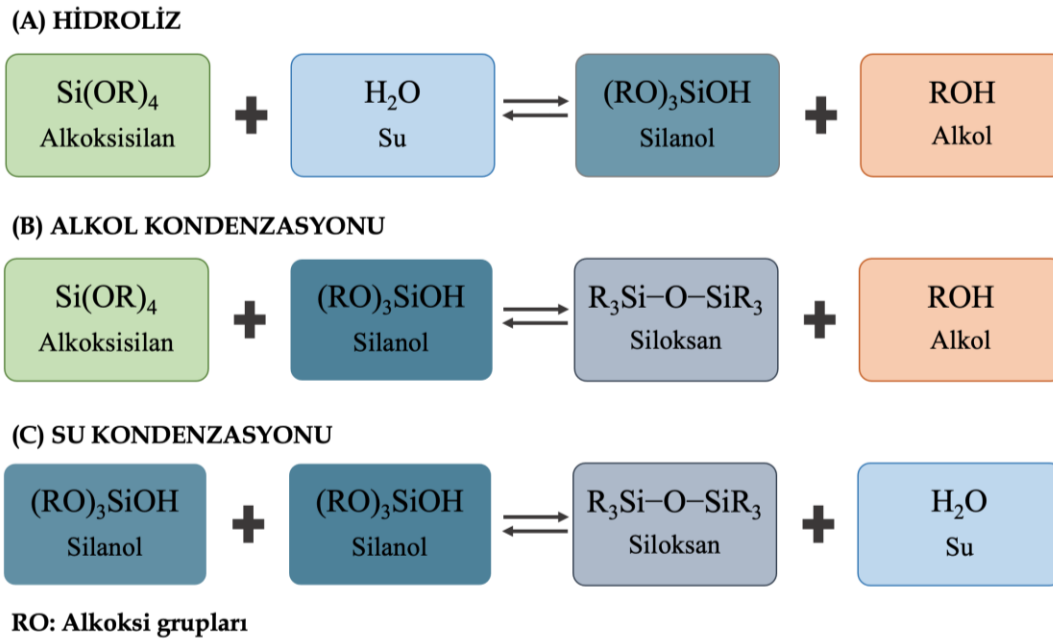
2.3.2. Silika Mikroküreler

Monodispers kolloid küreler günümüzde bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kolloid partiküllerin özellikleri ve aralarındaki etkileşimler ile ilgilenen birçok model de genellikle küresel şekle dayanmaktadır. Prensipte monodispers kürelerin özellikleri; çap, kimyasal kompozisyon, kristalinite (polikristalinite, tek kristalinite ya da amorf), yüzey fonksiyonel grupları (bu gruplara bağlı olarak yüzeydeki yük yoğunluğu) gibi parametrelerin değiştirilmesiyle kontrol edilebilir [46, 47].

İnorganik kolloidlerin hazırlanmasında genellikle çekirdeklenme ve çekirdeğin büyümesi basamaklarını içeren çökeltme reaksiyonları kullanılmaktadır. Monodispersiteyi sağlamak için bu iki basamak kesin çizgilerle ayrılmalıdır ve büyüme periyodu boyunca çekirdeklenmenin olmasından kaçınılmalıdır. Büyüme basamağında kapalı bir sistemde kritik süpersaturasyon (aşırı doyma) değerlerini aşmamak için monomer yavaşça, kontrollü bir şekilde eklenmelidir. Monodispers kolloid partiküllerin eldesinde kullanılan bu kriterler LaMer ve arkadaşlarının tiyosülfat solüsyonları asitleştirilerek sülfür kolloidlerin hazırlanması amacıyla yaptıkları çalışmalarda özetlenmiştir. Bu modele göre tüm sülfür partikülleri aynı anda oluşmaya başlamış ve son boyutlarına ulaşıncaya kadar aynı hızda büyümeye devam etmişlerdir [46, 48].

1968'de bu strateji Stöber ve Fink tarafından diğer sistemlere uyarlanmış ve monodispers silika kolloidlerin hazırlanması için son derece kullanışlı bir prosedür oluşturulmuştur. Yüksek pH'ta seyreltik tetraetilortosilikat (TEOS) solüsyonunun hidrolize edilmesine dayanarak reaktanın konsantrasyonlarının değiştirilmesi ile 50 nm ve 2 µm arasında değişen boyutlarda uniform amorf silika küreleri elde etmişlerdir. Bu teknik sonrasında farklı araştırmacılar tarafından daha da geliştirilmiş ve monodispers silika sentezinde en etkili ve basit yol haline gelmiştir. Genel bir kural olarak sıcaklık, pH, bileşenlerin konsantrasyonu gibi reaksiyon koşullarını kontrol etmek tek bir çekirdek oluşturarak bu çekirdeğin uniform halde büyümesini sağlamak için önemlidir. Stöber methodu silika kaynağı olarak bir alkoksisilan, hidroliz ajanı olarak su, katalist olarak amonyak ve solvent olarak da kısa zincirli bir alkol kullanılmaktadır. Büyüme basamağı iki reaksiyon

içerir. Alkoksisilanın hidrolizini silisilik asit oluşumu izler ve silisilik asitin yoğunlaşma sürecine girmesi sonucunda amorf silika parçacıkları oluşur. Stöber methodunun reaksiyonları Şekil 2.6’da verilmiştir. İlk basamakta silanol grubunun oluşumu gösterilmiştir. Genellikle hidroliz reaksiyonu başlatıldığında hidroliz ve kondenzasyon reaksiyonları eş zamanlı olarak meydana gelir. Bu yüzden tüm tetraoksisilanın hidrolizlenerek silisik asit oluşturması kondenzasyonun başlaması için bir ön koşul değildir. Şekil 2.6’da gösterildiği üzere silanol grubunun (alkoksisilan ya da başka bir silanol grubu ile) kondenzasyonu sonucu güçlü siloksan (Si-O-Si) bağı kurulurken alkol veya su gibi düşük molekül ağırlıklı yan ürünler oluşur. Siloksanın hidroliz ve alkoliz reaksiyonu siloksan bağının kırılmasını içerirken çift yönlü tepkimeler sonucu ağ yapıları oluşur. Ortaya çıkan su ve alkol jel formundaki bu ağ yapıları içerisinde tutulur [46, 47, 49-51].



Şekil 2.6. Stöber yönteminin reaksiyonları [51].

Silika kolloidleri monodispers formda ve aynı zamanda fazla miktarlarda üretilebilen inorganik sistemlerin en kullanışlılarındandır. Sentezlenmiş silika kürelerin yüzeyleri

genelde silanol grupları ile kaplıdır. Amonyak bir katalist olarak görev yaparken aynı zamanda silika partiküller için negatif dengeleyici bir yüzey yükü sağlar. Ortaya çıkan son partiküller için ortalama partikül çapının standart sapması %10'dan azdır ve bu partiküller monodispers bir dağılıma sahiptir. Hidrojel formundaki bu partiküller kalsinasyona tabi tutularak yoğun yapılı küresel partiküller elde edilir [46, 47, 50, 51].

Silika mikroküreler sundukları avantajlarla, inert ve biyouyumlu olmalarıyla son zamanlarda eczacılık, kozmetik, yansıma önleyici kaplama materyalleri, yalıtım materyalleri, kromatografi gibi alanlarda uygulamaları ile öne çıkmaktadır. [52-54].

2.3.3. Manyetik Silika Mikroküreler

Tıp, kimya endüstrisi ve biyoteknolojideki potansiyel uygulamaları sayesinde inorganik oksit matrisi ile kaplanmış ya da içerisine gömülmüş manyetik nanopartikül ya da partikülleri içeren mikroküreler son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Çalışılan inorganik oksitler arasında silika dispersiyon ortamı olarak en yaygın olarak kullanılan malzemedir. Biyolojik sistemlere olan uyumluluğu, bloklamaya karşı yüksek direnci, yüzey modifikasyonlarındaki çok yönlülüğü ve hidrofilik karakteri ile manyetik partiküllere biyomedikal uygulamalarda çeşitli avantajlar sağlar. Bunların yanında güçlü manyetik duyarlılık, minimum kalan manyetizma, geniş yüzey alanı ve dar partikül boyut dağılımı gibi özellikler silika bazlı manyetik partiküllerin istenen diğer özelliklerindedir. Manyetik nanopartiküllerin silika matrisin gözenekleri içerisinde in situ olarak oluşumu ve silika öncüllerinin manyetik nanopartiküller ile mikroemülsiyon polimerizasyonu gibi çeşitli yaklaşımlar manyetik silika partiküllerin hazırlanması için önerilmiştir. Fakat bu yaklaşımlar ile ortaya çıkan gözeneklerin tıkanması, mevcut yüzey alanının azalması ya da düşük manyetik duyarlılık gibi çeşitli problemlerden dolayı biyomoleküllerin ya da biyoorganizmaların ayrılması gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere manyetik silika partiküller için hazırlama yöntemleri geliştirilmesi büyük ilgi görmektedir [55].

2.4. Biyomoleküller

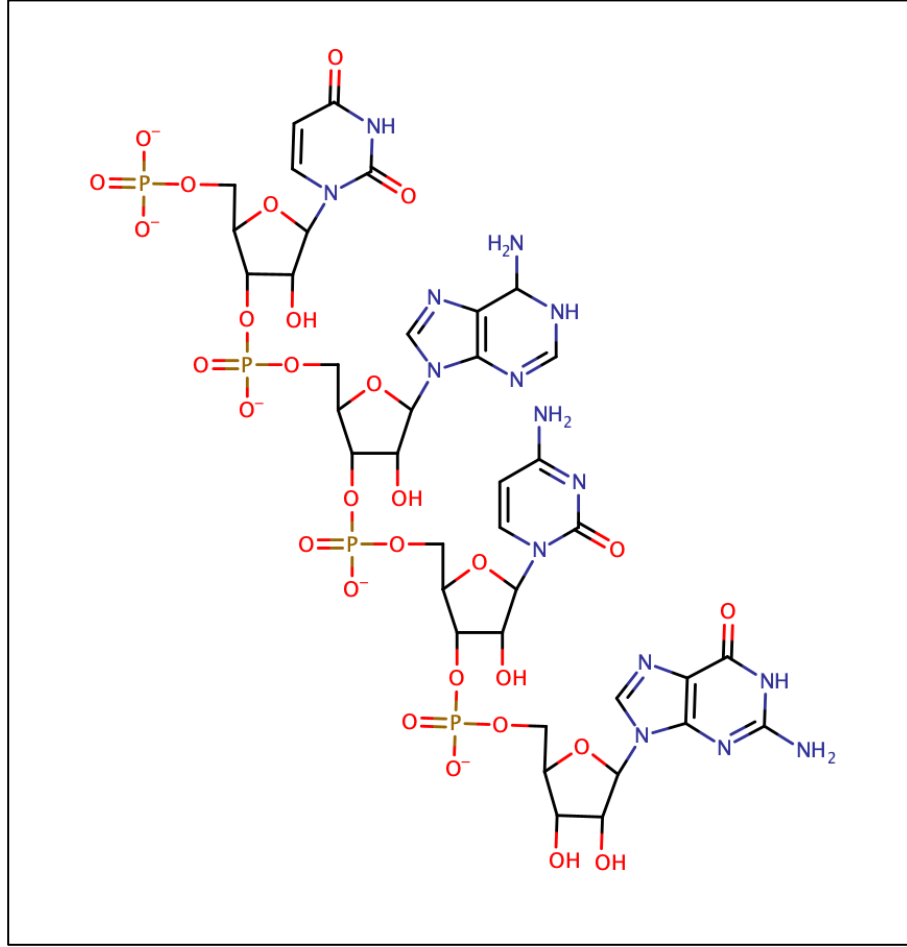
2.4.1. Ribonükleik asit (RNA)

Nükleik asitler DNA ve RNA; nesilden nesile aktarılabilecek bilgiyi uygun bir formda taşıyan uzun lineer biyopolimerlerdir. Bu makromoleküller her biri bir şeker, bir fosfat ve bir baz içeren çok sayıda bağlantılı nükleotitlerden oluşmaktadır ve bu yüzden yüksek molekül ağırlıklarına sahiptirler. Nükleotitlerin fosfat grupları şekerler ile birlikte şeker-fosfat ana hattını oluştururken bazlar değişkendir. Bu monomer birimleri ya ribonükleotit ya da deoksiribonükleotitlerden oluşur ve buna göre RNA ya da DNA olarak ayrılır. Bu iki polinükleotit yalnızca tek tip polimer içeren virüsler dışında tüm canlı hücrel organizmalarda bulunmaktadır. Genetik bilgi nükleik asit zincirindeki baz dizileri içerisinde depolanır. Bazlar birbirleri ile spesifik çiftler oluştururken hidrojen bağları ile kararlı hale gelmektedirler. Bu spesifik baz çiftlerinin bir araya gelmesi sonucu ikili sarmal yapısı oluşur. Bu baz çiftleri yeni bir nükleik asit zinciri oluşturmak için mevcut zincirdeki bilgiyi kopyalayan bir mekanizma sağlar. DNA, tüm modern hücrelerin ve birçok virüsün genlerdedir ve DNA polimeraz enzimlerinin yardımıyla kopyalanır. Bu enzimler sayesinde 1/100.000.000 az bir hata oranı ile nükleik asitlerdeki diziler kopyalanır [56, 57].

Genler hücrelerin oluşturduğu protein türlerini belirtmektedir fakat buna rağmen protein sentezi için DNA doğrudan bir şablon değildir, RNA molekülleri şablon olarak kullanılmaktadır. DNA şablonlarından alınan talimatlar ile RNA polimerazlar RNA'nın hücrel formlarını oluşturur. mRNA (mesajcı RNA) protein sentezinde bilgi taşınmasında; tRNA (taşıyıcı RNA) ve rRNA (ribozomal RNA) ise protein sentezinde rol alır [56].

RNA birçok biyolojik fonksiyonun meydana gelmesinde, performansında ya da kontrolünde rol oynayan aktif, güçlü bir biyolojik moleküldür. Genetik bilginin taşınmasında kritik bir önemi varken son yıllarda yeni görevleri de keşfedilmiştir.

RNA'nın hücrelerdeki rolünün anlaşılması yeni teşhis metodları geliştirilmesi ve hastalıkların anlaşılması ve tedavisinde kritik önem taşımaktadır [6, 58].



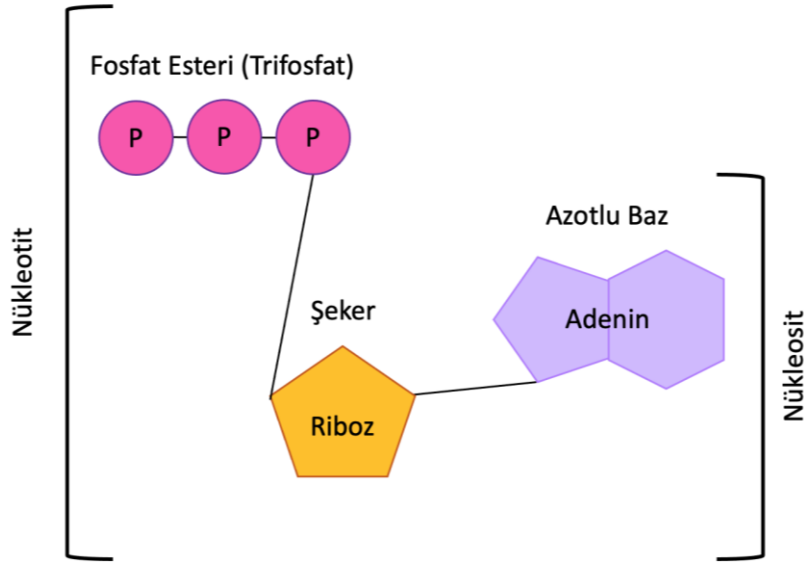
Şekil 2.7. RNA'nın kimyasal yapısı [59].

RNA, bazıları kromatografik ayırmaya da uygun olan bir takım eşsiz özelliklere sahiptir. RNA molekülü bir polimerdir ve uzun nükleotit zincirlerinden oluşur. Her nükleotit adenin (A), sitozin (C), guanin (G), ya da urasil (U) azotlu bazlarından biri ile bir riboz şekeri ve riboz şekere bağlanmış bir fosfat grubu içerir [58]. RNA, DNA'ya kıyasla tek zincirli ve daha kısa bir moleküldür ve bu şekil farklılığı RNA'nın riboz üzerinde bulundurduğu hidroksil grubu ile de ilişkilidir. DNA genetik bilgi taşıma özelliği ile yapısında ve fonksiyonlarında kararlılık gerektirirken RNA ligandlara bağlanma yeteneği olan yapılar oluşturur. Polar ve elektronegatif olan bu molekül genelde proteinden büyük

fakat DNA'dan küçüktür. Bu özellikler RNA'nın afinite, iyon değiştirme, boyut ayırma gibi yöntemlerle ekstrakte edilmesine olanak sağlar [58].

2.4.2. β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid (β -NAD)

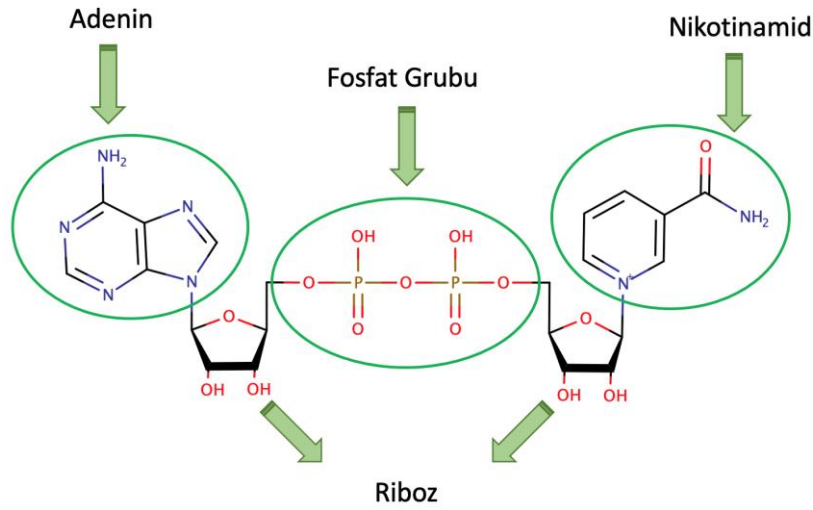
Nükleotitler azotlu baz, 5 karbonlu şeker ve bir ya da daha fazla fosfat grubundan oluşurlar ve metabolizma düzenlenmesi ile genetik bilginin depolanması ve kullanılması gibi hücrenel birçok olayda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla hücreler çeşitli türlerde nükleotitleri ve ilgili molekülleri içerir [60].



şekil 2.8. Örnek bir nükleotit adenozin-5'-trifosfat (ATP)'ın şematik yapısı [60].

şekil 2.8'de ATP'nin şematik yapısı örnek bir nükleotit yapısı olarak verilmiştir. ATP, adenin bazı (baz), 5 karbonlu β -D-riboz şekeri (şeker) ve bu şekere 5' karbondan bağlanmış trifosfattan (fosfat) oluşmaktadır. Fosfat olmadan ele alındığında ise örnek bir nükleosit yapısını (adenozin) göstermektedir [57, 60].

β -NAD canlı organizmalarda bulunan, özellikle elektronların ve hidrojen atomlarının taşınmasında görev yapan ayrıca elektriksel enzim biyosensörleri ile biyoyakıt hücrelerinin gelişmesinde rol oynayan en önemli elektron taşıyıcılarından biridir. Enerji metabolizmasının yanısıra β -NAD ve degradasyonundan meydana gelen ürünlerin kalsiyum homeostazı, gen transkripsiyonu, DNA onarımı ve hücrelerarası iletişim gibi aktivitelerde de fonksiyonları bulunur. β -NAD, 2 elektron ve 1 proton alarak indirgenmiş formu olan NADH'a dönüşür ve bu molekül NAD⁺ ile beraber biyoenerjide redoks reaksiyonlarının sürdürülmesinde büyük önem taşır. Bu çift birlikte bir dizi biyosentetik reaksiyonlara katılır. Aynı zamanda genelde dehidrogenaz grubundaki birçok enzimin kofaktörüdür [8, 61].



Şekil 2.9. Sol tarafta bulunan adenin bazı ve sağ tarafta bulunan nikotinamidin fosfat bağı ile bağlandığı β -NAD yapısı [61].

β -NAD, biri adenin bazı biri de nikotinamid grubu olmak üzere birbirine fosfat gruplarından bağlanmış iki nükleotid içerir. β -NAD gibi dinükleotid kofaktörleri birden fazla erişilebilir cis-diol içerdiğinden borat kromatografi jellerine güçlü bağlanma gösterirler. [8, 61-63].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre Sentezi

Çalışmada kullanılan monodispers gözenekli mikroküreler, çok basamaklı mikrosüspanسیون polimerizasyonu ile elde edilen poli(metakrilik asit-co-etilen dimetakrilat), poli(MAA-co-EDMA) partiküller, kalıp materyal olarak kullanılarak çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir [64, 65].

3.1.1. Materyal

Polimerizasyonda monomer olarak kullanılan glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asit (MAA) ile çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen dimetakrilat (EDMA) Sigma-Aldrich Co. (A.B.D) firmasından temin edilmiştir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan poli(vinil piroolidon) (PVP K-30), sodyum lauril sülfat (SLS), polivinil alkol (PVA), tetrabütül amonyum iyodür (TBAI), tetraetoksisilan (TEOS), izopropanol ve amonyum hidroksit (25 - 28% NH₄OH) Sigma-Aldrich Co. (A.B.D) firmasından temin edilmiştir. Etil benzen (EB), etanol (EtOH) ve tetrahidrofuran (THF) Riedel De Haen (Almanya) firmasından alınmıştır. Başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO) ve azobisizobütironitril (AIBN), Across Organics (İngiltere) firmasından alınmış, AIBN kullanılmadan önce metanol ortamında yıkanmıştır. Tüm çalışmalarda ultra saf su kullanılmıştır.

3.1.2. Çıkış Lateksi Poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) Mikrokürelerin Sentezi

Monodispers formda olan poli(GMA) partiküller, GMA monomeri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle elde edilmiştir [64-66]. Poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerinin sentezi için öncelikle poli(GMA) mikropartikül sentezi yapılmıştır.

Kuru haldeki cam bir reaktör içerisine mutlak etanol (30 mL) konulmuştur. PVP K-30 (0,45 g) ve GMA (3 mL) cam reaktör içerisine eklenmiş, ortam ultrasonik banyo yardımıyla homojenize edilmiştir. Çözelti içerisine AIBN (0,28 g) başlatıcı olarak eklenmiş ve 1 dakika boyunca yine ultrasonik banyo kullanılarak çözülmüştür. Reaktör çalkalamalı su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve polimerizasyon 70 °C'da, 120 vuru/dakika karıştırma hızıyla 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Ortam oda sıcaklığına soğutulmuş, ardından poli(GMA) partiküller santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle etanol ve su kullanılarak yıkanmıştır. Son basamakta partiküller ultrasonik banyo yardımıyla distile su içerisinde dağıtılmıştır. Elde edilen poli(GMA) dispersiyonundan 1 mL örnek alınarak 70 °C'de 24 saat kurutulmuş, böylece gravimetrik yöntemle poli(GMA) partikül derişimi belirlenmiştir (g partikül/mL).

3.1.3. Kalıp Olarak Kullanılacak Poli(MAA-Co-EDMA) Polimerik Mikrokürelerin Sentezi

Poli(MAA-co-EDMA) polimerik mikrokürelerin sentezi için çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılmıştır.

İlk aşamada % 0,25'lik SLS-su çözeltisi (50 mL) hazırlanmıştır. İçerisine gözenek yapıcı EB (3,5 mL) eklenmiş ve dağılması için 5 dakika boyunca ortam ultrasonikasyona tabii tutulmuştur. Önceden sentezlenmiş olan poli(GMA) mikroküre dispersiyonu santrifüjlenerek sıvı kısmı atılmıştır. Poli(GMA) partiküller (0,3 g) çözelti içerisine eklenmiş ve 12 dk ultrasonikasyon ile ortamda dağıtılmıştır. Dispersiyon manyetik karıştırıcıya alınmış ve gözenek yapıcı ile lateks partiküllerin denge şişme değerine ulaşması için oda sıcaklığında (25 °C, 250 rpm) 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

İkinci aşamada % 0,25'lik SLS (0,125 g) su karışımı (50 mL) içerisine fonksiyonel monomer, MAA (2 mL), çapraz bağlayıcı, EDMA (4 mL) ve başlatıcı, BPO (0,25 g) eklenmiştir. Ortam 12 dakika boyunca ultrasonikasyona tabii tutulmuş ve ilk aşamada elde edilen karışım içerisine eklenerek oda sıcaklığında 250 rpm hızla 24 saat süreyle

kariştirilmiştir. Böylece monomer fazının, gözenek yapıcı içeren poli(GMA) partiküllere transferi sağlanmıştır.

Son aşamada ise bu karişım içerisine, PVA zeltisi (0,8 g/10 mL) eklenmiştir. Ortam beraber sızdırmaz cam reaktör içerisine alınarak 80 C sıcaklıkta 150 cpm çalkalamalı su banyosu içerisine 24 saat boyunca kariştirilmiştir. Böylece poli(GMA) partikülleri içerisindeki monomer fazın polimerizasyonu sağlanmıştır. Sonuç polimer mikroküreler, ardışık santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle, 3 kez etanol, 2 kez THF ve 3 kez etanol ile yıkanarak, dönüşmeyen monomer ve şişirme ajanının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Polimerik partiküller 20 mL etanol içerisinde dağıtılmıştır.

3.1.4. Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre (SiO₂) Sentezi

Monodispers gözenekli mikroküre sentezi için izopropanol (50 mL) ve distile su (5 mL) karişımı içerisine TBAI (0,25 g) konulmuş, zndkten sonra ortama amonyum hidroksit (0,25 mL) eklenmiştir. Ardından poli(MAA-co-EDMA) partiküller (0,4 g) ortama eklenmiştir. Dispersiyon için ultrasonikasyon uygulanmış ve ortam oda sıcaklığında 400 rpm hızda 1 saat boyunca manyetik kariştırıcıda kariştirilmiştir. % 25 TEOS içeren izopropanol – TEOS (5 mL) karişımı hazırlanmış ve kariştırıcı üzerindeki zeltiye 1 saat sonunda damla damla eklenmiştir. Bu karişım 30 C sıcaklıkta ve 400 rpm’de 24 saat boyunca manyetik kariştırıcı ile kariştirilmiştir. Kompozit mikroküreler 2 kez izopropanol, 2 kez su ile yıkanmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Mikroküreler 70 C’lik etüvde 24 saat boyunca kurutulmuş, ardından da 450 C ‘de hava ortamında 6 saat kalsinasyona bırakılmıştır. Kalsinasyon sonucunda polimerik kısım uzaklaştırılmış ve monodispers gözenekli silika mikroküreler elde edilmiştir.

3.2. Manyetik Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre Sentezi

Manyetik silika mikrokürelerin sentezi için, silika mikrokürelerin sentezinde kullanılan poli(MAA-co-EDMA) partiküller kullanılmış ve mikroküreler çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir.

3.2.1. Materyal

Manyetik silika mikrokürelerin eldesinde Sigma-Aldrich Co. (A.B.D.) firmasından temin edilen demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+3}) ve demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Fe^{+2}) tuzları kullanılmıştır.

3.2.2. Manyetik Monodispers Gözenekli Silika Mikroküre (MagSiO_2) Sentezi

Bu amaçla öncelikle poli(MAA-co-EDMA) partiküllerin manyetik forma dönüştürülmesi ikili çöktürme metodu ile yapılmıştır [67, 68]. Yöntemde, öncelikle Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları polimerik partiküllerin karboksil grupları üzerinden kompleks oluşumu ile adsorplanmıştır. Poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler (0,7 g) distile su (100 mL) içerisine alınarak ultrasonik banyo yardımıyla dağıtılmıştır. Ardından ortama $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzları eklenmiş ve tuzlar tamamiyle çözüldükten sonra ortama N_2 gönderilerek oksitlenmenin engellenmesi amaçlanmıştır. Çözünen demir tuzları N_2 varlığında belirli bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve vakum yardımıyla ortamdaki O_2 uzaklaştırılmıştır. Ortam $85\text{ }^\circ\text{C}$ 'a ısıtılarak demir tuzlarını indirgemek amacıyla partikül dispersiyonunun drişik amonyak çözeltisi (25 mL, ağı. % 25) eklenmiştir. Ortam 1 saat boyunca $85\text{ }^\circ\text{C}$ de karıştırmaya bırakılmıştır. Süre sonunda oda sıcaklığında soğutulan mikroküreler mıknatıs yardımıyla toplanarak HCl ve su ile yıkanmıştır. Ortaya çıkan partiküllere monodispers gözenekli silika mikrokürelerin eldesinde kullanılan işlemler aynen uygulanmış, kompozit manyetik partiküller sırasıyla kurutma ve kalsinasyona tabi tutulmuştur. Polimerik kısım uzaklaştırılarak manyetik özelliğe sahip SiO_2 mikroküreler (MagSiO_2) elde edilmiştir.

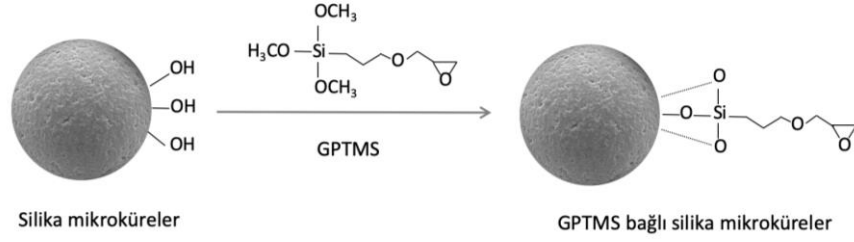
3.3. Silika ve Manyetik Silika Mikrokürelere 3-aminofenilborik asit (APBA) Bağlanması

3.3.1. Materyal

3-aminofenil borik asit-hemisülfat tuzu (APBA), (3-glisidiloksipropil)trimetoksisilan (GPTMS), sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve izopropanol Sigma Aldrich Co. (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. EtOH ve toluen Riedel De Haen (Almanya) firmasından alınmıştır.

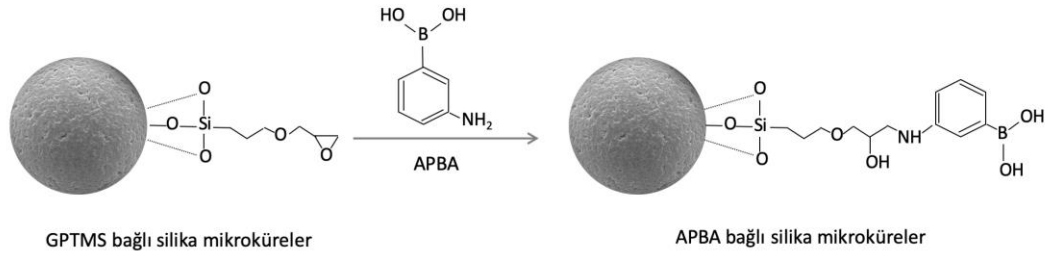
3.3.2. Monodispers Gözenekli Silika Mikrokürelere APBA Bağlanması (SiO_2APBA)

Borat afinite kromatografisi sentemiyle diol gruplu biyomolekülleri izole etmeye yönelik olarak sorbent olarak kullanılmak üzere, monodispers gözenekli silika mikrokürelere APBA bağlanmıştır. Bunun için önce mikrokürelere hidrosil grubu zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Bunun için silika mikrokürelere 6,76 mL derişik HCl ve 50 mL saf su karışımının içerisinde alınarak 80 °C'de çalkalamalı su banyosunda 6 saat karıştırılmıştır. 6 saat sonunda su ve izopropanol ile yıkanarak 24 saat boyunca 100 C'de etüvde kurutulmuştur. Sonrasında mikrokürelere 2 mL GPTMS içeren 20 mL toluen çözeltisi eklenerek, dispersiyon eldesi sağlanmış ve ardından ortam 110 °C'de 6 saat boyunca geri-soğutucu altında kaynatılmıştır. GPTMS'in trimetoksisilan grupları ile silika mikrokürelere hidrosil grupları arasındaki reaksiyon sonucu GPTMS'in silika mikrokürelere kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. GPTMS bağlı mikrokürelere sırayla toluen ve etanol ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1. Silika mikrokürelere GPTMS eklenmesinin şematik gösterimi [69].

APBA, GPTMS bağlı mikrokürelere, GPTMS'nin epoksipropil grubu ile APBA'nın amin grubu arasındaki nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu ile kovalent olarak bağlanmıştır. Bunun için 0,5 g APBA, pH'ı 9,6'ya ayarlanmış 15 mL ağ. %5'lik Na_2CO_3 çözeltisi içerisinde çözülmüştür. GPTMS bağlanmış silika mikrokürelere (0,2 g) çözelti içerisinde alınmış ve ultrasonikasyon yardımıyla dağıtılmıştır. APBA'nın GPTMS bağlı kürelere kovalent bağlanması için ortam $65\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 4 saat karışmaya bırakılmıştır. Mikrokürelere, ardışık santrifüjleme-dekantasyon yöntemiyle, distile su, %1'lik (v/v) hidroklorik asit çözeltisi ve ardından tekrar distile suyla yıkanmıştır.



Şekil 3.2. GPTMS ekli kürelere APBA bağlanmasının şematik gösterimi [69].

3.3.3. Monodispers Gözenekli Manyetik Silika Mikrokürelere APBA Bağlanması ($\text{MagSiO}_2\text{APBA}$)

Manyetik silika mikrokürelere APBA bağlanması manyetik olmayan mikrokürelere için uygulanan yöntemle benzer şekilde yapılmıştır. Ancak burada hidroksil zenginleştirme işlemi yapılmamış GPTMS doğrudan mevcut hidroksil grupları üzerinden manyetik silika

mikrokürelere bağlanmıştır. Ardından APBA bağlanması için işlemler manyetik olmayan mikrokürelere ile aynı şekilde devam ettirilmiştir.

3.4. Silika ve Manyetik Silika Mikrokürelere Karakterizasyonu

3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SiO₂, MagSiO₂, SiO₂APBA ve MagSiO₂APBA mikrokürelere ortalama boyutları, boy dağılımlarının ölçülmesi aynı zamanda yüzey morfolojisinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Yaklaşık 50 mg mikroküre, % 0,25'lik 2 mL SDS çözeltisine eklenerek 1 dk boyunca ultrasonikasyona (180 W, 50 Hertz) maruz bırakılmış, mikrokürelere dağılması sağlanmıştır. Bu dispersiyondan yaklaşık 100 µL alınarak SEM cihazının metal örnek diski üzerine yayılmış ve örneğin sıvı kısmının uçurulması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuru haldeki örnek plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme yöntemi (Precision Etching and Coating System, Gatan 682, A.B.D.) ile yaklaşık 5 nm kalınlıkta altın tabaka ile kaplanarak ve iletken hale dönüşen örnek SEM cihazına (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) verilmiştir. Mikrokürelere SEM görüntüleri 4000X – 20000X büyütmede 5-15 kV'da çekilmiştir.

Ortalama mikroküre boyutu ve değişim katsayısının (CV) hesaplanması için SEM görüntüleri kullanılmıştır. Değişim katsayısı değeri mikrokürelere monodispers özelliğini belirtmektedir. Boyutların ve değişim katsayısının hesaplanması için 100-200 adet mikrokürelere boy ölçümleri yapılmıştır. Aşağıda verilen Eşitlik 3.1 ortalama çap değerinin ve Eşitlik 3.2 değişim katsayısının hesaplanması için kullanılmıştır;

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (3.1)$$

D_n : Ortalama çap değeri (µm)

D_i : Çap değeri (µm)

N_i : D_i değerine sahip mikroküre sayısı

$$CV = \left[\left\{ \sum N_i (D_i - D_n)^2 / (N_T - 1) \right\}^{1/2} / D_n \right] \times 100 \quad (3.2)$$

CV : Değişim katsayısı

N_T : Toplam mikroküre sayısı

SEM cihazında görüntü elde edilirken elektronlar örnek üzerine gönderilerek, elektron ve örnek atomları arasında oluşan etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve elektron demetinin taranması sonucunda ekrana aktarılmaktadır. Sıvı olmayan ve sıvı özellik taşımayan her örnek incelenebildiği gibi sıvı içeren biyolojik örneklerde kurutulmuş uygulamaya elverişli hale getirilebilmektedir. İletken olmayan örnekler ince bir iletken malzeme (genelde altın) kaplanarak incelenebilmektedir [70].

3.4.2. Yüzey Alanı Ölçümü

SiO₂, MagSiO₂, SiO₂APBA ve MagSiO₂APBA mikroküreler için BET (Brunauer-Emmett-Teller) modeline göre N₂ adsorpsiyon desorpsiyon yöntemi kullanılarak özgül yüzey alanı ve gözeneklilik (gözenek boyutu dağılımı ve ortalama gözenek boyutu) ölçümü yapılmıştır (Quantochrome, Nova 2200e, A.B.D.). Ölçüm için yaklaşık 100 mg mikroküre 80 C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş mikroküreler üzerlerindeki nemi uzaklaştırmak için 120 C'de 6 saat boyunca, 7x10⁻² mbar basınç altında vakumlanmıştır. Örnek haznesi sıvı azot içerisine yerleştirilmiş ve mikroküreler üzerinden geçirilen azot gazının mikrokürelere adsorplanması sağlanmış ve adsorplanan miktar hesaplanmıştır. Sonrasında basınç düşürüldükçe çıkan N₂ hacmi ölçülerek desorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. Çıkan adsorpsiyon/desorpsiyon izotermilerinden yararlanılarak özgül yüzey alanı hesaplanmıştır.

3.4.3. X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

SiO₂, SiO₂APBA, MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA formdaki mikrokürelerin yüzey kompozisyonları X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) kullanılarak belirlenmiştir. XPS ölçümleri 2.0x10⁻⁷ mbar baz basınçla çalışan K-Alpha XPS spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, İngiltere) ile yapılmıştır. Tüm örnekler 400 mikron spot büyüklüğünde Al Ka X-ışını radyasyonu (1486.6 eV) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.4.4. Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM)

Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM, Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) manyetik mikrokürelerin manyetizasyon davranışını belirlemek ve doyumluk manyetizasyonunu ölçmek için kullanılmıştır. 80 C'de 24 saat boyunca kurutulan mikrokürelerden alınarak örnek haznesine yerleştirilmiştir. Sistemde süperiletken mıknatıs yardımıyla manyetik alan oluşmaktadır ve ölçüm sonucunda manyetik alan şiddetine karşı değişen manyetizasyon ile değişen eğriler değerlendirilmiştir.

3.5. Kesikli ve Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

3.5.1. Materyal

Adsorpsiyon desorpsiyon çalışmalarında biyomolekül olarak kullanılan ribonükleik asit (RNA) ve β-nikotinamid adenin dinükleotid (β-NAD) Sigma Aldrich Co. (A.B.D.) firmasından alınmış ve olduğu gibi kullanılmıştır. Sürekli borat afinite sisteminde kullanılan kapiler kolon (iç çap 300 µm, dış çap 460 µm) Polymicrotechnologies Inc., Phoenix, AZ, (A.B.D.)'den temin edilmiştir. Adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan N-[2-Hidroksietil]piperazin-N-[2-etan sülfonik asit] (HEPES) ve desorpsiyon çalışmalarında kullanılan disodyum tetraborat ve sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄) ile disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) Sigma Chem. Co. (A.B.D.) firmasından alınmıştır.

3.5.2. Kesikli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

Kesikli sistemdeki çalışmalar için öncelikle ortam pH ve ortam sıcaklığı değişimiyle sentezlenen sorbentlerin adsorpsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Ardından sorbent konsantrasyonu ve başlangıç biyomolekül konsantrasyonu değişimiyle sorbentlerin adsorpsiyon ve desorpsiyon davranışları incelenmiştir. Son olarak adsorpsiyon desorpsiyon döngüleri aynı sorbentler üzerinde 5 defa tekrarlanarak tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır.

Denge adsorpsiyon deneyleri HEPES tamponu ortamında (50 mM HEPES, 50 mM MgCl₂, pH 8,5) 2 saat süreyle yapılmıştır. Desorpsiyon deneyleri ise borat tamponu (100 mM disodyum tetraborat, pH 10,2) ve sorbitol eklenmiş fosfat tamponu (100 mM fosfat tamponu, 100 mM/200 mM sorbitol, pH 7,0) ortamları kullanılarak 1 saat süreyle yapılmıştır. Adsorpsiyon ve desorpsiyon süreleri boyunca örnekler 120 vuru/dakika hızda rotatora bırakılmıştır. Süreler sonunda manyetik olmayan sorbentler santrifüj (3000 rpm 4 dakika) - ve manyetik sorbentler ise mıknatıs yardımıyla ayrılmıştır.

Adsorpsiyon sonrası denge biyomolekül adsorpsiyonu (Q, mg biyomolekül/mikroküre) Eşitlik 3.3 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$Q = \left[\frac{A_0 - A_f}{A_0} \right] \times \left[\frac{C_0 \times V}{M_s} \right] \quad (3.3)$$

- Q : Adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
A₀ : İnkübasyon ortamının başlangıçtaki absorbansı
A_f : Adsorpsiyondan sonra absorbans değeri
C₀ : Biyomolekülün başlangıç konsantrasyonu (mg/mL)
V : İnkübasyon çözeltisinin hacmi (mL)
M_s : Sorbent miktarı (g)

Desorpsiyon verimlerinin hesaplanmasında, biyomoleküllerin desorpsiyon ortamında farklı konsantrasyonlarda çözülmesiyle oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılmıştır. Çözelti absorbansları UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüş, bu absorbanslar kullanılarak desorpsiyon ortamına bırakılan biyomolekül miktarı bulunmuştur.

Desorpsiyon veriminin (η) hesaplanması için Eşitlik 3.4 kullanılmıştır.

$$\text{Desorpsiyon verimi (\%)} = \frac{\text{Desorplanan biyomolekül miktarı}}{\text{Adsorplanan biyomolekül miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

Biyomoleküllerin izolasyon davranışlarının belirlenmesinde denge adsorpsiyon kapasitesi ve desorpsiyon verimi en önemli iki faktördür. Bu iki parametrenin bir arada incelenmesiyle izolasyon verimi hesaplanmıştır. Yalnızca denge adsorpsiyon kapasitesinin ya da desorpsiyon veriminin yüksek olması tek başına başarılı bir izolasyonu açıklayamaz. İzolasyon verimi aşağıda verilen Eşitlik 3.5'ten yararlanarak hesaplanmıştır.

$$\text{İzolasyon verimi (\%)} = \frac{\text{Desorplanan biyomolekül miktarı}}{\text{Sisteme verilen biyomolekül miktarı}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.5.2.1. pH Etkisi

pH taraması ile pH değişiminin biyomolekül adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Biyomolekül konsantrasyonu, sorbent konsantrasyonu ve adsorpsiyon hacimleri sabit tutularak ortam pH değeri değiştirilmiştir.

Sorbentler deneye başlanmadan önce adsorpsiyon tamponu ile yıkanmıştır. Bu deneylerde kullanılan adsorpsiyon tamponları aşağıdaki gösterilmiştir;

pH 5 : 50 mM CH₃COOH/CH₃COONa
pH 6 / pH 7 : 50 mM NaH₂HPO₄/Na₂HPO₄

pH 8 / pH 8,5 / pH 9 : 50 mM HEPES

Biyomoleküllerin farklı pH'larda olan farklı tampon çözeltiler ile çözeltileri hazırlanmıştır ve başlangıç absorban değeri (A_0) UV-Vis spektrofotometre'de RNA için 258 nm ve β -NAD için 260 nm değerinde okunmuştur. Ardından biyomolekül çözeltisi seçilen mikroküre (0,01 g) ile etkinleştirilmiştir. Bu amaçla mikroküre içeren biyomolekül çözeltisi 2 saat boyunca rotatorda 120 vuru/dakika karıştırma hızı ile adsorpsiyona bırakılmış ve bu süre sonunda santrifüjleme (3000 rpm 4 dk) yardımıyla sıvı kısım ayrılmıştır. Ayrılan kısımdan ilgili biyomoleküle uygun dalgaboyunda son absorban değeri (A_f) okunmuştur. Manyetik sorbentler ile yapılan çalışmalarda da biyomolekül adsorpsiyonu için aynı yöntem kullanılmış ancak adsorpsiyon sonrası sorbentin ayrılması, santrifüj yerine mıknatıs kullanılarak yapılmıştır.

3.5.2.2. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık taramalarında sorbent konsantrasyonu, biyomolekül konsantrasyonu, ortam pH'ı ve adsorpsiyon hacimleri sabit tutularak ortam sıcaklığının değişimi ile değişen denge adsorpsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Deney öncesi sorbent olarak kullanılan mikroküreler adsorpsiyon tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi santrifüj yardımıyla yapılmıştır. Biyomoleküllerin belirli derişimde çözeltileri adsorpsiyon tamponu içerisinde hazırlanmış ve UV-Vis spektrofotometrede uygun dalga boyunda absorban değerleri okunmuştur (A_0). 0,01 g sorbent ve 1 mL adsorpsiyon çözeltisi kullanılarak adsorpsiyon çalışmaları 4°C, 15°C, 22°C, 25°C, 30°C ve 35°C ortam sıcaklıklarında yapılmıştır. Biyomolekül çözeltileri seçilen sıcaklıklarda mikroküreler ile etkinleştirilmiş ve 2 saat boyunca adsorpsiyona maruz bırakılmıştır. Adsorpsiyon sonunda rotatordan alınan tüpler santrifüje alınarak sorbent çöktürülmüş ve süpernat absorbanı seçilen biyomoleküle özgü dalga boyunda okunmuştur (A_f). Aynı şekilde manyetik mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla yapılan deneylerde sorbent ayrılması için mıknatıs kullanılmıştır.

3.5.2.3. Sorbent Konsantrasyonu Etkisi

Sorbent taramalarında başlangıç sorbent konsantrasyonunun biyomolekül adsorpsiyonuna etkisi gözlemlenmiştir. Bu noktada biyomolekül konsantrasyonu, ortam pH'ı, adsorpsiyon hacimleri sabit tutulmuştur. Deney öncesi sorbent olarak kullanılan mikroküreler adsorpsiyon tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi santrifüj yardımıyla alınarak (5000 rpm, 10 dak) yapılmıştır.

Biyomoleküller adsorpsiyon tamponu içerisinde uygun derişimde çözülmüş ve ortam pH 8,5 olarak ayarlanmıştır ve başlangıç absorbans değeri uygun dalga boyunda okunmuştur (A_0). Seçilen sorbent konsantrasyonlarına uygun olarak, mikroküreler farklı miktarlarda ependorf tüplerine aktarılmıştır. Biyomolekül adsorpsiyon işlemi 2 saat boyunca rotatorda oda sıcaklığında sürdürülmüştür. Adsorpsiyon sonrası, tüpler santrifüje alınarak (5000 rpm, 10 dak) ve süpernant kısmının absorbans değeri, UV spektrofotometrede uygun dalga boyunda okunmuştur (A_f).

Üst kısımları alınan mikroküreler oda sıcaklığında 1 mL desorpsiyon ortamı ile etkinleştirilerek rotatorda 1 saat boyunca desorpsiyona maruz bırakılmıştır. Desorpsiyon süresi sonunda, tüpler santrifüjlenmiş (5000 rpm, 10 dak) ve sıvı kısımdan ilgili dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (D_f). Aynı şekilde manyetik mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla yapılan adsorpsiyon—desorpsiyon deneylerinde sorbent ayrılması için mıknatıs kullanılmıştır.

3.5.2.4. Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi

Bu çalışmada hedef biyomoleküllerin başlangıç konsantrasyonunun biyomoleküllerin adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Bunun için; ortam pH'ı, sorbent konsantrasyonu ve adsorpsiyon hacmi sabit tutulmuş, değişen başlangıç biyomolekül konsantrasyonu ile denge adsorpsiyon kapasitesinin değişimi gözlemlenmiştir. Adsorpsiyon deneyleri için öncelikle mikroküreler adsorpsiyon tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama sonucunda kirlilik

kalıp kalmadığı UV-Vis spektrofotometre yardımıyla, 260 nm’de absorbans ölçümü ile kontrol edilmiştir.

Biyomoleküller adsorpsiyon tamponu içerisinde çözülerek 0,1 mg/mL’den 2,0 mg/mL’ye kadar farklı başlangıç konsantrasyonlarında adsorpsiyon ortamları hazırlanmış ve ortam pH değeri 8,5’a ayarlanmıştır. Ardından UV-Vis spektrofotometrede çözeltinin başlangıç absorbans değeri uygun dalga boyunda okunmuştur (A_0). Her bir denge adsorpsiyon deneyi için 0,01 g sorbent örneği tüplere alınmış ve farklı biyomolekül başlangıç derişimleri ile hazırlanmış 1 mL adsorpsiyon ortamı ile etkinleştirilmiştir. Rotatora yerleştirilen tüpler 2 saat boyunca oda sıcaklığında adsorpsiyona maruz bırakılmıştır. Adsorpsiyon sonucunda tüpler santrifüje konmuş (5000 rpm, 10 dk) ve süpernatant UV-Vis spektrofotometre (Biodrop) ile uygun dalga boyunda absorbans ölçümü için ayrılmıştır (A_f).

Adsorpsiyon ortamından alınan mikroküreler 1 mL desorpsiyon ortamı ile etkinleştirilmiş ve rotatorda 1 saat boyunca oda sıcaklığında desorpsiyona maruz bırakılmıştır. Desorpsiyon süresi sonunda tüpler santrifüjlenmiş (5000 rpm, 10 dk) ve sıvı kısımdan biyomoleküle özgü dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (D_f). Manyetik mikroküreler için de adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları aynı şekilde yürütülmüş, santrifüj yerine manyetik ayırma kullanılmıştır.

3.5.2.5. Tekrarlanabilirlik Deneyleri

Tekrarlanabilirlik deneyleri için adsorpsiyon-desorpsiyon deneyi aynı mikroküre örneği sorbent olarak kullanılarak, 5 kez ardışık şekilde tekrarlanmıştır. Seçilen biyomolekül için belirli bir başlangıç konsantrasyonu ile, 0,01 g mikroküre ve 1 mL adsorpsiyon çözeltisi kullanılarak pH 8,5 ve oda sıcaklığı 22°C’ de adsorpsiyon deneyi, ardından 1 mL pH 10 borat tamponu veya 1 mL pH 7,0 fosfat tamponu kullanılarak desorpsiyon deneyi yapılmıştır. Her adsorpsiyon ve desorpsiyon sonrası yapılan santrifüj (5000 rpm, 10 dak) ile süpernatant alınarak ilgili dalgaboylarında absorbans okunmuş, Eşitlik 3.3

kullanılarak denge adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Adsorpsiyon kapasitesinin ve desorpsiyon veriminin tekrar sayısı ile nasıl etkilendiği incelenmiştir. Manyetik mikroküreler ile yapılan deneylerde sorbent ayırma santrifüj yerine mıknatıs yardımı ile yapılmıştır.

3.5.3. Sürekli Sistemde Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

SiO₂APBA mikroküreler sürekli sistem deneylerinde sabit faz olarak kullanılmıştır. SiO₂APBA mikroküreler iç çapı 300 µm, dış çapı 460 µm olan, 50 mm uzunluğunda, bir ucunda 2 µm gözenek açıklığına sahip paslanmaz çelik bir frit içeren kapiler kolon (Polymicrotechnologies Inc A.B.D.) içerisine dolgulanmıştır. Kolon içerisinde boşluk kalmamasına dikkat edilmiş olup optik mikroskop ile kontrolü yapılmıştır.



Şekil 3.3. Diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonunda kullanılan sürekli mikroakış sistemi [69].

SiO₂APBA mikroküreler ile doldurulmuş kolon öncelikle 30 dakika boyunca 5 µL/dk hızla HEPES tampon (pH 8,5) ile yıkanarak şartlanmıştır. Yıkama sonunda UV-Vis spektrofotometre de 260 nm'de absorban ölçümü ile kirlilik kontrolü yapılmış ve kolondan kirlilik gelmediğinde yıkama sonlandırılmıştır. İçerisinde belirli konsantrasyonlarda biyomolekül (RNA ya da β-NAD) bulunduran adsorpsiyon (50 mM MgCl₂ içeren pH 8.5 HEPES) tamponu mikro şırınga pompası (Harvard Apparatus, A.B.D.) yardımı ile farklı hızlarda (2–5 µL/dk) kolona beslenmiştir. Adsorpsiyon ortamı belirli bir süre boyunca, diol içeren molekül sabit faz üzerine tamamen adsorplanıncaya kadar mikrokolondan geçirilmiştir. Her 4 dakikada bir kolondan çıkan örnekler ependorf tüplerine toplanmış ve UV mikrospektrofotometrede (RNA için 258 nm ve β-NAD için 260 nm) absorbanları okunmuştur. Bu durum dengeye ulaşıncaya kadar devam etmiştir ve sürekli sistemde biyomolekül adsorpsiyon verimi (θ, % ağırlık) aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$\theta : [M_{\text{bm, adsorplanan}}/M_{\text{bm, yüklenen}}] \times 100 \quad (3.6)$$

$$M_{\text{bm, adsorplanan}} : M_{\text{bm, yüklenen}} - M_{\text{bm, adsorplanmayan}} \quad (3.7)$$

$$M_{\text{bm, yüklenen}} : Q_A \times C_0 \times t \quad (3.8)$$

$$M_{\text{bm, adsorplanmayan}} : V_A \times C_A \quad (3.9)$$

Burada;

$M_{\text{bm, yüklenen}}$: Mikrokolona yüklenen biyomolekül miktarı (mg)

Q_A : Adsorpsiyon ortamı akış hızı (µL/dak)

t : Adsorpsiyon ortamı akış süresi (dak)

C_0 : Adsorpsiyon ortamındaki biyomolekül derişimi (mg/µL)

$M_{\text{bm, adsorplanmayan}}$: Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin biyomolekül miktarı (mg)

V_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin hacmi (µL)

C_A : Adsorpsiyon sırasında toplanan örneğin biyomolekül derişimi (mg/µL)

Adsorpsiyon kısmı sonlandırıldıktan sonra şırınga desorpsiyon ortamı ile doldurulmuş bir şırınga ile değiştirilmiş ve desorpsiyon tamponu kolona verilmiştir. Desorpsiyon periyodu için örnekler yine 4 dk'lık aralıklarla ependorf tüplerine toplanmış ve absorbanları ölçülmüştür. İzole edilmiş biyomolekül miktarları desorpsiyon periyodu boyunca toplanan örneklerin hacim ve konsantrasyon değerleri yardımıyla hesaplanmıştır. Desorpsiyon verimi; mikrokolondan desorplanan biyomolekül miktarının (μg) mikrokolona adsorplanan biyomolekül miktarına (μg) yüzde oranı olarak hesaplanmaktadır. İzolasyon verimi (% ağı.) ise mikrokolondan desorplanan biyomolekül miktarının (μg) mikrokolona yüklenen biyomolekül miktarına (μg) yüzde oranı olarak bulunmaktadır.

3.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi adsorpsiyon dengesini ifade etmekte kullanılan, sabit sıcaklıkta (adsorbanın birim kütlesine) adsorplanan madde miktarı ile denge derişimi veya denge basıncı arasındaki bağıntılardır. Genel olarak bir adsorpsiyon adsorban üzerinde tutulan hedef molekül konsantrasyonu ile çözelti içerisinde kalan molekül konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder ve denge kurulduktan sonra bu değerlerde değişiklik olmaz. Bu izoterm adsorpsiyon türü, adsorban kapasitesi, adsorpsiyon enerjisi gibi bilgilerin elde edilmesinde rol oynamaktadır. Bu tür izotermde değişken koşullara uygun olacak şekilde farklı modeller bulunmaktadır ve varsayımlar ile yeni modellerin geliştirilebilmesi mümkündür. En önemli ve en yaygın kullanılan izoterm Langmuir ve Freundlich izotermidir [71, 72].

3.6.1. Langmuir izotermi

Başlangıçta gaz-katı faz adsorpsiyonunu açıklamak için tasarlanmış olan Langmuir izotermi aynı zamanda çeşitli adsorbanların adsorptif kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için de kullanılır. Bu izoterm yüzey kaplamasında adsorpsiyon ve desorpsiyon oranlarını dengeleyerek dinamik dengeyi sağlamaktadır. Adsorpsiyon

yüzeydeki adsorbat konsantrasyonu ve boş alan ile orantılı iken desorpsiyon ise kaplanan adsorbat yüzeyi ile orantılıdır. Doyma noktasında yüzeye adsorbe olan adsorbat miktarı sabit iken yüzey tek bir tabaka ile kaplanmaktadır [73].

Langmuir denklemi aşağıda Eşitlik 3.10 ile gösterilmektedir;

$$Q_e = \frac{Q_{max}bC_e}{1+bC_e} \quad (3.10)$$

- Q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan maddenin denge derişimi (mg/g)
 Q_{max} : Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi (mg adsorplanan ajan/g sorbent)
 b : Adsorpsiyon enerjisine bağılı Langmuir adsorpsiyon sabiti (mL/mg)
 C_e : Denge durumunda çözültide kalan moleköl konsantrasyonu (mg/mL)

Bu denklem lineer hale getirildiğinde Eşitlik 3.11 elde edilmektedir;

$$\frac{1}{Q_e} = \left[\frac{1}{Q_{max}b} \right] \left[\frac{1}{C_e} \right] + \left[\frac{1}{Q_{max}} \right] \quad (3.11)$$

Bu denklemden yola çıkarak $1/C_e$ 'ye karşı $1/Q_e$ grafiğı çizilmektedir. Bu grafikten elde edilen denkleme bakılarak y ekseninin kesildiğı nokta $1/Q_{max}$ değerini verirken grafiğın eğimi $1/Q_{max}b$ değerini vermektedir. Q_{max} değeri maksimum adsorplama kapasitesini göstermektedir.

Langmuir izotermi için bazı varsayımlar yapılmıştır. Adsorpsiyonun yüzeyde tek kat bir tabaka halinde homojen bir şekilde olduğu, adsorplanan moleküllerin hepsinin yüzeye afinitesinin aynı olduğu ve moleküllerin birbiri ile etkileşimi olmadığı, adsorplanan moleküllerin yüzey etrafında hareket etmediğı kabul edilmektedir [71, 72, 74].

3.6.2. Freundlich İzotermi

Freundlich izotermi heterojen yüzeylerde meydana gelen adsorpsiyon olaylarına uygulanabilir bir izotermidir. Bu izoterm yüzey heterojenitesini ve aktif bölgeler ile enerjilerinin dağılımlarını ifade eder ve matematiksel olarak Eşitlik 3.12’de aşağıdaki gibi gösterilmektedir;

$$Q_e = K_F(C_e)^{\frac{1}{n}} \quad (3.12)$$

Q_e : Denge anında birim adsorbent için adsorblanmış molekül miktarı (mg/g)

C_e : Denge durumunda çözeltide kalan molekül konsantrasyonu (mg/L)

K_F : Adsorpsiyon kapasitenin ölçütü olan Freundlich sabiti (L/g)

n : Adsorpsiyon şiddetinin ölçütü olan Freundlich sabiti

İzoterm denklemi lineer hale getirildiğinde Eşitlik 3.13 ile aşağıdaki gibi gösterilebilir;

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (3.13)$$

Denkleme bakılarak izoterm parametrelerinin hesaplanmasında $\log q_e$ ’ye karşılık $\log C_e$ grafiğinden yararlanılır. Bu grafikten elde edilen denklemde y eksenini kesen nokta $\log K_F$ ve eğim ise $1/n$ değerini vermektedir.

Deneyssel olarak elde edilen tüm verilerin izoterm denklemlerine uygulanarak grafiğe dökülmesiyle adsorpsiyonun hangi modelle daha iyi açıklandığına karar verilebilir. Verilerin doğrusal bir grafik oluşturmasıyla korelasyon katsayısı bulunur ve izoterm çeşidi seçilir. Adsorpsiyon bir modele uygun olabileceği gibi birden fazla modele de uygun olabilir [71, 73, 75].

Tez kapsamında deneysel yolla elde edilen veriler izoterm denklemlerine uyarlanmış ve grafik haline getirilmiştir. Böylece adsorpsiyon çalışmalarının hangi izoterme daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

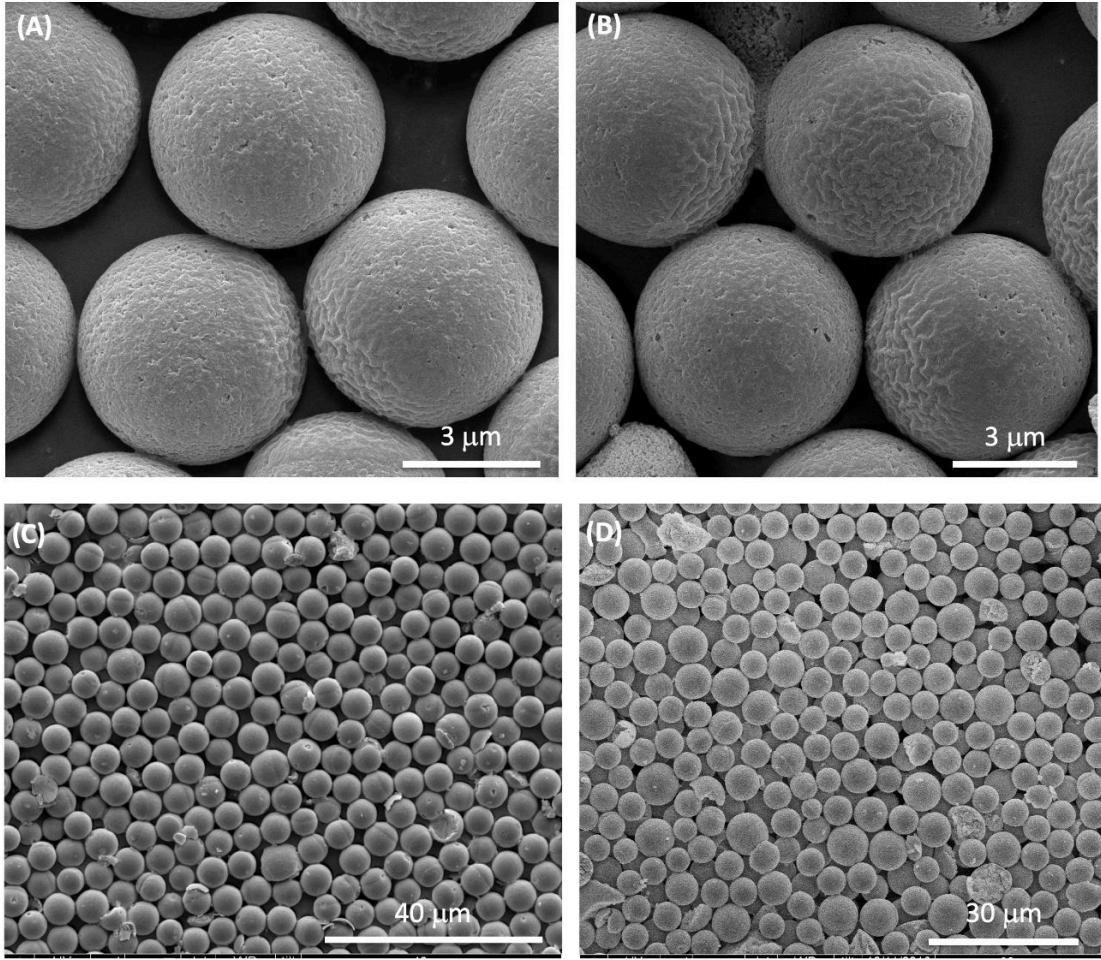
Bu çalışmada borat afinite kromatografisine uygun yeni bir sabit faz sentezlenmesinde başlangıç materyali olarak kullanılmak üzere SiO_2 ve MagSiO_2 mikroküreler kullanılmıştır. SiO_2 ve MagSiO_2 mikrokürelerin ortalama boyutları sırasıyla 5,50 μm ve 5,49 μm olup mikroküreler hem mezo hem makro boyutta gözenek dağılımına sahiptir. Ortalama 5,0 μm boyutlarında olan monodispers gözenekli silika mikrokürelerin ters faz, hidrofilik etkileşim ve biyoafinite kromatografisi gibi sistemlerin uygulamalarında yeni sabit fazların sentezlenmesinde yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu amaçla fenilborik asit ligandı olarak seçilen APBA, SiO_2 ve MagSiO_2 mikrokürelere bağlanarak yeni bir sabit faz oluşturulmuştur. Bu sistemin özellikle borat afinite kromatografisi uygulamalarında eser miktarlarda diol gruplu molekül içeren düşük hacimlerdeki örneklerde izolasyon için kullanılabileceği düşünülmektedir.

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında SiO_2 , SiO_2APBA , MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin ortalama boyutları, boy dağılımları, gözenek yapıları ve özellikleri, yüzey morfolojileri ve bileşimleri SEM, BET, XPS analizleri ile incelenmiştir. VSM analizleri ile MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin manyetik özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

4.1.1. SiO_2 ve SiO_2APBA Mikrokürelerin Karakterizasyonu

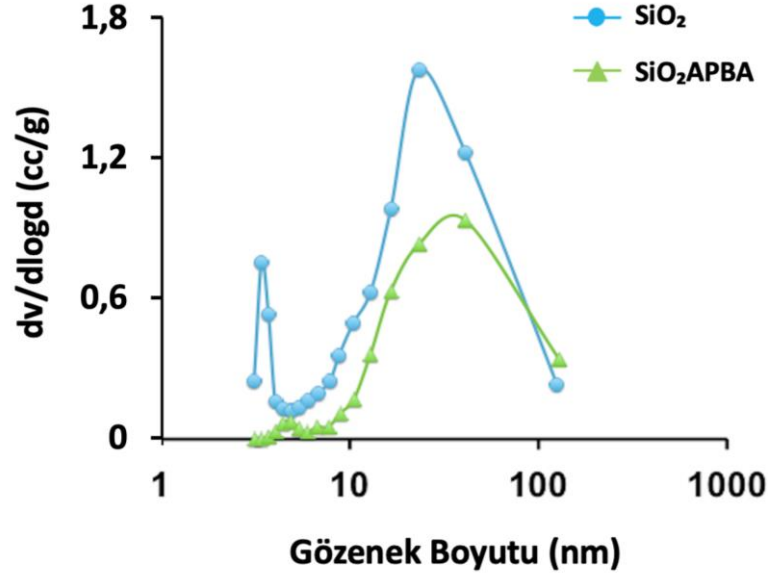
Monodispers gözenekli formdaki SiO_2 ve SiO_2APBA mikrokürelerin ortalama boyutları, boy dağılımı ve yüzey morfolojisi Şekil 4.1'de SEM fotoğraflarında görülmektedir.



Şekil 4.1. (A) SiO₂ ve (B) SiO₂APBA mikrokürelerin SEM görüntüleri (Büyütme Oranı: 20.000X) (C) SiO₂ ve (D) SiO₂APBA mikrokürelerin boy dağılımı (Büyütme Oranı: 2.500X) [69].

Şekil 4.1'e bakılarak hem SiO₂ hem de SiO₂APBA mikrokürelerin küresel formda dar bir boy dağılımı ile sentezlendiği ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır.

SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin gözeneklilik özellikleri azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi kullanılarak yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı ile incelenmiş ve mikrokürelerin özgül yüzey alanı (m²/g) ve ortalama gözenek boyutu (nm) değerleri tayin edilmiştir. Mikrokürelerin azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemiyle elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. SiO₂ ve SiO₂APBA mikroküreler için gözenek boyutu dağılım grafiği [69].

Şekil 4.1’de verilen SEM fotoğrafları kullanılarak sırasıyla Eşitlik 3.1 ve 3.2 yardımıyla hesaplanan ortalama mikroküre boyutu ile değişim katsayısı değerleri ile Şekil 4.2’de verilen gözenek boyutu dağılım eğrisi ile elde edilen ortalama gözenek boyutu ve BET modeline göre tayin edilen mikroküre özgül yüzey alanı değerleri ile Çizelge 4.1’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1. SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin boyut ve gözenek özellikleri [69].

Mikroküre	Ortalama Boy (μm)	Değişim Katsayısı (CV) (%)	Medyan Gözenek Boyutu (nm)	Özgül Yüzey Alanı (m^2/g)
SiO ₂	5,50	4,26	3,4, 23	374
SiO ₂ APBA	5,79	4,89	45	108

SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin ortalama boyutları sırasıyla 5,50 μm ve 5,79 μm olarak bulunmuştur. Mikroküre ortalama boyut değerleri arasındaki fark yapılan

istatistiksel analizin duyarlılığı ile ilgilidir. SiO₂ mikroküreler için % 4,26 olarak hesaplanan boy dağılımı değişim katsayısı (CV) SiO₂APBA mikroküreler için % 4,89 olarak hesaplanmıştır. CV değerinin %5'in altında olması mikrokürelerin eş boyutlu olarak sentezlendiğini göstermektedir.

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere, her iki mikroküre formunda hem makrogözenek hem mezogözenek bölgesinde 100 nm'ye kadar uzanan gözenek boy dağılımı gözlemlenmiştir. SiO₂ mikroküreler için iki farklı medyan gözenek boyutu 3,4 nm ve 23 nm değerlerinde iki ayrı pik halinde gözlemlenmiştir. SiO₂APBA mikroküreler için medyan gözenek boyutu mezogözenek bölgesinde 45 nm olarak bulunmuştur. Özgül yüzey alanları SiO₂ mikroküreler için 374 m²/g iken SiO₂APBA mikrokürelerde 108 m²/g olarak bulunmuştur. Mikrokürelere APBA bağlanması ile özgül yüzey alanının yaklaşık %70 oranında düştüğü görülmektedir. Özgül yüzey alanındaki bu düşüş SiO₂ mikrokürelere APBA bağlanmasında kullanılan alkali ortamın gözenek boyutunu genişletme etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin yüzey kompozisyonları XPS kullanılarak belirlenmiş ve XPS ölçüm sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin XPS kullanılarak elde edilen atomik yüzey kompozisyonu [69].

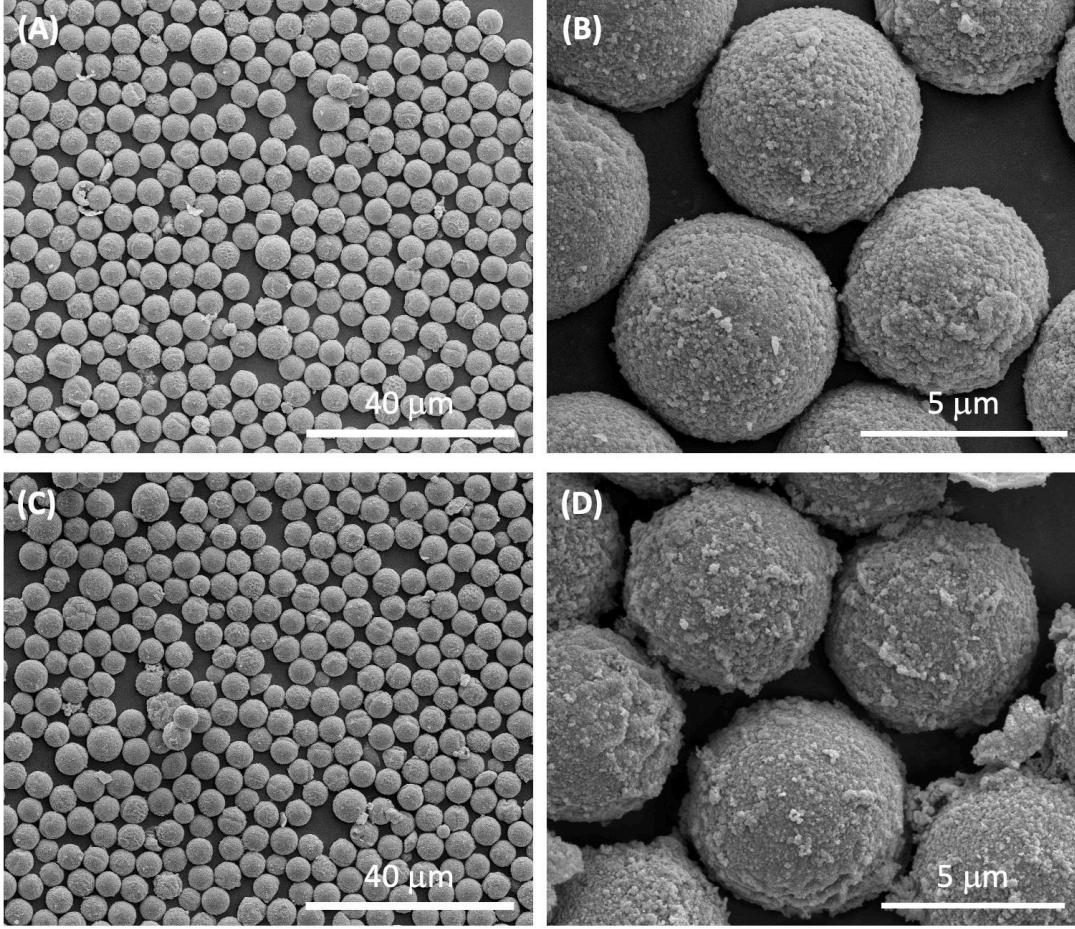
Mikroküre	Atom %				
	Boron (B)	Karbon (C)	Oksijen (O)	Silisyum (Si)	Azot (N)
SiO ₂	-	17,33	53,97	28,70	-
SiO ₂ APBA	0,84	27,86	46,44	23,39	1,48

Çizelge 4.2 incelendiğinde hem SiO₂ hem de SiO₂APBA mikrokürelerde karbon, oksijen ve silisyum varlığı görülmektedir. SiO₂APBA mikrokürelerde bulunan %0,84 boron

değeri mikroküreler üzerinde APBA varlığına işaret etmektedir. Mikrokürelerin yüzey kompozisyonuna özdeş bir kompozisyonda olduğu varsayılarak ve hidrojen içeriği göz ardı edilerek SiO₂APBA mikrokürelerin PBA içeriği 0,476 mmol PBA/g sorbent olarak belirlenmiştir. Silika mikroküreler çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon metodu ile sentezlenen poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelerin yüksek sıcaklıkta kalsinasyona tabii tutulmasıyla elde edilmiştir. Dolayısıyla silika mikroküreler üzerinde görünen karbon içeriği polimetakrilat kısmının kalsinasyonundan kaynaklanmaktadır.

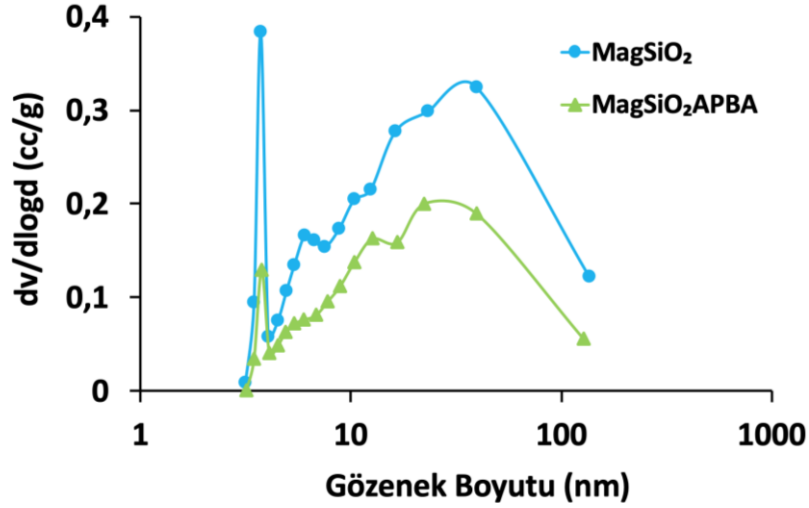
4.1.2. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA Mikrokürelerin Karakterizasyonu

MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin SEM fotoğrafları Şekil 4.3'te verilmiştir. Mikrokürelerin ortalama boyutları, boy dağılımı bu fotoğraflar yardımıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. (A), (B) MagSiO₂ ve (C), (D) MagSiO₂APBA mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme Oranı: (A) 2500X, (B) 20000X, (C) 2500X (D) 17500X.

BET cihazında azot adsorpsiyon desorpsiyon yöntemi ile MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin gözeneklilik özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.4 manyetik formdaki mikrokürelerin gözenek boy dağılım eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.4. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikroküreler için gözenek boyutu dağılım grafiği

Manyetik mikrokürelerin ortalama gözenek boyutu ve özgül yüzey alanı değerleri ile SEM görüntüleri kullanılarak hesaplanan ortalama boy ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin boyut ve gözenek özellikleri

Mikroküre	Ortalama Boy (µm)	Değişim Katsayısı (CV) (%)	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)	Özgül Yüzey Alanı (m ² /g)
MagSiO ₂	5,49	4,81	8,1	194,9
MagSiO ₂ APBA	5,63	4,99	12,9	63,0

Çizelge 4.3 incelendiğinde MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin ortalama boyutları sırasıyla 5,49 µm ve 5,63 µm olarak bulunmuştur. Mikrokürelerin CV değerleri sırasıyla %4,81 ve %4,99 olarak hesaplanmıştır.

MagSiO₂ mikrokürelerde 194,9 m²/g olan özgül yüzey alanı MagSiO₂APBA mikrokürelerde 63,0 m²/g olarak bulunmuştur. Özgül yüzey alanı yaklaşık % 67 oranında düşmüştür. MagSiO₂ mikroküreler için 8,1 nm olan ortalama gözenek boyutu MagSiO₂APBA mikroküreler için 12,9 nm olarak tayin edilmiştir. Bu durum SiO₂APBA mikroküreler için gözleendiği şekilde APBA bağlanması için kullanılan alkali Na₂CO₃ çözeltisinin gözenek boyutunu genişletme etkisi ile açıklanabilir.

MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin yüzey kompozisyonlarını belirlemek için XPS cihazı kullanılmış ve elde edilen XPS sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

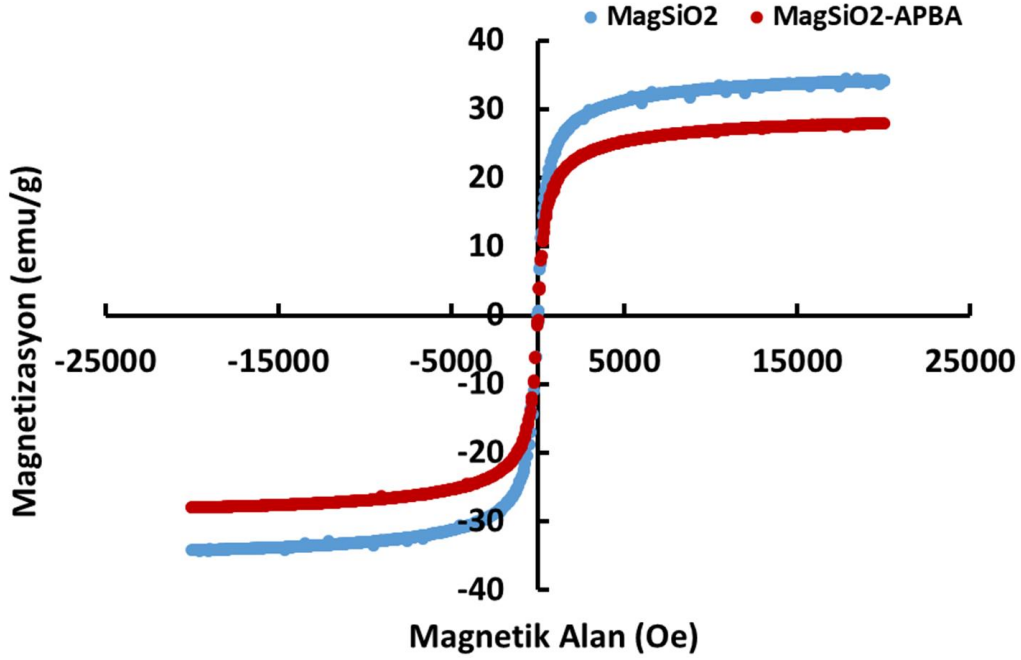
Çizelge 4.4. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin XPS kullanılarak elde edilen yüzey kompozisyonu verileri.

Mikroküre	Atom %					
	Boron (B)	Karbon (C)	Oksijen (O)	Silisyum (Si)	Azot (N)	Demir (Fe)
MagSiO ₂	-	19,56	56,79	22,2	-	1,45
MagSiO ₂ APBA	0,66	20,44	53,01	23,65	1,11	1,13

Manyetik mikrokürelerin sentezinde demir tuzları kullanılmıştır. XPS analizi sonuçlarına bakıldığında demir içeriği mikroküreler üzerinde saptanmıştır. Silika mikrokürelere benzer şekilde APBA ligandının bağlanması sonucu MagSiO₂APBA mikrokürelerde boron içeriği görülmektedir. Manyetik silika mikrokürelerin sentezinde de çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi kullanılmıştır. Karbon içeriği silika mikrokürelerde olduğu gibi polimetakrilat kısmın kalsinasyonu ile oluşmaktadır.

Manyetik mikroküreler titreşimli örnek manyetometresi ile analiz edilmiştir. Mikrokürelerin manyetizasyon davranışları görüntülenmiş ve doygunluk manyetizasyonu ölçülmüştür. VSM analizi sonucu elde edilen manyetizasyon eğrileri

Şekil 4.5'te görülmektedir. Her iki mikrokürenin süperparamanyetik f-davranış gösterdiği gözlenmiş ve doygunluk magnetizasyon değerleri MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler için sırasıyla 32 ve 26 emu/g olarak belirlenmiştir. Doymunluk magnetizasyon değerinde ortaya çıkan azalma, MagSiO_2 mikrokürelerin APBA ile etkileşimi sırasında kullanılan bazık ortamdan kaynaklandığı düşünölmektedir.



Şekil 4.5. MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin titreşimli örnek magnetometresi ile elde edilen manyetizasyon eğrileri.

4.2. Adsorpsiyon Desorpsiyon Çalışmaları

Tez kapsamında silika ve manyetik silika mikroküreler destek malzemesi olarak borat afinite kromatografisi sorbentlerinin sentezinde kullanılmıştır. Bu sistem diol gruplu moleküllerin izolasyonu için tasarlanmıştır. Hedef molekül olarak β -NAD ve RNA seçilmiş adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları ile seçilen biyomoleküllerin izolasyon davranışları incelenmiştir.

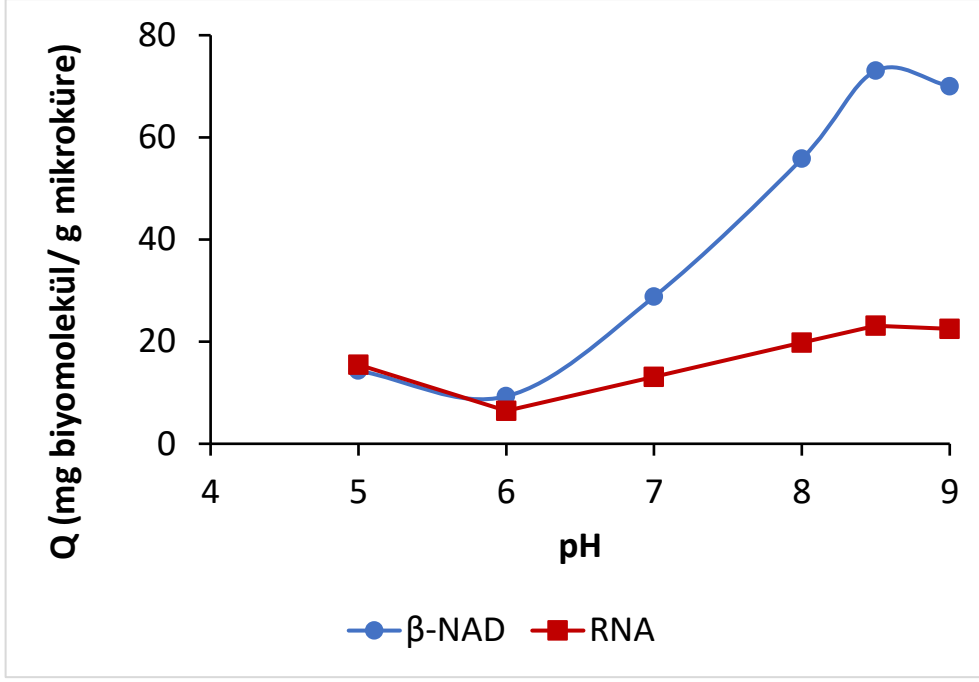
4.2.1. SiO₂ ve SiO₂APBA Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu

SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanımıyla, β -NAD ve RNA kullanılarak, kesikli sistemde pH, sıcaklık, sorbent derişimi, ve diol gruplu biyomolekül başlangıç konsantrasyonu etkileri incelenmiştir. Ayrıca sentezlenen mikrokürelerin sorbent olarak tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

4.2.1.1. pH Etkisi

pH taramaları kesikli sistemde SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak yapılmıştır. Diol grubu taşıyan örnek biyomoleküllerin (β -NAD ve RNA), pH 5,0 ve 9,0 aralığında öncelikle denge adsorpsiyon davranışı incelenmiştir.

Farklı pH değerlerinde SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β -NAD ve RNA için elde edilen denge adsorpsiyon değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



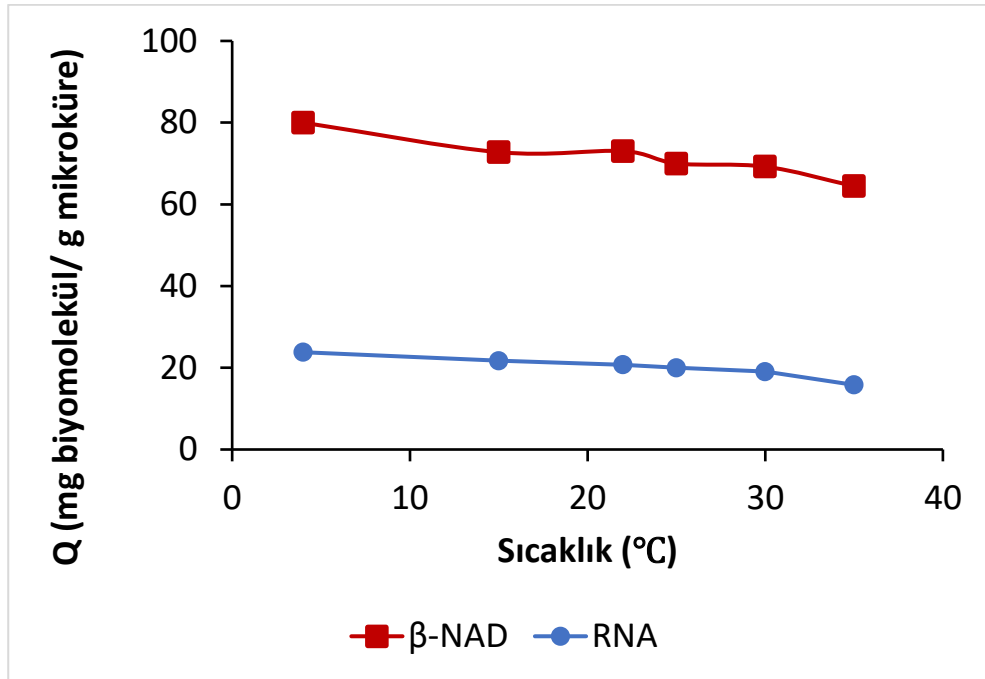
Şekil 4.6. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun ortam pH'ı ile değişimi. 50 mM HEPES, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat [69].

Şekil 4.6 incelendiğinde asidik değerlerde düşük olan adsorpsiyon kapasitesinin fenilborik asidin pKa'sı olan 8,86'ya yakın pH değerlerinde yükseldiği gözlemlenmiştir. β -NAD için en yüksek denge adsorpsiyon değeri pH 8,5'ta gram mikroküre başına 73,04 mg β -NAD olarak elde edilmiştir. β -NAD molekülüne benzer şekilde fenilborik asidin pKa'sına yakın olan pH 8,5'ta RNA için en yüksek denge adsorpsiyon değeri gram mikroküre için 23,11 mg RNA olarak elde edilmiştir. pH taramalarından elde edilen grafiklere bakılarak pH 8,5'ta bağlı APBA molekülü ile hedef diol gruplu biyomoleküller arasında halkasal borat ester yapısının etkin şekilde oluştuğu anlaşılmaktadır.

4.2.1.2. Sıcaklık Etkisi

Kesikli sistemde SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak diol gruplu moleküllerin adsorpsiyonları üzerine sıcaklık etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 4°C, 15°C, 22°C, 25°C, 30°C ve 35°C sıcaklıklarda denge adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır.

Ortam sıcaklığı ile değişen denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri β -NAD ve RNA için Şekil 4.7’de verilmiştir.

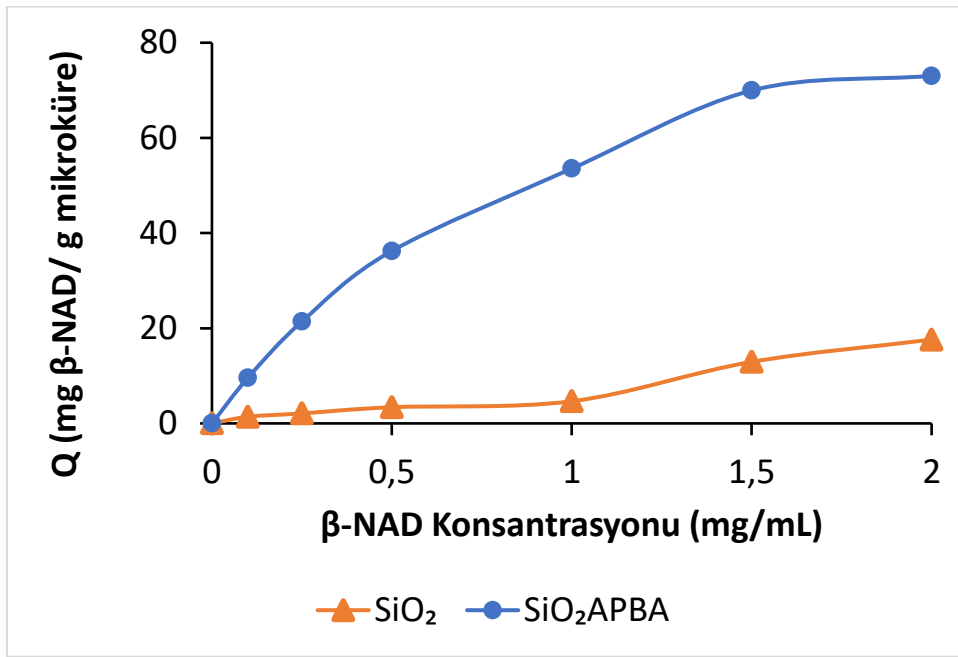


Şekil 4.7. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun ortam sıcaklığı ile değişimi. 50 mM MgCl₂ içeren 1 mL pH 8,5 HEPES adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat [69].

İki biyomolekül için de artan sıcaklık değerleri ile denge adsorpsiyonunda hafif bir düşüş gözlemlenmektedir. Denge adsorpsiyon değerinde oluşan düşüş adsorpsiyon prosesinin egzotermik karakteri ile açıklanabilir.

4.2.1.3. Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi

Konsantrasyon taramaları için biyomoleküllerin pH 8,5 HEPES tamponu içerisinde 0,1 mg/mL'den başlanarak 2,0 mg/mL'ye kadar değişen başlangıç derişimlerinde çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından biyomoleküller adsorpsiyon için SiO₂ ve SiO₂APBA mikroküreler ile etkileştirilmiştir. Bu deneylerde adsorpsiyon ortamının pH değeri 8,5'a ayarlanmıştır. B-NAD ile yapılan başlangıç konsantrasyonu taraması sonucu elde edilen denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri Şekil 4.8'da verilmiştir.



Şekil 4.8. Kesikli sistemde SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].

SiO₂APBA mikrokürelerle gram mikroküre başına 73,04 mg β-NAD ile en yüksek denge adsorpsiyonu değerine ulaşılmıştır. Grafiğe bakıldığında SiO₂ mikroküreler için de özellikle yüksek derişimlerde ölçülebilir denge adsorpsiyon değerleri elde edilmiştir. Bu adsorpsiyonun β-NAD ile SiO₂ mikroküre yüzeyi arasındaki spesifik olmayan etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Adsorplanan β -NAD için desorpsiyon davranışı da incelenmiş ve elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kesikli sistemde SiO_2 ve SiO_2APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β -NAD konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).

Desorpsiyon Verimi (%)		
β-NAD Konsantrasyonu (mg/mL)	SiO_2	SiO_2APBA
0,1	0,0	KD
0,25	2,1	88,4
0,5	2,5	87,1
1	8,5	86,0
1,5	9,4	85,7
2	21,4	85,5

Borat tamponu kullanılarak yapılan desorpsiyon çalışmalarında SiO_2APBA mikroküreler için elde edilen en düşük verim %85,5 olup 0,1 mg/mL β -NAD konsantrasyonu ile kantitatif desorpsiyona ulaşılmıştır. Silika mikroküreler ile elde edilen desorpsiyon verimleri özgül olmayan etkileşimleri açıklar yöndedir.

SiO_2APBA mikroküreler ile daha iyi bir izolasyon verimi eldesi amacıyla, desorpsiyon deneyleri desorpsiyon ortamı değiştirilerek tekrar yapılmıştır. Bu amaçla pH 7,0 değerine ayarlanmış 100 mM fosfat tamponu içerisine yarışmalı diol olarak sorbitol eklenmiş ve bu ortamda farklı β -NAD konsantrasyonları ile denge adsorpsiyonu sonrası, desorpsiyon verimi tespit edilmiştir. Bu amaçla öncelikle, desorpsiyon ortamı içerisine eklenecek sorbitol konsantrasyonuna karar vermek üzere farklı konsantrasyonlarda sorbitol eklemesi yapılarak desorpsiyon davranışı incelenmiştir. Sorbitol konsantrasyonunun değişmesiyle elde edilen desorpsiyon verileri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin sorbitol konsantrasyonu ile değişimi (β -NAD konsantrasyonu:1 mg/mL, sorbitol eklenmiş 1 mL, pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].

Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	β-NAD Desorpsiyon Verimleri (%)
0	81
10	83
25	84
50	87
100	92
200	KD
400	KD

Çizelge 4.6, β -NAD desorpsiyon veriminin sorbitol konsantrasyonu arttıkça arttığını göstermektedir. Verilere bakılarak, SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda, β -NAD ile yapılan desorpsiyon deneyleri için desorpsiyon tamponuna 200 mM sorbitol eklenmesine karar verilmiştir. Sorbitol eklenen fosfat tamponu ile yapılan deneylerde farklı β -NAD konsantrasyonları için SiO₂ mikroküreler elde edilen yeni desorpsiyon verimleri Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Buradan görüldüğü gibi β -NAD ile SiO₂ mikroküreler arasında spesifik olmayan etkileşime bağlı olarak gözlenen en-yüksek desorpsiyon verimi % 20 civarındadır.

Çizelge 4.7. Kesikli sistemde SiO₂ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β-NAD konsantrasyonu ile değişimi, (200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, MSS < %3) [69].

β-NAD Konsantrasyonu (mg/mL)	Desorpsiyon verimi (%)
0,1	0
0,25	5
0,5	5
1	14
1,5	18
2	20

SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β-NAD için her iki desorpsiyon ortamında elde edilen desorpsiyon ve izolasyon verimleri Çizelge 4.8’de gösterilmektedir.

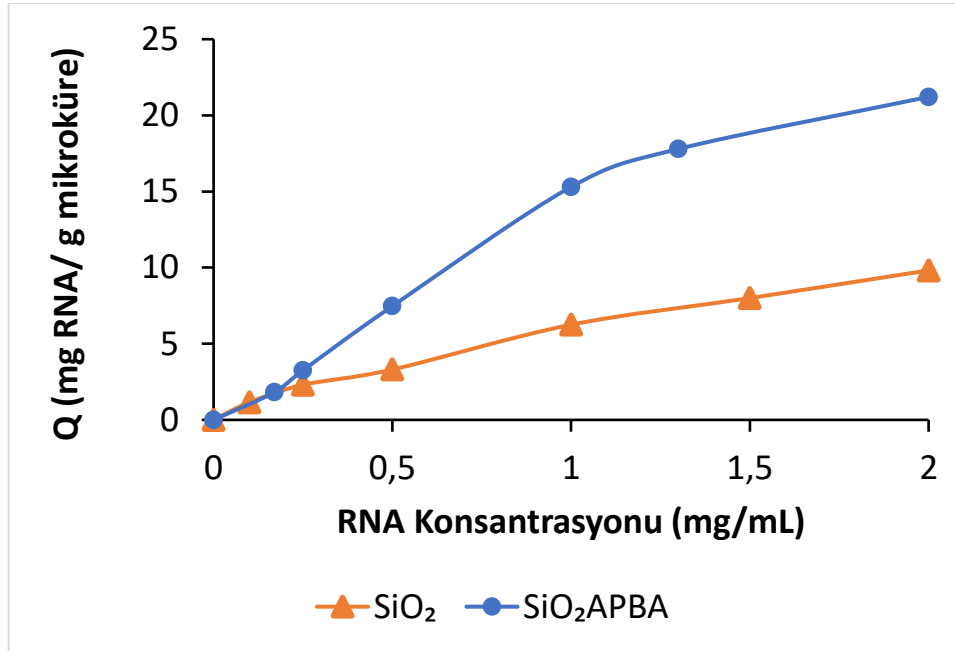
Çizelge 4.8. β-NAD biyomolekülü için SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak elde edilen desorpsiyon ve izolasyon verimleri (BT: 1 mL, pH 10,2 borat tamponu, FT: 200 mM sorbitol, 1 mL, pH 7 fosfat tamponu) [69].

β-NAD Konsantrasyonu (mg/mL)	Desorpsiyon Verimi (%)		İzolasyon Verimi (%)	
	BT	FT	BT	FT
0,10	KD	KD	95,7	95,7
0,25	88,4	KD	75,7	85,6
0,50	87,1	KD	63,1	72,5
1,00	86,0	KD	46,0	53,5
1,50	85,6	KD	39,9	46,6
2,00	85,5	KD	31,2	36,5

β-NAD ile yarışmalı diol olarak sorbitol eklenen nötral desorpsiyon tamponu kullanılarak SiO₂APBA mikrokürelerle yapılan desorpsiyon deneyleri ile kantitatif desorpsiyona

ulaşlmıştır. Bu sonuç aynı zamanda SiO₂APBA mikroküreler için β-NAD adsorpsiyonun bütünüyle halkalı borat ester oluşumu üzerinden yürüdüğünü göstermektedir. Desorpsiyonda sorbitolün diol gruplarının, sorbent üzerindeki borik asit gruplarına yarışmalı şekilde bağlanarak, adsorplanan β-NAD'ın sorbent üzerinden desorpsiyon ortamına bırakılmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu davranış, fenilborik asit grubuna karşı sorbitol'ün β-NAD'a kıyasla daha yüksek afinite bağlanma sabitine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Desorpsiyon tamponuna sorbitol eklenmesiyle desorpsiyon veriminin, buna bağlı olarak izolasyon veriminin arttığı görülmüştür. Bu durum yarışmalı diolün fenilborik asit grubuna daha güçlü bağlanma yeteneği ile açıklanabilir. Bu karşılaştırma yarışmalı diol eklenerek yapılan desorpsiyon ile daha fazla yüksek verimle β-NAD izolasyonu yapılabildiğini göstermiştir.

RNA ile yapılan başlangıç konsantrasyon taraması sonucu elde edilen denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri Şekil 4.9'da verilmektedir.



Şekil 4.9. Kesikli sistemde SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].

RNA için yapılan konsantrasyon taramalarında SiO₂APBA mikroküreler için beklentiye uygun olarak artan RNA konsantrasyonu ile artan adsorpsiyon kapasitesi gözlemlenmiştir. SiO₂ mikrokürelerde gözlemlenen değerlerin ise spesifik olmayan etkileşimlerden ortaya çıktığı düşünülmektedir. RNA; β-NAD'a göre daha düşük adsorpsiyon kapasitesi değerleri vermiştir, bu durum β-NAD biyomolekülünün iki adet diol içeren bağlantı noktasına sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Borat tampon desorpsiyon ortamında, RNA için SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanımı ile yapılan desorpsiyon çalışmalarından elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Kesikli sistemde SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).

Desorpsiyon Verimi (%)		
RNA Konsantrasyonu (mg/mL)	SiO₂	SiO₂APBA
0,1	16,3	KD
0,25	23,3	KD
0,5	35,5	90
1	42,8	KD
1,5	49,6	94
2	89,5	KD

Desorpsiyon çalışmalarında, SiO₂APBA mikroküreler sorbent olarak kullanıldığında borat tamponunda elde edilen en düşük desorpsiyon verimi % 90'dır. SiO₂ mikroküreler ile elde edilen oldukça düşük desorpsiyon verimlerinin, RNA'nın bu mikroküreler üzerine tersinmez ve spesifik olmayan adsorpsiyonu ile açıklanması mümkündür.

β-NAD ile yapılan çalışmalara benzer şekilde desorpsiyon tamponu değiştirilerek desorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla pH 7,0'de hazırlanmış 100 mM fosfat

tamponu içerisine yarışmalı diol olarak farklı konsantrasyonlarda sorbitol eklenmiş ve desorpsiyonlar tekrar gözlenmiştir. Değişen sorbitol konsantrasyonu ile elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.10’da verilmiştir. Veriler yardımıyla diğer deneylerde kullanılacak sorbitol derişimine karar verilmiştir.

Çizelge 4.10. SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin sorbitol konsantrasyonu ile değişimi (Sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].

Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	RNA Desorpsiyon Verimleri (%)
0	85
10	98
25	KD
50	KD
100	KD
200	KD
400	KD

RNA biyomolekölü kullanılarak sorbitol eklenmiş fosfat tamponu ile yapılan desorpsiyon çalışmalarında 10 mM’dan yüksek sorbitol konsantrasyonlarda kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. RNA biyomolekölü kullanılarak β-NAD’a göre daha düşük sorbitol konsantrasyonu ile kantitatif desorpsiyonlara ulaşılmıştır. Bu durum β-NAD’ın yapısında bulunan cis-diol gruplarının RNA’ya göre daha yoğun olması ve β-NAD’ın fenilborik aside olan yüksek afinitesi ile açıklanabilir. Çalışmalar sonucunda RNA desorpsiyon deneyleri için desorpsiyon ortamına 100 mM sorbitol eklenmesine karar verilmiştir ve 100 mM sorbitol eklenmiş fosfat tomponu ile yapılan deneylerden elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.11’de verilmektedir.

Çizelge 4.11. Kesikli sistemde SiO₂ ve SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (100 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7,0 fosfat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %3) [69].

Desorpsiyon Verimi (%)		
RNA Konsantrasyonu (mg/mL)	SiO₂	SiO₂APBA
0,1	12	KD
0,25	17	KD
0,5	30	KD
1	37	KD
1,5	45	KD
2	80	KD

RNA biyomolekülü ile SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak yapılan desorpsiyon çalışmalarında tüm RNA başlangıç konsantrasyonlarında kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. RNA ile SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak elde edilen izolasyon verimleri farklı tampon sistemleri için Çizelge 4.12’de karşılaştırılmaktadır. Bu Çizelgede BT; 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon tamponu ve FT; 100 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon tamponu ile yapılan çalışmaları göstermektedir.

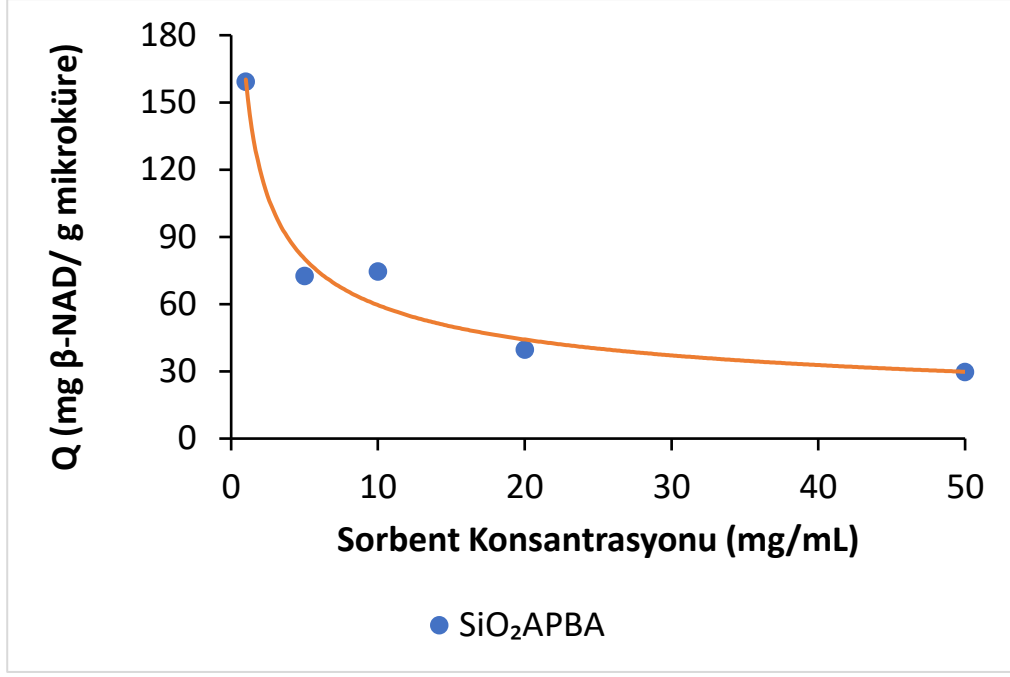
Çizelge 4.12. RNA için SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak farklı desorpsiyon ortamları ile elde edilen izolasyon verimleri. verimleri (BT: 1 mL, pH 10,2 borat tamponu, FT: 200 mM sorbitol, 1 mL, pH 7 fosfat tamponu) [69].

RNA Konsantrasyonu (mg/mL)	İzolasyon Verimi (%)	
	BT	FT
0,10	18,2	18,2
0,25	13,0	13,0
0,50	13,5	14,9
1,00	15,3	15,3
1,50	11,2	11,9
2,00	11,6	11,6

β -NAD ve RNA için SiO₂APBA mikroküreler ile yapılan desorpsiyon deneylerinde yarışmalı diol olarak eklenen sorbitol yardımıyla kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. Desorpsiyon tamponuna yarışmalı diol olarak eklenen sorbitol biyomoleküllerin desorpsiyon verimlerinin artmasında rol oynamıştır ve bu sonuç adsorpsiyon çalışmalarında borat afinitesi üzerinden halkalı borat esteri oluşumunu desteklemektedir. Sorbitolün diol grupları desorpsiyon boyunca ortama bırakılan RNA moleküllerinin diol grupları yerine fenilborik asit gruplarına bağlanmakta ve yarışmalı bağlanma hedef diol desorpsiyon veriminin artmasını sağlamaktadır. Yarışmalı diol eklenmesi ile izolasyon verimlerinin de yükseldiği görülmektedir.

4.2.1.4. Sorbent Konsantrasyonu Etkisi

β -NAD ve RNA için sorbent konsantrasyonu taraması SiO₂APBA mikroküreler ile yapılmıştır. Bu amaçla yapılan deneylerde önce denge adsorpsiyonu, daha sonra denge desorpsiyon davranışı çalışılmıştır. Şekil 4.10 sorbent konsantrasyonunun β -NAD denge adsorpsiyonuna etkisini göstermektedir.



Şekil 4.10. Kesikli sistemde SiO_2APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (β -NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].

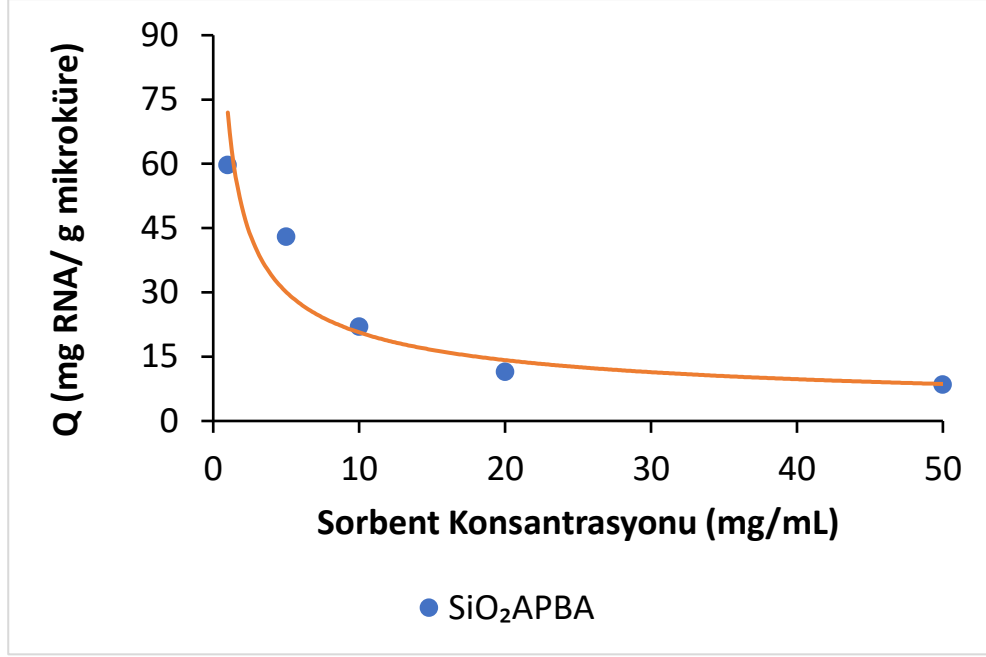
Sorbent konsantrasyonu arttıkça denge β -NAD adsorpsiyon kapasitesinin düştüğü görülmektedir. En yüksek denge adsorpsiyon değeri 159 mg β -NAD/g mikroküre olarak elde edilmiştir. Sorbent konsantrasyonunun artması ile birim sorbent kütlesi için β -NAD kütlesi azalmaktadır, bu yüzden gözlenen davranış beklendiği şekilde olup, literatür ile uyumludur. Çizelge 4.13, β -NAD için farklı SiO_2APBA mikroküre konsantrasyonları ile her iki desorpsiyon ortamında elde edilen desorpsiyon verimlerini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

Çizelge 4.13. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β-NAD % desorpsiyon verimleri (β-NAD konsantrasyon: 2 mg/mL, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, 10 mg sorbent, BT; 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı MSS < % 4, FT; 200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı MSS < % 3, KD: Kantitatif Desorpsiyon) [69].

Desorpsiyon Verimi (%)		
Sorbent Konsantrasyonu (mg/ml)	BT	FT
1	31	KD
5	51	KD
10	86	KD
20	86	KD
50	76	KD

Sorbitol eklenmiş pH 7, fosfat desorpsiyon tamponu ile SiO₂APBA mikroküreler kantitatif desorpsiyon verimi sağlamıştır. Sorbent konsantrasyonundan bağımsız olarak kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılabilmesi sorbent olarak kullanılan SiO₂APBA mikrokürelerin önemli bir avantajıdır.

RNA için de sorbent konsantrasyonu taraması yapılmış ve elde edilen denge adsorpsiyon grafiği Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat) [69].

En yüksek değer 2 mg/mL sorbent derişiminde 60 mg RNA/g sorbent olarak bulunmuştur. β-NAD ile gözlenen denge adsorpsiyon kapasitesinin artan sorbent derişimi ile azalma davranışı burada da gözlenmiştir. RNA sorbent konsantrasyonu taraması ile elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA % desorpsiyon verimleri (RNA konsantrasyon: 2 mg/mL, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, 10 mg sorbent, BT; 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, FT; 200 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon ortamı) [69].

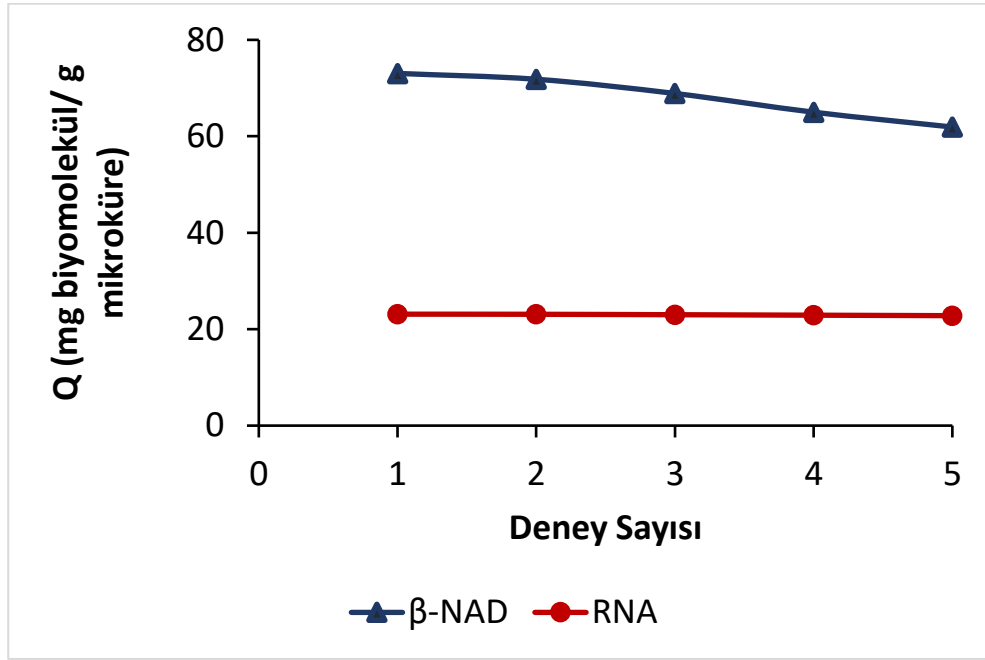
Desorpsiyon Verimi (%)		
Sorbent Konsantrasyonu (mg/mL)	BT	FT
1	KD	KD
5	94,1	KD
10	98,9	KD
20	KD	KD
50	KD	KD

Grafik incelendiğinde borat tamponu kullanılarak yüksek desorpsiyon verimlerinin elde edildiği görülmektedir. Fakat deneylerin sorbitol içeren fosfat tamponu ile tekrarlanmasından sonra tüm konsantrasyonlar için kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. Sorbent olarak kullanılan SiO₂APBA mikrokürelerin iki biyomolekülde de kantitatif desorpsiyon verimleri sağlayabildiği görülmektedir. Sorbent miktarından bağımsız olarak kantitatif desorpsiyon verimi eldesi sentezlenen sorbentin önemli avantajı olup; diol gruplu hedef biyomolekülün farklı koşullarda kantitatif geri kazanılması önemlidir.

4.2.1.5. Tekrarlanabilirlik Davranışı

Tekrarlanabilirlik çalışmaları SiO₂APBA mikroküreler ile adsorpsiyon çalışmaları HEPES adsorpsiyon tamponu ile desorpsiyon çalışmaları ise β-NAD ve RNA için sırasıyla 200 mM ve 100 mM sorbitol eklenmiş 1 mL pH 7 fosfat desorpsiyon tamponu kullanılarak yapılmıştır. Bu parametre mikrokürelerin uygulamalarda kullanılmasında büyük önem arz etmektedir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon deneyleri aynı mikroküreler ile 5 kez arka arkaya tekrarlanmıştır. Deney sonucunda mikrokürelerin adsorpsiyon davranışları incelenmiştir. Şekil 4.12; SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β-NAD ve

RNA biyomoleküllerinin tekrar sayısı ile değişen adsorpsiyon kapasitesi değerlerini göstermektedir.



Şekil 4.12. Kesikli sistemde SiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun tekrar sayısı ile değişimi (Adsorpsiyon koşulları: Hacim: 1 mL, Sorbent konsantrasyonu: 10 mg/mL, Ortam: 50mM HEPES buffer+ 50mM MgCl₂, pH 8.5. Sıcaklık: 22 °C, Çalkalama hızı: 120 cpm, Süre: 2 saat. Desorpsiyon koşulları: Hacim: 1 mL, Desorpsiyon ortamı: 100 mM fosfat tamponu, pH 7.0 Sorbitol konsantrasyonu: RNA: 100 mM, β -NAD: 200 mM, Sıcaklık: 22 °C, Çalkalama hızı: 120 cpm, Süre: 2 saat [69].

Şekil 4.12 incelendiğinde β -NAD için adsorpsiyon kapasitesinde hafif düşme görülmektedir. β -NAD için denge adsorpsiyon kapasitesi 73,04 mg/g'den 61,92 mg/g'a düşmüştür. Bu durum ardışık kullanımda mikrokürelerin bağlanma noktalarının azalması ile açıklanabilir. Bu durum kısmi desorpsiyon ile açıklanabilir. RNA ile yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise 5 adsorpsiyon desorpsiyon döngüsü sonunda görülen düşüş ihmal edilebilecek düzeydedir. İlk noktada 23,11 mg/g olan adsorpsiyon kapasitesi 5. adsorpsiyon döngüsüne bakıldığında 22,80 mg/g'a düşmüştür. Tekrarlanabilirlik

çalışmaları ile elde edilen bu sonuçlar SiO₂APBA mikrokürelerin diol gruplu biyomolekül izolasyonu için denge adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir düşüş olmadan tekrar kullanılabilceğini göstermektedir.

4.2.2. SiO₂APBA mikroküreler ile kesikli sistemde biyolojik örneklerden RNA izolasyonu [69]

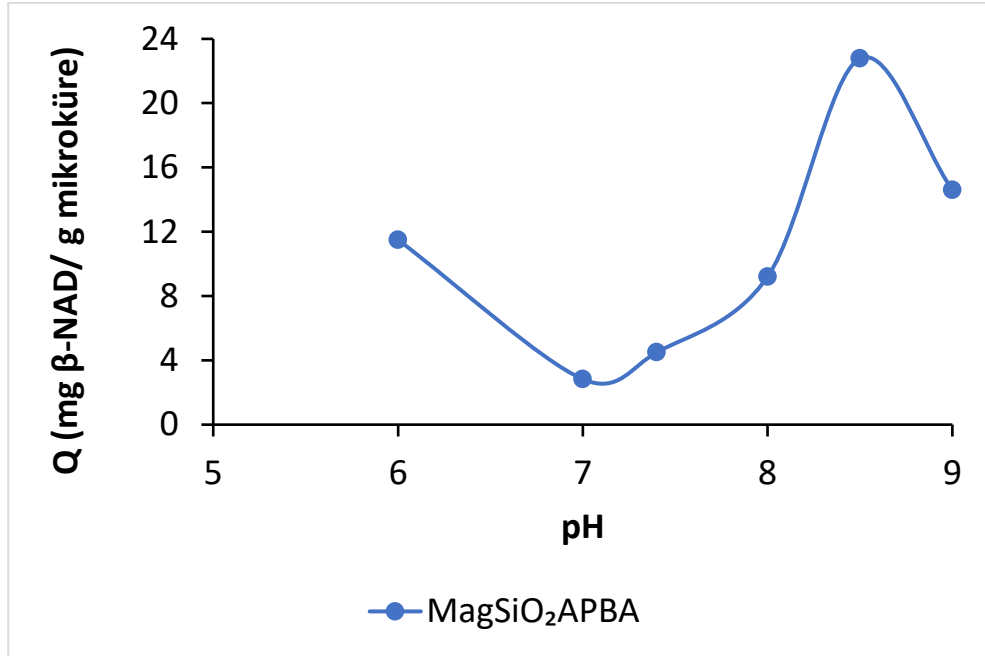
Tez kapsamında sentezlenen SiO₂APBA mikroküreler, tez kapsamı dışında, fakat laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmada, kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon yoluyla memeli (HEK 293) ve bakteri (E. Coli, BL21) hücrelerinden RNA izolasyonu için kullanılmıştır [69]. Bu çalışma ile, elde edilen memeli ve bakteri RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi, her iki hücre türü için de RNA'nın yüksek saflıkta ve yapısal bütünlüğü korunarak, izole edilebildiğini göstermiştir [69]. Memeli RNA örneği ile 28S and 18S rRNA için iki tipik band agaroz jel elektroforez'de bariz olarak gözlenmiş ve görüntü analizleme yazılımı ile ilgili bantların idealde 2.0 olması gereken oranı 1.8 olarak bulunmuştur [69]. Benzer şekilde, E. Coli'den elde edilen bakteriyel RNA örneği için tipik olan 23S rRNA and 16S rRNA bantları bariz şekilde agaroz jel elektroforezi ile elde edilmiştir [69]. Bu sonuçlar, tez kapsamında üretilen borat afinite sorbentinin, biyolojik örneklerde, memeli ve bakteri hücrelerinden RNA izolasyonu için başarıyla kullanılabilceğini de ortaya koymuştur.

4.2.3. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA Mikroküreler ile Kesikli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu

β -NAD ve RNA için MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikroküreler ile kesikli sistemde pH, sıcaklık, sorbent konsntrasyonu, biyomolekül başlangıç konsantrasyonu ve tekrarlanabilirlik taramaları yapılmıştır.

4.2.3.1. pH Etkisi

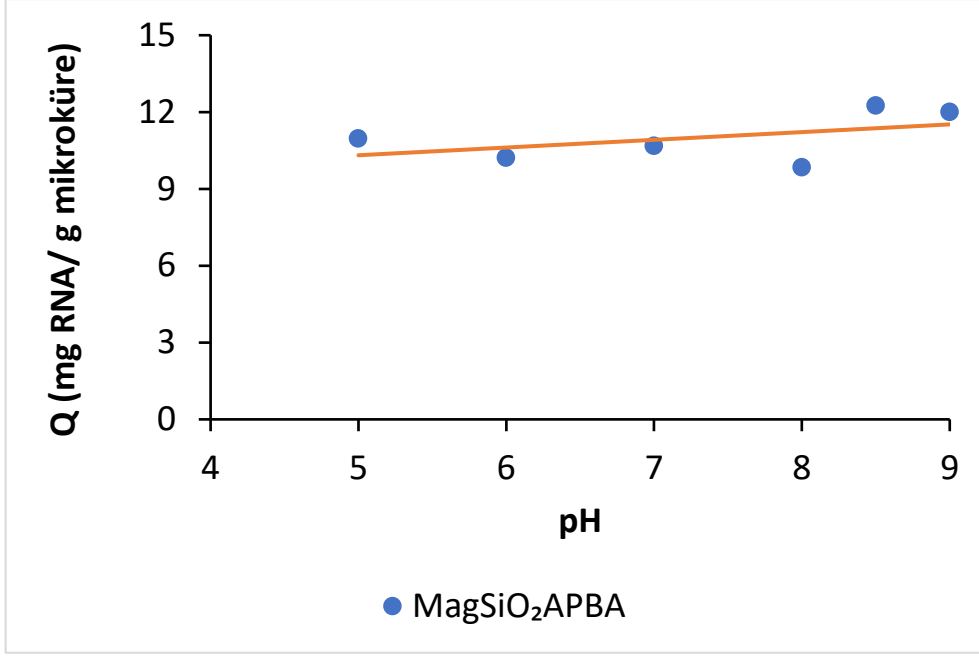
β -NAD ve RNA ile, pH 5,0 ve 9,0 aralığında adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. β -NAD için denge adsorpsiyon değerinin pH ile değişimi Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD denge adsorpsiyonunun ortam pH’ı ile değişimi (β -NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 50 mM MgCl_2 içeren 1 mL adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat)

$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak yapılan deneylerde denge β -NAD adsorpsiyon kapasitesinin SiO_2APBA mikrokürelere benzer şekilde, fenilborik asidin pKa’sı olan 8,86’ya yakın pH değerlerinde yükseldiği görülmektedir. En yüksek değer pH 8,5’te gram mikroküre başına 22,8 mg β -NAD olarak elde edilmiştir.

RNA için $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile yapılan pH taraması sonucu elde edilen denge RNA adsorpsiyonu değerleri Şekil 4.14’te verilmektedir.

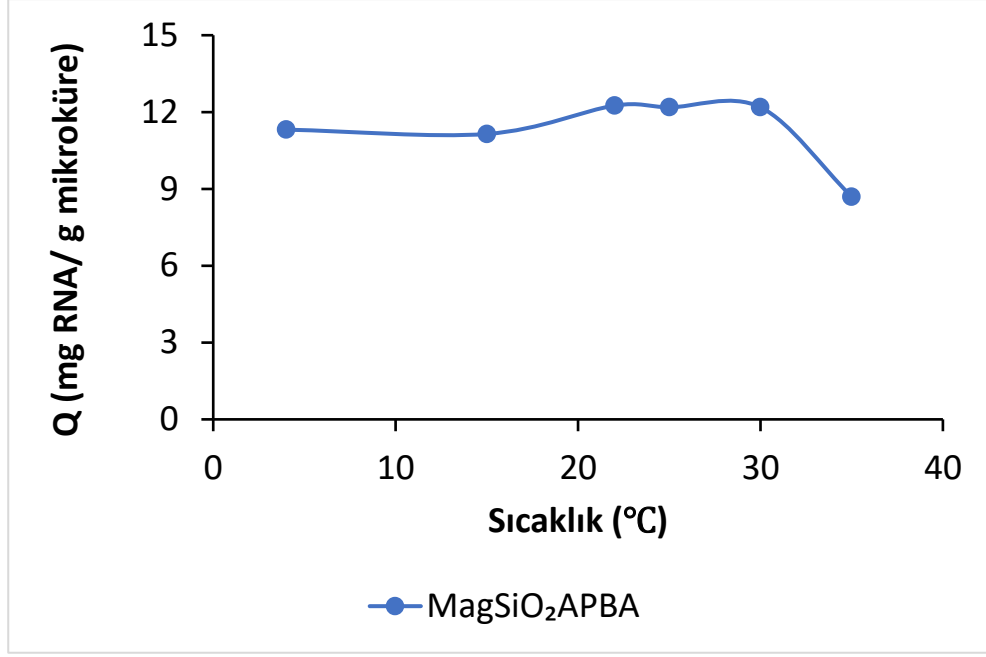


Şekil 4.14. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun ortam pH'ı ile değişimi (RNA konsantrasyon: 2 mg/mL, 50 mM MgCl_2 içeren 1 mL adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).

Grafik incelendiğinde en yüksek adsorpsiyon kapasitesi değerine β -NAD için elde edilen eğilimde olduğu gibi pH 8,5'ta ulaşıldığı görülmektedir. Böylece iki biyomolekül için de pH 8,5 en uygun adsorpsiyon ortam pH değeri olarak seçilmiştir.

4.2.3.2. Sıcaklık Etkisi

Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak sıcaklığın RNA denge adsorpsiyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Adsorpsiyon deneyleri 4°C, 15°C, 22°C, 25°C, 30°C ve 35°C sıcaklıklarda yapılmıştır. Şekil 4.15; $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler sorbent olarak kullanıldığında denge RNA adsorpsiyonunun sıcaklıkla değişimini göstermektedir.



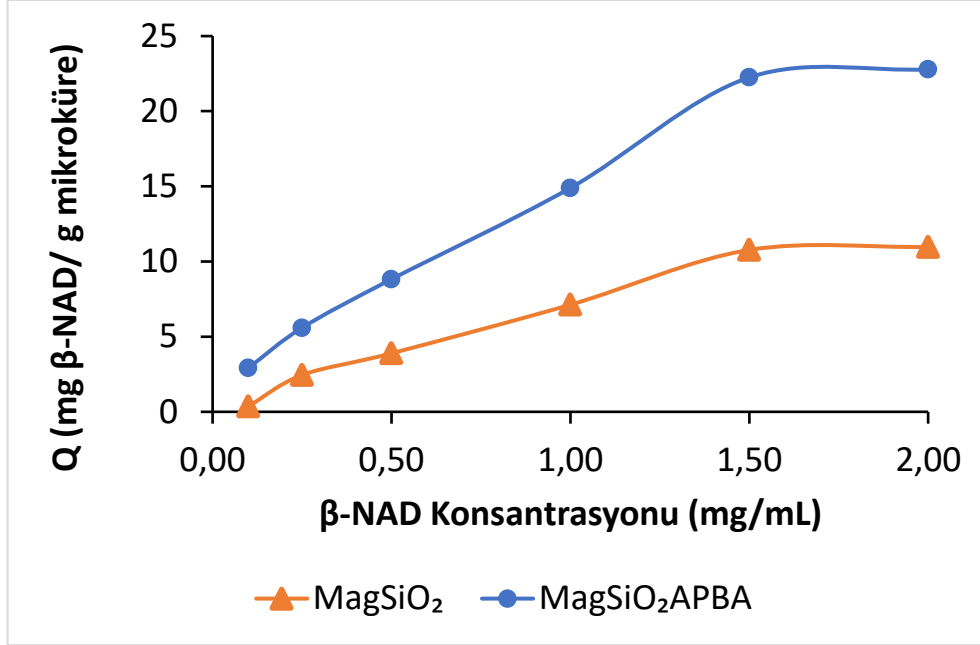
Şekil 4.15. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonunun ortam sıcaklığı ile değişimi (RNA başlangıç konsantrasyonu: 2 mg/mL, 50 mM MgCl_2 içeren 1 mL pH 8,5 HEPES adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, 120 cpm, 2 saat).

Şekil incelendiğinde 4°C'den 30°C'ye kadar artan sıcaklıklarda adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmediği görülmektedir. 30°C'dan sonra denge adsorpsiyon kapasitesinde oluşan düşme sıcaklık ile RNA'nın üç boyutlu konfigürasyonundaki olası değişimlere bağlanabilir. Bu eğilim dikkate alınarak, $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile yapılan çalışmalar oda sıcaklığında devam ettirilmiştir.

4.2.3.3. Biyomolekül Başlangıç Konsantrasyonu Etkisi

Bu deneyler için pH 8,5 HEPES tamponu içerisinde seçilen biyomoleküllerin çeşitli başlangıç konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Biyomoleküllerin 0,1 mg/mL'den 2 mg/mL'ye kadar başlangıç konsantrasyonlarını içeren çözeltileri (1 mL) adsorpsiyon için MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelere eklenmiş ve elde edilen dispersiyon 2 saat boyunca oda sıcaklığında adsorpsiyon işlemine maruz bırakılmıştır.

MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerle adsorpsiyon çalışmalarında değişen β -NAD başlangıç konsantrasyonunun denge adsorpsiyon değerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.16'da verilmektedir.



Şekil 4.16. Kesikli sistemde MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç β -NAD konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat)

β -NAD için yapılan başlangıç konsantrasyonu deneylerinde MagSiO₂APBA mikroküreler kullanılarak 2 mg/mL konsantrasyonda denge adsorpsiyon değeri 22,78 mg β -NAD/g mikroküre olarak bulunmuştur. SiO₂ mikrokürelerle yapılan çalışmalarda olduğu gibi MagSiO₂ mikrokürelerde de spesifik olmayan etkileşimlere bağlı olarak daha düşük denge adsorpsiyonu değerleri elde edilmiştir.

Adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin SiO₂APBA mikrokürelere kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durumun yüzeye tutulan demir oksit nanopartiküllerin diol gruplu biyomolekül adsorpsiyonu için gerekli fenilborik asit grup yüzey derişimi ve park

alanında azalmaya neden olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum β -NAD için denge adsorpsiyon kapasitesi değerinin azalmasına neden olmaktadır.

Adsorpsiyon sonrası MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler desorpsiyona maruz bırakılmıştır. Elde edilen β -NAD desorpsiyon verimleri Çizelge 4.15'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.15. Kesikli sistemde MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç β -NAD konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4)

Desorpsiyon Verimi (%)		
β-NAD Konsantrasyonu (mg/mL)	MagSiO_2	$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$
0,1	54,3	KD
0,25	53,2	KD
0,5	41,0	KD
1	36,1	KD
1,5	38,7	KD
2	40,5	KD

Desorpsiyon çalışmaları borat tamponu kullanılarak yapılmıştır ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerle kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. Desorpsiyonlar her başlangıç konsantrasyonunda kantitatif olarak gerçekleştiği için manyetik mikroküreler ile yapılan bu çalışmalarda yarışmalı diol kullanılmasına gerek duyulmamıştır. MagSiO_2 mikroküreler ile de düşük desorpsiyon verimleri elde edilmiştir. Bu değerlerin; adsorpsiyon grafiğinde elde edilen düşük adsorpsiyon kapasiteleri ile birlikte değerlendirildiğinde spesifik olmayan etkileşimleri desteklediği görülmektedir.

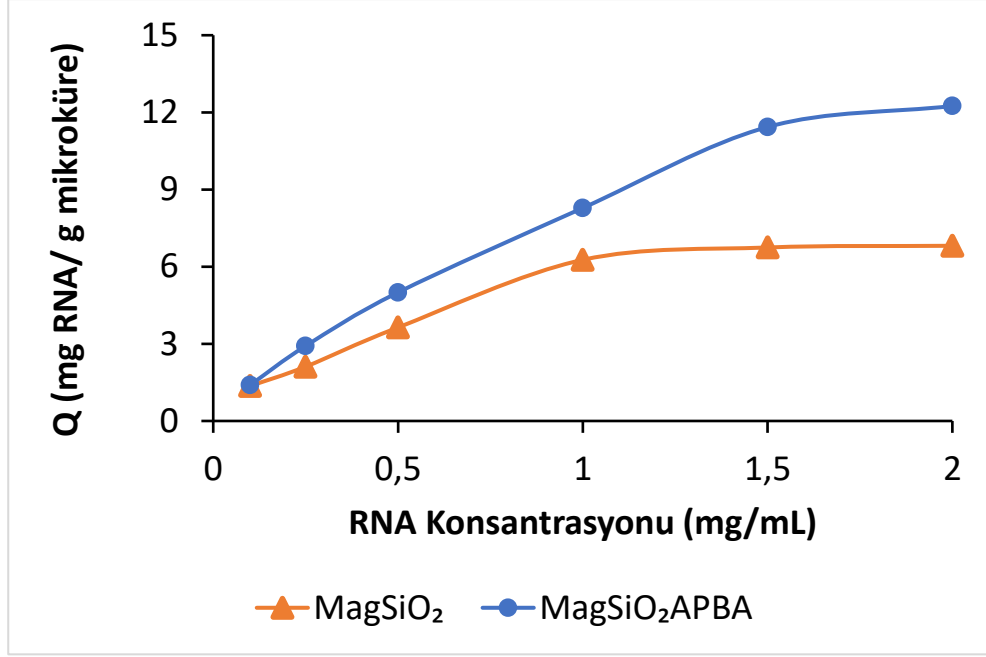
$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin desorpsiyon ve izolasyon verimleri (%) Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. β -NAD için $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak farklı β -NAD başlangıç derişimleri ile elde edilen izolasyon verimleri (%).

β-NAD Konsantrasyon (mg/mL)	İzolasyon Verimi (%)
0,1	29,2
0,25	22,4
0,5	17,7
1	14,9
1,5	14,8
2	11,4

İzolasyon verimi desorpsiyon sonucu elde edilen biyomolekül kütesinin ilk aşamada adsorpsiyon sistemine yüklenen biyomolekül miktarına oranı ile bulunmaktadır ve β -NAD için çalışılan kesikli sistemde %29'a varan izolasyon verimleri elde edilmiştir.

MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanılmasıyla RNA başlangıç konsantrasyonunun değişimi ile elde edilen denge RNA adsorpsiyonu değerleri Şekil 4.17'de verilmektedir.



Şekil 4.17. Kesikli sistemde MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda denge adsorpsiyonunun başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi. (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).

RNA konsantrasyon taramalarında denge adsorpsiyon kapasitesine g sorbent başına 12,25 mg RNA olmak üzere 2 mg/mL konsantrasyonda ulaşılmıştır. Artan konsantrasyon ile artan RNA adsorpsiyon değerleri çalışmadaki diğer veriler gibi beklentiye uygun şekildedir. MagSiO₂ mikroküreler ile elde edilen değerlerin aynı şekilde spesifik olmayan etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. MagSiO₂ mikroküreler ile β -NAD biyomolekülünde 22,78 mg adsorpsiyon kapasitesi değerine ulaşılırken RNA biyomolekülü ile bu değer 12,25 mg'da kalmıştır. β -NAD ile RNA'dan daha yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmasının nedeni β -NAD'ın RNA'ya göre daha fazla diol grubu içermesi ve bu yüzden MagSiO₂APBA mikrokürelere daha yüksek afinite göstermesidir.

RNA için MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikroküreler ile elde edilen desorpsiyon verimleri Çizelge 4.17'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.17. Kesikli sistemde MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda desorpsiyon veriminin başlangıç RNA konsantrasyonu ile değişimi, (1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4).

Desorpsiyon Verimi (%)		
RNA Konsantrasyonu (mg/mL)	MagSiO_2	$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$
0,1	KD	KD
0,25	KD	KD
0,5	KD	KD
1	KD	KD
1,5	KD	KD
2	KD	KD

$\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile RNA desorpsiyon çalışmalarında kantitatif desorpsiyon oranlarına ulaşılmıştır. Kantitatif desorpsiyon oranları, adsorplanan moleküllerin tümünün mikroküreler üzerinden geri kazanılabildiğini göstermektedir.

RNA için $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak elde edilen izolasyon verimleri Çizelge 4.18’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.18. RNA için MagSiO₂APBA mikrokürelere kullanılarak elde edilen desorpsiyon verimleri (%) ile izolasyon verimleri (%)

RNA Konsantrasyon (mg/mL)	İzolasyon Verimi (%)
0,1	14,0
0,25	11,7
0,5	10,0
1	8,3
1,5	7,6
2	6,1

MagSiO₂APBA mikrokürelere ile RNA için alınan en yüksek izolasyon verimi %14 olarak bulunmuştur. RNA için β-NAD'a kıyasla daha düşük adsorpsiyon kapasiteleri ve daha düşük izolasyon verimleri elde edilmiştir. Bu durumun RNA molekülündeki diol derişim yoğunluğunun β-NAD'a kıyasla daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Biyomolekül başlangıç konsantrasyon taramalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde;

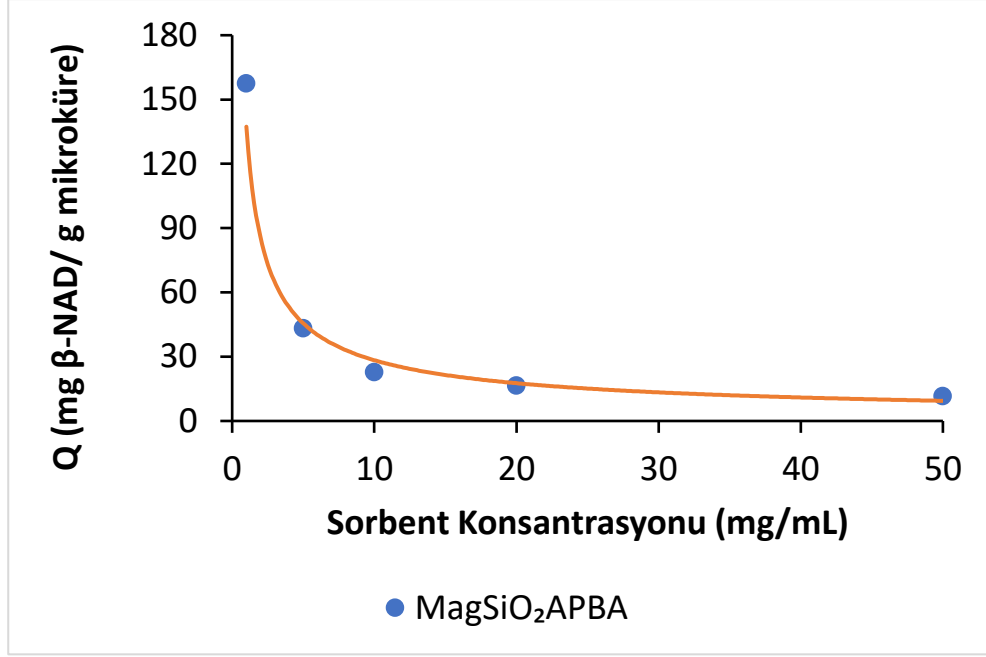
- Her iki biyomolekül için de MagSiO₂APBA mikrokürelere ile SiO₂APBA mikrokürelere göre daha düşük denge adsorpsiyon kapasitesi ve izolasyon verimi değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. MagSiO₂APBA mikrokürelere manyetizasyonun sağlanması için demir oksit nanopartiküller eklenmiştir ve bu durum diol adsorpsiyonu için fenilborik asit fonksiyonel grup derişimi ve park alanını azaltmaktadır. Başka bir deyimle MagSiO₂APBA mikrokürelere SiO₂APBA mikrokürelere kıyasla daha düşük derişimde APBA bağlandığı düşünülmektedir.

- Hem SiO₂APBA mikroküreler hem de MagSiO₂APBA mikroküreler ile RNA için β-NAD'a kıyasla daha düşük denge adsorpsiyon kapasitesi ve izolasyon verimi değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. Bu farkın β-NAD'ın diol grup yoğunluğunun RNA'ya kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.2.3.4. Sorbent Konsantrasyonu Etkisi

Bu amaçla β-NAD ve RNA için MagSiO₂APBA mikroküreler ile sorbent olarak kullanılmıştır. 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan MagSiO₂APBA mikroküre dispersiyonlarına üst tarafta bulunan sıvı kısım alındıktan sonra belirli konsantrasyonda β-NAD veya RNA eklenmiştir. 2 saat süren denge adsorpsiyonu sonunda MagSiO₂APBA mikroküreler 1 saat boyunca desorpsiyona maruz bırakılmıştır. Desorpsiyon deneyleri pH 10,2 borat tamponu ile yapılmıştır.

MagSiO₂APBA mikrokürelerin değişen konsantrasyonu ile β-NAD denge adsorpsiyon kapasitesi arasındaki ilişki Şekil 4.18'de gösterilmektedir.



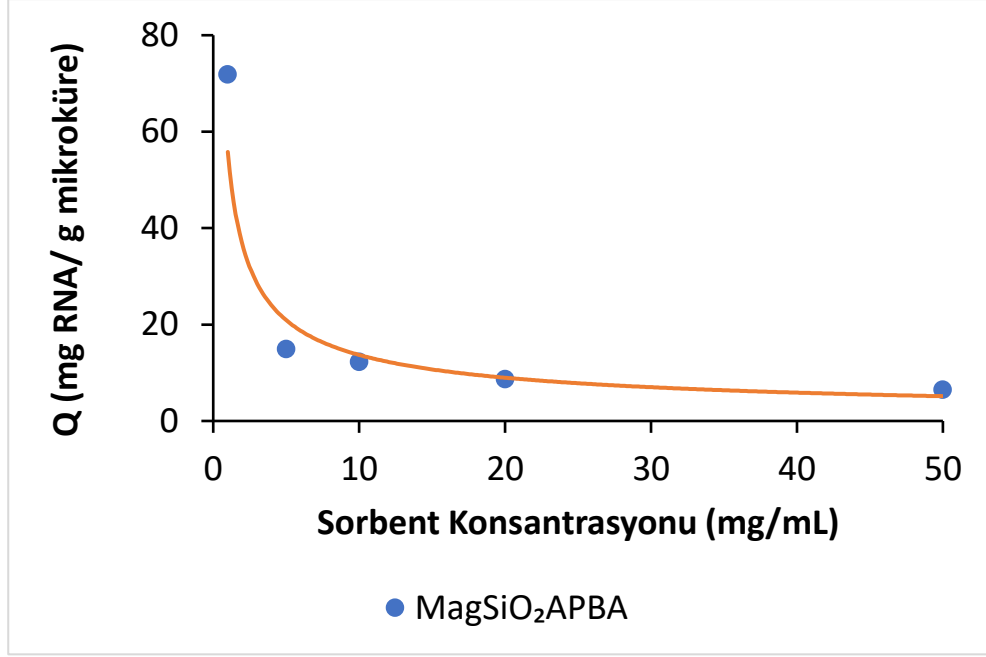
Şekil 4.18. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD denge adsorpsiyonunun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (β -NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat).

Sorbent miktarı arttıkça adsorpsiyon kapasitesinde görülen düşüş beklentiye uygun olarak elde edilmiştir. En yüksek denge adsorpyon değeri 157,48 mg β -NAD/g mikroküre olarak elde edilmiştir. Çizelge 4.19 farklı konsantrasyonlarda $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile elde edilen β -NAD desorpsiyon verimlerini göstermektedir.

Çizelge 4.19. Kesikli sistemde MagSiO₂APBA mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda % desorpsiyon verimleri (β-NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4)

Desorpsiyon Verimi (%)	
Sorbent Konsantrasyonu (mg/mL)	MagSiO₂APBA
1	14,0
5	58,0
10	KD
20	KD
50	KD

Artan MagSiO₂APBA sorbent konsantrasyonu ile artan β-NAD desorpsiyon verimleri elde edilmiştir. 10 mg/mL, 20 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlar kantitatif desorpsiyon verimleri gözlenmiştir. Farklı MagSiO₂APBA mikroküre konsantrasyonları ile yapılan RNA adsorpsiyon çalışmaları Şekil 4.19’da verilmektedir.



Şekil 4.19. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda RNA denge adsorpsiyonununun sorbent konsantrasyonu ile değişimi (RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL, 1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat)

β -NAD'a benzer şekilde artan sorbent miktarı ile düşen denge adsorpsiyonu değerleri RNA için de elde edilmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi değeri mg sorbent başına 71,82 mg RNA olarak bulunmuştur. Sorbent konsantrasyonu değiştirilerek yapılan desorpsiyon çalışmalarında elde edilen RNA desorpsiyon verimleri Çizelge 4.20'de verilmiştir.

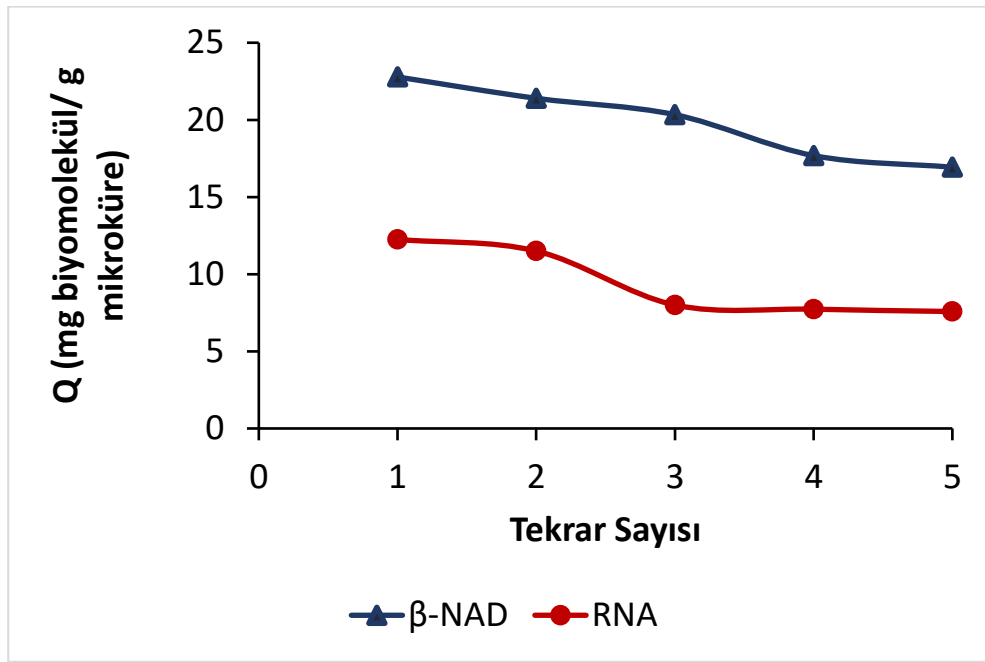
Çizelge 4.20. Kesikli sistemde $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda % desorpsiyon verimleri (RNA konsantrasyon: 2 mg/mL, 1 mL pH 10,2 borat desorpsiyon ortamı, 10 mg sorbent, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 1 saat, KD: Kantitatif Desorpsiyon, MSS < %4)

Desorpsiyon Verimi (%)	
Sorbent Konsantrasyonu (mg/mL)	$\text{MgSiO}_2\text{APBA}$
1	60,0
5	80,0
10	KD
20	KD
50	KD

β -NAD'a benzer şekilde $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile RNA için de 5 mg/mL'den yüksek sorbent konsantrasyonlarında kantitatif desorpsiyon verimleri elde edilmiştir. Manyetik sorbent konsantrasyonu değiştirilerek yapılan deneylere bakıldığında sorbent konsantrasyonu arttıkça denge adsorpsiyon değerinin her iki diol gruplu biyomolekül için azaldığı görülmektedir. Bu durum literatür ile uyumludur. Manyetik sorbent kullanılarak β -NAD ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarında RNA'ya kıyasla daha yüksek denge adsorpsiyon değerleri elde edilmiştir. Ancak SiO_2APBA mikroküreler ile $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelere kıyasla daha yüksek denge adsorpsiyon değerleri elde edilmiştir. $\text{MgSiO}_2\text{APBA}$ mikroküre konsantrasyonu 5 mg/mL'den yüksek olduğunda elde edilen kantitatif desorpsiyon verimleri manyetik mikrokürelerin önemli bir avantajıdır.

4.2.3.5. Tekrarlanabilirlik Davranışı

Tekrarlanabilirlik çalışmaları için β -NAD ve RNA biyomoleküllerinin HEPES adsorpsiyon tamponu içerisinde 2 mg/mL başlangıç konsantrasyonları ile çözeltileri hazırlanmıştır. Biyomoleküller $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile 2 saat boyunca adsorpsiyona bırakılmış desorpsiyon ise 1 mL pH 10,2 borat tamponu kullanılarak yapılmıştır. Adsorpsiyon desorpsiyon döngüsü aynı mikroküreler ile 5 defa tekrarlanmış ve β -NAD ve RNA için elde edilen denge adsorpsiyon grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Kesikli sistemde $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda β -NAD ve RNA denge adsorpsiyonunun tekrarlı deney sayısı ile değişimi (1 mL pH 8,5 adsorpsiyon ortamı, oda sıcaklığı 22 °C, 120 cpm, 2 saat, β -NAD konsantrasyonu: 2 mg/mL ve RNA konsantrasyonu: 2 mg/mL)

İki biyomolekül için de, manyetik özelliğe sahip fenilborik asit gruplu silika mikrokürelerin sorbent olarak kullanıldığı durumda tekrar sayısı ile denge adsorpsiyonu değerlerinde hafif bir düşme görülmektedir. 5. deney sonucunda β -NAD denge adsorpsiyonu değeri 22,78 mg/g'dan 16,93 mg/g'a kadar düşerken RNA denge

adsorpsiyonu değeri 12,25 mg/g'dan 7,58 mg/g'a düşmüştür. Her iki biyomolekül içinde tekrarlı izolasyonlarda gözlenen denge adsorpsiyon değeri düşüşünün kabul edilebilir düzeyde olduğu söylenebilir.

4.2.4. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA Mikroküreler için Adsorpsiyon İzotermi

RNA ve β -NAD için MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikroküreler kullanılarak yapılan adsorpsiyon çalışmalarından elde edilen veriler yardımıyla Langmuir ve Freundlich izotermi incelenmiştir. Adsorpsiyon izotermi analitlerin absorbanlar ile etkileşiminin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. İzotermi oluşturulurken adsorplanan biyomolekül derişimi dengeye ulaştığında elde edilen konsantrasyon (C_e) ile mikrokürelerin birim kütlesi tarafından adsorplanan biyomolekül miktarı (q_e) arasındaki ilişki kullanılmıştır. Biyomoleküllerin adsorpsiyonunda izotermiye uygunluk durumu korelasyon katsayısı (R^2) değerleri incelenerek araştırılmıştır.

Adsorbanın birim kütlesince adsorplanan miktar ile denge noktasında ortamda kalan adsorbat miktarı arasındaki ilişkiden yararlanarak β -NAD ve RNA için Freundlich ve Langmuir izotermi çıkarılmıştır. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi parametreleri grafikler yardımıyla hesaplanmıştır.

Langmuir izotermi hesaplamaları için denklemin lineerize edilmiş halinden yola çıkılarak $1/C_e$ 'ye karşı $1/Q_e$ grafiği çizilmiş ve grafik üzerinden Q_{max} ve b değerleri hesaplanmıştır. Freundlich izotermi parametreleri ise $\log q_e$ 'ye karşı $\log C_e$ grafiği çizilerek hesaplanmıştır. β -NAD ve RNA biyomolekülleri için elde edilen izoterm parametreleri Çizelge 4.21'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.21. MagSiO₂ ve MagSiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β -NAD ve RNA biyomolekülleri için elde edilen izoterm parametreleri

β-NAD Denge Adsorpsiyonu			
Freundlich İzoterm			
	k_F	1/n	R²
MagSiO ₂ APBA Mikroküreler	16,74	0,67	0,993
MagSiO ₂ Mikroküreler	7,40	1,08	0,927
Langmuir İzoterm			
	Q_{max}	b	R²
MagSiO ₂ APBA Mikroküreler	22,94	2,00	0,981
MagSiO ₂ Mikroküreler	20,62	0,58	0,986
RNA Denge Adsorpsiyonu			
Freundlich İzoterm			
	k_F	1/n	R²
MagSiO ₂ APBA Mikroküreler	8,56	0,72	0,996
MagSiO ₂ Mikroküreler	5,41	0,57	0,971
Langmuir İzoterm			
	Q_{max}	b	R²
MagSiO ₂ APBA Mikroküreler	16,50	1,06	0,996
MagSiO ₂ Mikroküreler	7,28	2,52	0,953

β -NAD izoterm çalışmaları incelendiğinde R² değerlerine bakılarak MagSiO₂APBA mikrokürelerin Freundlich izotermine uygun olduğu görülmektedir.

MagSiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β -NAD ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarının korelasyon değerlerine bakılarak Freundlich izotermi için daha uygun olduğu söylenebilir. 1/n değeri adsorpsiyonun şiddetini gösterirken n değeri 1,50 olarak hesaplanmıştır. Bu değer yükseldikçe adsorpsiyonun daha verimli olarak gerçekleşmesi beklenmektedir. n değerinin 1'den büyük olması adsorpsiyonun fiziksel olduğunu

göstermektedir. Fiziksel adsorpsiyonlar genellikle tersinir olup şartların değişimiyle desorpsiyon meydana gelmektedir. Kimyasal adsorpsiyonlar ise genelde kuvvetli bağ oluşumuna sebep olduklarından dolayı tersinmezdir. Freundlich izotermine uygunluk yüzeyin heterojen özelliğe sahip olabildiğini de göstermektedir. Langmuir izotermi için elde edilen parametrelere bakıldığında $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile $\beta\text{-NAD}$ için R^2 değerine 0,981 olarak ulaşılmıştır. [71, 76, 77].

RNA için $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikrokürelerle hem Freundlich hem de Langmuir izotermi parametrelerinde R^2 değeri 0,996 olarak bulunmuştur. Bu yüksek korelasyon değeri adsorpsiyonun iki modele de uygun olduğunu anlamına gelmektedir. Langmuir izotermi yüzeyin tek tabaka ile kaplı olduğuna ve adsorbent yüzeyinin homojen olduğunu gösterirken Freundlich izotermi aynı zamanda heterojen yüzey varlığına işaret eder. Adsorpsiyon şiddeti n değeri 1,39 olarak hesaplanmış olup fiziksel adsorpsiyonu gösterirken bu değer 1'den büyük olması etkin adsorpsiyona işaret etmektedir. Langmuir izoterminde b değeri ise adsorpsiyon enerjisidir ve bu değer arttıkça adsorpsiyonun arttığı anlaşılmaktadır [72, 76].

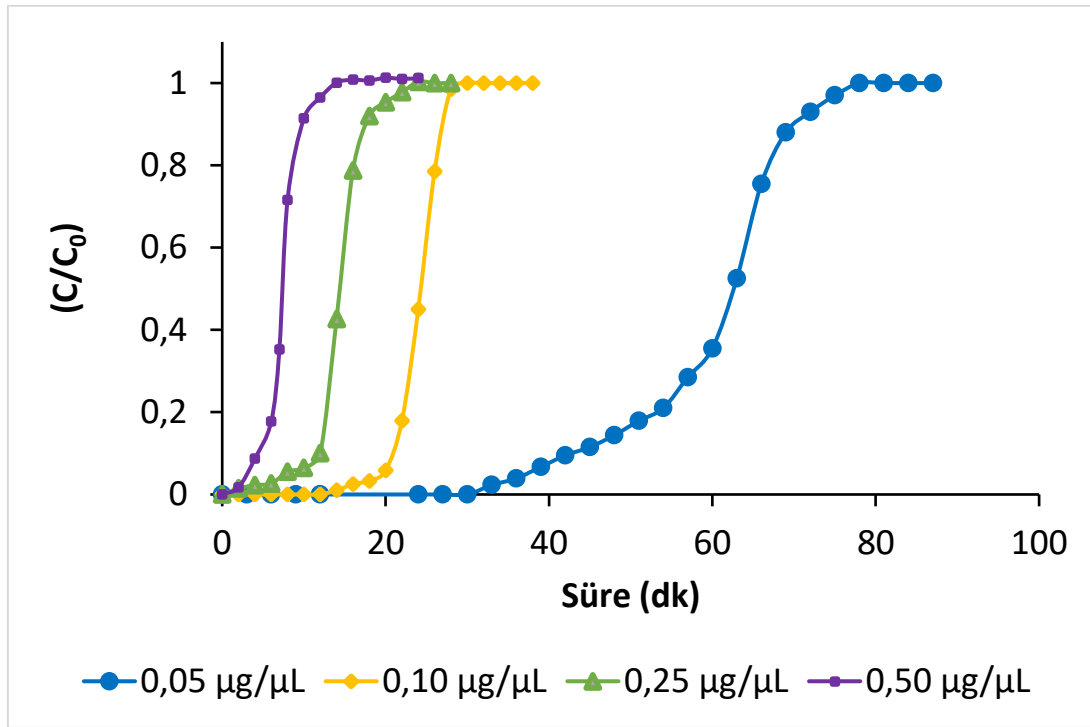
Biyoteknolojik sistemlerde en çok kullanılan Langmuir ve Freundlich izotermi çalışmadan elde edilen veriler ile oluşturulmuştur. Çalışma kapsamında incelenen bu sistemde adsorpsiyon borat esteri oluşumu ile gerçekleşmektedir ve bu durum geri dönüşlü bir kimyasal sistem olarak tanımlanabilir. Bu hibrit sistemin Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluğu yalnızca matematiksel uyumu gösterirken fiziksel uyum ifade etmemektedir.

4.2.5. SiO_2APBA Mikroküreler ile Sürekli Sistemde Biyomolekül İzolasyonu

Sürekli sistemde seçilen diol gruplu biyomoleküllerin dinamik adsorpsiyon-desorpsiyon davranışları, mikrokolon çıkış konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak izlenmesiyle incelenmiştir. Bu çalışma için 300 μm iç çapa sahip 50 mm uzunluğunda bir kolon hazırlanarak sabit faz olarak kullanılan SiO_2APBA mikroküreler ile doldurulmuştur. Diol

gruplu biyomoleküller farklı besleme konsantrasyonları ile mikrokolona gönderilmiş ve kolon çıkış konsantrasyonu zamana karşı tayin edilmiştir.

β -NAD için 0,05 - 0,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ besleme konsantrasyonu aralığında sürekli sistem deneyleri yapılmıştır. 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ β -NAD konsantrasyonu için 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$, diğer konsantrasyonlar için 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızı kullanılmıştır. Farklı besleme konsantrasyonları ile elde edilen kolon çıkış konsantrasyonu eğrileri Şekil 4.21’de verilmiştir.

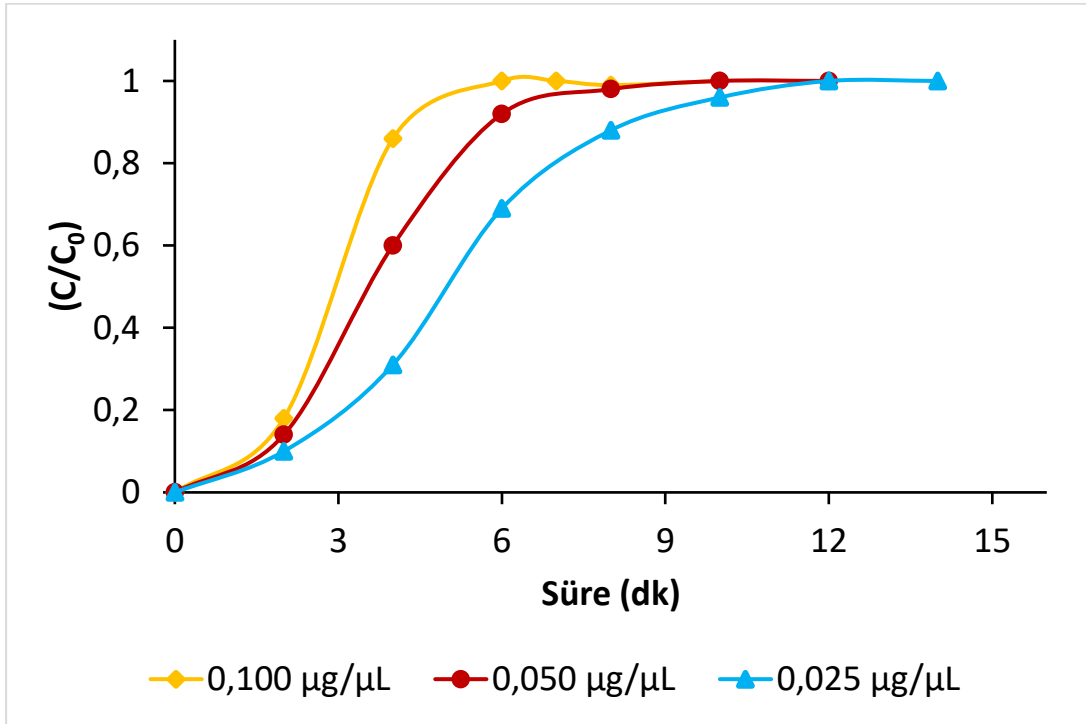


Şekil 4.21. Mikroakışkan borat afinite sisteminde SiO_2APBA mikrokürelerin sabit faz olarak kullanıldığı durumda mikrokolon çıkış konsantrasyonunun (C , $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) zaman ile değişimi. C_0 : β -NAD'ın besleme konsantrasyonu, Akış hızı: 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ için 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$), Kolon boyutları: 300 μm iç çap x 50 mm uzunluk, Mobil faz: 50 mM pH 8,5 HEPES, 50 mM MgCl_2 içeren tampon, 22 $^\circ\text{C}$ [69].

Biyomolekül besleme konsantrasyonu arttıkça plato noktasına ulaşma süresinin arttığı grafik üzerinde görülmektedir. Bu durum, kolonda bulunan sabit fazın hedef biyomolekül ile doygunluk adsorpsiyonuna ulaşmak için daha fazla süreye gerek duymasından

kaynaklanmaktadır. C/C_0 değeri 1 olan plato noktasına ulaştığında izleme işlemi sonlandırılmıştır. Bu işlem sonrası kolona adsorbe olmuş β -NAD biyomoleküllerinin geri kazanımı için desorpsiyon basamağı başlatılmış ve 200 mM sorbitol içeren 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu kolona beslenmiştir. Çizelge 4.22 β -NAD için elde edilen desorpsiyon verimlerini göstermektedir. SiO_2APBA mikroküreler sabit faz olarak kullanıldığı mikroakışkan sistemde 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ β -NAD besleme konsantrasyonu ile kantitatif desorpsiyon elde edildiği görülmektedir. Artan β -NAD besleme konsantrasyonu ile desorpsiyon veriminde azalma izlenmiştir.

RNA için SiO_2APBA mikroküreler ile mikroakışkan sistemde izolasyon 0,025-0,100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNA besleme konsantrasyonu aralığında yapılmıştır. Sabit akış hızı 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olarak ayarlanmış ve elde edilen kolon çıkış konsantrasyonu eğrileri Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Mikroakışkan borat afinite sisteminde SiO_2APBA mikrokürelerin sabit faz olarak kullanıldığı durumda mikrokolon çıkış konsantrasyonunun (C , $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) zaman ile değişimi. C_0 : RNA besleme konsantrasyonu, Akış hızı: 2 $\mu\text{L}/\text{dk}$, Kolon boyutları: 300 μm

iç çap x 50 mm uzunluğunda, Mobil faz: 50 mM pH 8,5 HEPES, 50 mM MgCl₂ içeren tampon, 22 °C [69].

SiO₂APBA mikrokürelerin sabit faz olarak kullanıldığı mikroakışkan sistemde elde edilen RNA çıkış konsantrasyonu eğrilerine bakıldığında, β-NAD için olduğu gibi artan besleme konsantrasyonu ile platoya erişim süresinin arttığı görülmektedir. Plato noktasına ulaşılması ile adsorpsiyon periyodu sonlandırılmış ve desorpsiyon için mikrokolona 100 mM sorbitol içeren 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu beslenmiştir. Çizelge 4.22 mikroakışkan sistemde SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak RNA için elde edilen desorpsiyon verimlerini göstermektedir. 3 farklı RNA besleme konsantrasyonu ile çalışılan koşullarda kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşıldığı görülmektedir. Farklı β-NAD ve RNA besleme konsantrasyonları için hesaplanan denge adsorpsiyon kapasitesi değerleri ve izolasyon verimleri de ayrıca Çizelge 4.22’de verilmektedir.

Çizelge 4.22. Sürekli mikroakış sisteminde SiO₂APBA mikroküreler kullanılarak β-NAD ve RNA için hesaplanan denge adsorpsiyon değerleri, desorpsiyon ve izolasyon verimleri [69].

β-NAD besleme konsantrasyonu (µg/µL)	Q (µg/g)	Desorpsiyon Verimi (%)	İzolasyon Verimi (%)
0,500	10220 ± 135	54	44
0,250	9000 ± 225	85	75
0,100	5243 ± 219	94	81
0,050	3550 ± 125	KD	92
RNA besleme konsantrasyonu (µg/µL)	Q (µg/g)	Desorpsiyon Verimi (%)	İzolasyon Verimi (%)
0,100	580 ± 180	KD	51
0,050	310 ± 80	KD	57
0,025	292 ± 106	KD	62

Çizelge 4.22 biyomolekül besleme konsantrasyonları artttıkça denge adsorpsiyon değerlerinin arttığını; izolasyon veriminin ise azaldığını göstermiştir. Bu durum kesikli sistemde de elde edilen davranış ile uyumludur. β -NAD için kantitatif desorpsiyon verimine ulaşılan tek besleme konsantrasyonu $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ iken RNA için tüm konsantrasyonlarda kantitatif desorpsiyon verimlerine ulaşılmıştır. Benzer besleme konsantrasyonlarında β -NAD ile daha yüksek adsorpsiyon kapasiteleri ve izolasyon verimleri elde edilmiştir. Bu durum β -NAD'ın fenilborik asitlere ve dolayısıyla sabit faz SiO_2APBA mikrokürelere yüksek afinitesi ile açıklanabilir.

Mikroakışkan sistemde elde edilen sonuçlar kesikli sistemde alınan sonuçlara benzer şekildedir. Benzer koşullarda β -NAD ile RNA'ya kıyasla daha yüksek adsorpsiyon elde edilmiştir. β -NAD'ın fenilborik asit grubu ve dolayısıyla sabit faz SiO_2APBA mikrokürelere yüksek afinitesi sürekli mikroakış sisteminde RNA'ya kıyasla daha yüksek izolasyon verimlerinin elde edilmesini sağlamıştır. Bu sonuçlar; SiO_2APBA mikrokürelere ile geliştirilen borat afinite mikroakış sisteminin uygun besleme konsantrasyonlarında diol gruplu biyomoleküllerin izolasyonunda tatmin edici izolasyon verimleri ile kullanılabileceğini göstermektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

- Tez kapsamında destek materyali olarak kullanılmak üzere monodispers gözenekli silika mikroküreler ile manyetik silika mikroküreler sentezlenmiştir. Bu mikrokürelerin hem mezogözenek hem de makrogözenek içermesi en önemli özelliklerindedir.
- Hidroksillenmiş silika mikrokürelere, hidroksil grupları ile trimetoksisil grupları arasındaki reaksiyon aracılığı ile GPTMS bağlanmıştır. APBA'nın amin grupları ile GPTMS'nin epoksipropil grupları arasındaki reaksiyon sonucu APBA, mikrokürelere kovalent olarak bağlanmıştır.
- Manyetik mikrokürelerde hidroksilleme yapılmadan, direkt GPTMS bağlanmış ve ardından APBA bağlanması yapılmıştır.
- XPS sonuçlarında iki çeşit mikrokürede de APBA bağlanması ile boron içeriği gözlemlenmiştir. Manyetik mikrokürelerde diğerlerinden farklı olarak demir varlığı görülmektedir.
- Mikrokürelere APBA bağlanması ile mikrokürelerin spesifik yüzey alanlarında düşüş görülmüştür, bu durumun bağlanma sırasında kullanılan bazik ortamın gözenek büyütücü etkisinden kaynaklanmakta olduğu düşünülmekte olup APBA bağlanmasını desteklemektedir.
- Adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları β -NAD ve RNA biyomolekülleri kullanılarak kesikli ve sürekli sistemde yapılmıştır, adsorpsiyon tamponu olarak pH 8,5 HEPES tamponu kullanılmıştır.
- İki çeşit mikrokürede de konsantrasyon taramalarında biyomolekül konsantrasyonu arttıkça adsorpsiyon kapasitesinin arttığı görülmüştür.

- İki çeşit mikrokürede de sorbent taramalarında sorbent derişimi arttıkça adsorpsiyon kapasitesi düşmektedir. Sorbent derişiminin artması ile birim sorbent kütlesi için biyomolekül kütlesi azaldığından, elde edilen grafikler beklentiye uygundur.
- Adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları β -NAD ve RNA biyomolekülleri kullanılarak kesikli ve sürekli sistemde yapılmıştır, desorpsiyon tamponu olarak pH 10,2 borat ve pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır.
- SiO_2APBA mikroküreler kullanılarak yapılan çalışmalarda, borat desorpsiyon tamponunun yarışmalı diol olarak sorbitol eklenmiş fosfat tamponu ile değiştirilmesi sonucunda kantitatif desorpsiyon verimleri elde edilmiştir.
- SiO_2APBA mikroküreler kullanılarak kantitatif desorpsiyon verimleri ile RNA ve β -NAD için maksimum denge adsorpsiyon değerleri sırasıyla 60 ve 159 mg biyomolekül/g sorbent olarak bulunmuştur.
- $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler kullanılarak kantitatif desorpsiyon oranıyla RNA ve β -NAD için maksimum denge adsorpsiyon değerleri sırasıyla 12,25 ve 22,78 mg biyomolekül/g sorbent olarak bulunmuştur.
- Tekrarlanabilirlik çalışmalarında adsorpsiyon kapasitelerinde önemsiz bir düşme görülmüştür. Gözlemlenen bu azalmalar ardışık adsorpsiyon desorpsiyon deneyleri sonucu, mikrokürelerden ayrılmayan biyomoleküller nedeniyle, mikroküreler üzerinde park alanlarının azalması ile açıklanabilir.
- MagSiO_2 ve $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile elde edilen adsorpsiyon dataları en önemli modellerden olan Langmuir ve Freundlich izotermlerine uyarlanmış, β -NAD için $\text{MagSiO}_2\text{APBA}$ mikroküreler ile yapılan çalışmaların matematiksel

olarak Freundlich izotermine daha uygun olduğu görülmüştür. RNA için MagSiO₂APBA mikroküreler ile yapılan çalışmalarda ayrıca Langmuir izotermine de uygunluk olduğu gözlenmiştir. Bu sistemde adsorpsiyon borat esteri oluşumu ile gerçekleşmektedir ve bu sistem geri dönüşlü bir kimyasal sistem olarak tanımlanabilir. Bu hibrit sistemin Langmuir ve Freundlich izotermine uygunluğu yalnızca matematiksel uyumu gösterirken fiziksel uyum ifade etmemektedir.

- Sonuç olarak; farklı biyomolekül ve sorbent konsantrasyonlarında alınan tatmin edici sonuçlara bakılarak sentezlenen sabit fazların düşük konsantrasyonlardaki cis-diol gruplarının düşük miktarlardaki örneklerden bile izole edilmesinde başarılı olması beklenmektedir.
- Tez kapsamında sentezlenen SiO₂APBA mikroküreler, kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon yoluyla memeli (HEK 293) ve bakteri (E. Coli, BL21) hücrelerinden RNA izolasyonu için kullanılmıştır. Tez kapsamı dışında olan bu izolasyon çalışması ile, her iki hücre türünden elde edilen memeli ve bakteri RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi, her iki hücre türü için de RNA'nın yüksek saflıkta ve yapısal bütünlüğü korunarak, izole edilebildiğini göstermiştir [69]. Elde edilen sonuç, tez kapsamında üretilen borat afinite sorbentinin, gerçek örneklerde, memeli ve bakteri hücrelerinden RNA izolasyonu için başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. Wilson, I.D., et al., *Encyclopedia of separation science*. Encyclopedia of Separation Science. 2000: Academic.
2. Magdeldin, S. and A. Moser, *Affinity Chromatography: Principles and Applications*. 2012.
3. Elmas, B., S. Senel, and A. Tuncel, *A new thermosensitive fluorescent probe for diol sensing: Poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylphenylboronic acid)-alizarin red S complex*. *Reactive & Functional Polymers*, 2007. **67**(2): p. 87-96.
4. Zhang, L., C. Wang, and Y. Wei, *Boronate affinity adsorption of cis-diol-containing biomolecules in nonaqueous solvent*. *Biomedical Chromatography*, 2015: p. n/a-n/a.
5. Okutucu, B., et al., *Boronate affinity nanoparticles for nucleoside separation*. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2016. **44**(1): p. 322-327.
6. Toprak, A., et al., *Boronate affinity nanoparticles for RNA isolation*. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2015. **50**: p. 251-256.
7. Bailon, P., et al., *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*. *Methods in molecular biology*. 2000: Humana Press.
8. Pumera, M., et al., *A mechanism of adsorption of beta-nicotinamide adenine dinucleotide on graphene sheets: experiment and theory*. *Chemistry*, 2009. **15**(41): p. 10851-6.
9. Vitha, M.F., *Chromatography: Principles and Instrumentation*. *Chemical Analysis: a Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its A Series*. 2017: Wiley.
10. Aires-Barros, M.R. and A.M. Azevedo, *7 - Fundamentals of Biological Separation Processes*, in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, A. Pandey and J.A.C. Teixeira, Editors. 2017, Elsevier. p. 187-237.

11. Acikara, O.z.B., et al., *Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery*, in *Column Chromatography*, D.F. Martin and B.B. Martin, Editors. 2013, InTech: Rijeka. p. Ch. 03.
12. Tan, S.C. and B.C. Yiap, *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 574398.
13. Hegyi G., K.J., Kovács M, Málnási-Csizmadia A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A. i Venekei I., *Introduction to Practical Biochemistry*. 2013, Eötvös Loránd University.
14. Mahn, A., *Hydrophobic Interaction Chromatography: Fundamentals and Applications in Biomedical Engineering*. 2012.
15. Tomaz, C.T. and J.A. Queiroz, *Chapter 6 - Hydrophobic Interaction Chromatography*, in *Liquid Chromatography*, S. Fanali, et al., Editors. 2013, Elsevier: Amsterdam. p. 121-141.
16. Cazes, J., *Encyclopedia of Chromatography*. Dekker Encyclopedias Series. 2005: Taylor & Francis.
17. Weith, H.L., J.L. Wiebers, and P.T. Gilham, *Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components*. Biochemistry, 1970. **9**(22): p. 4396-4401.
18. Duval, F., *New applications of the interaction between diols and boronic acids*. 2015, Wageningen University.
19. Muhammad, P., D. Li, and Z. Liu, *Boronate Affinity Chromatography*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers, Editor. 2015, John Wiley and Sons, Inc. p. 1-18.
20. Li, D. and Z. Liu, *Chapter 11 Boronate Affinity Materials for the Selective Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules*, in *Boron: Sensing, Synthesis and Supramolecular Self-Assembly*. 2016, The Royal Society of Chemistry. p. 302-360.
21. Bourne, E.J., E.M. Lees, and H. Weigel, *Paper chromatography of carbohydrates and related compounds in the presence of benzenboronic acid*. Journal of Chromatography A, 1963. **11**: p. 253-257.

22. Glad, M., et al., *High-performance liquid affinity chromatography of nucleosides, nucleotides and carbohydrates with boronic acid-substituted microparticulate silica*. Journal of Chromatography A, 1980. **200**: p. 254-260.
23. Bisse, E. and H. Wieland, *Coupling of m-aminophenylboronic acid to s-triazine-activated Sephacryl: use in the affinity chromatography of glycosylated hemoglobins*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1992. **575**(2): p. 223-228.
24. Özdemir, N., A. Çakır, and B. Somtürk, *Boronic acid functionalized polymeric microspheres for catecholamine isolation*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **445**(0): p. 40-47.
25. Brooks, W.L.A. and B.S. Sumerlin, *Synthesis and Applications of Boronic Acid-Containing Polymers: From Materials to Medicine*. Chemical Reviews, 2016. **116**(3): p. 1375-1397.
26. Matsumoto, A., et al., *Glucose-Responsive Polymer Bearing a Novel Phenylborate Derivative as a Glucose-Sensing Moiety Operating at Physiological pH Conditions*. Biomacromolecules, 2003. **4**(5): p. 1410-1416.
27. Kataoka, K., et al., *Totally Synthetic Polymer Gels Responding to External Glucose Concentration: Their Preparation and Application to On-Off Regulation of Insulin Release*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(48): p. 12694-12695.
28. Moffatt, S., et al., *Successful in vivo tumor targeting of prostate-specific membrane antigen with a highly efficient J591/PEI/DNA molecular conjugate*. Gene Therapy, 2006. **13**(9): p. 761-772.
29. Moffatt, S., S. Wiehle, and R.J. Cristiano, *Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting aminopeptidase N/CD13*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(1): p. 57-67.
30. Springer, A.L., et al., *Salicylhydroxamic acid functionalized affinity membranes for specific immobilization of proteins and oligonucleotides*. J Biomol Tech, 2003. **14**(3): p. 183-90.
31. Stolowitz, M.L., et al., *Phenylboronic acid-salicylhydroxamic acid bioconjugates. I. A novel boronic acid complex for protein immobilization*. Bioconjug Chem, 2001. **12**(2): p. 229-39.

32. Gao, L., et al., *Fabrication of a dendrimer-modified boronate affinity material for online selective enrichment of cis-diol-containing compounds and its application in determination of nucleosides in urine*. RSC Advances, 2015. **5**(128): p. 106161-106170.
33. Ma, J., C.Z. Wang, and Y.M. Wei, *Polyethyleneimine-facilitated high-capacity boronate affinity membrane and its application for the adsorption and enrichment of cis-diol-containing molecules*. Rsc Advances, 2016. **6**(49): p. 43648-43655.
34. Dhadge, V.L., et al., *Boronic acid-modified magnetic materials for antibody purification*. J R Soc Interface, 2014. **11**(91): p. 20130875.
35. Du, J., et al., *Facile preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles with a high capacity and their use in the enrichment of cis-diol-containing compounds from plasma*. Biomedical Chromatography, 2014. **29**(2): p. 312-320.
36. Zhang, X., et al., *Tailor-Made Boronic Acid Functionalized Magnetic Nanoparticles with a Tunable Polymer Shell-Assisted for the Selective Enrichment of Glycoproteins/Glycopeptides*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015. **7**(44): p. 24576-24584.
37. Kook, J.K., et al., *Facile synthesis of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for efficient dopamine extraction*. Nano Converg, 2019. **6**(1): p. 30.
38. Li, D., Y. Chen, and Z. Liu, *Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications*. Chem Soc Rev, 2015. **44**(22): p. 8097-123.
39. Arshady, R., *Preparation of polymer nano- and microspheres by vinyl polymerization techniques*. J Microencapsul, 1988. **5**(2): p. 101-14.
40. Nicholson, J.W. and Royal Society of Chemistry (Great Britain), *The chemistry of polymers*. 3rd ed. 2006, Cambridge, UK: RSC Pub. xi, 177 p.
41. Kip, F.C.i., *Poli (Akrilat) Bazlı Reaktif Sabit Fazların Geliştirilmesi Ve Mikro-Sıvı Kromatografisi Sisteminde Kromatografik Performanslarının Tanımlanması in Kimya Mühendisliği*. 2015, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
42. Gokmen, M.T. and F.E. Du Prez, *Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(3): p. 365-405.

43. Kawaguchi, S. and K. Ito, *Dispersion Polymerization*, in *Polymer Particles: -/-*, M. Okubo, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 299-328.
44. Özkul, Ö., *Reaktif Formda, Hidrofobik Monodispers - Gözenekli Partiküllerin Sentezi ve Boronat Afinite Kromatografisi İçin Destek Malzemesi Olarak Kullanımı*. 2011, Hacettepe Üniversitesi.
45. Usta, D.D., *Afinite Kromatografisiyle Desteklenmiş Sers Tabanlı Biyosensörler Aracılığıyla Diol Gruplu Biyomolekül Tayini*, in *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. 2016, Gazi Üniversitesi: Ankara.
46. Xia, Y., et al., *Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications*. *Advanced Materials*, 2000. **12**(10): p. 693-713.
47. Iler, R.K., *The chemistry of silica : solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*. 1979, New York: Wiley. xxiv, 866 p.
48. LaMer, V.K. and R.H. Dinegar, *Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols*. *Journal of the American Chemical Society*, 1950. **72**(11): p. 4847-4854.
49. Stöber, W., A. Fink, and E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968. **26**(1): p. 62-69.
50. Wen, J. and G.L. Wilkes, *Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach*. *Chemistry of Materials*, 1996. **8**(8): p. 1667-1681.
51. Kaiser, C., et al., *Nonporous Silica Microspheres in the Micron and Submicron Size Range*, in *Fine Particles Science and Technology: From Micro to Nanoparticles*, E. Pelizzetti, Editor. 1996, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 71-84.
52. Cong, H., et al., *Synthesis of monodisperse silica microspheres and modification with diazoresin for mixed-mode ultra high performance liquid chromatography separations*. *J Sep Sci*, 2017. **40**(22): p. 4320-4328.
53. Lei, X., et al., *Synthesis of Monodisperse Silica Microspheres by a Modified Stöber Method*. *Integrated Ferroelectrics*, 2014. **154**(1): p. 142-146.

54. Knopp, D., D. Tang, and R. Niessner, *Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **647**(1): p. 14-30.
55. Zhang, Z., et al., *Synthesis of Novel Porous Magnetic Silica Microspheres as Adsorbents for Isolation of Genomic DNA*. *Biotechnology Progress*, 2006. **22**(2): p. 514-518.
56. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 2012, Basingstoke: W.H. Freeman.
57. Shabarova, Z. and A. Bogdanov, *Advanced organic chemistry of nucleic acids*. 1994, Weinheim ; New York: VCH. xv, 588.
58. Gjerde, D.T., L. Hoang, and D. Hornby, *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*. Wiley online library. 2009: Wiley.
59. Fordyce, S.L., et al., *Long-term RNA persistence in postmortem contexts*. *Investig Genet*, 2013. **4**(1): p. 7.
60. Gates, A. and R. Bowater, *Nucleotides: Structure and Properties*. 2015.
61. Grahnert, A., et al., *Review: NAD⁺: a modulator of immune functions*. *Innate Immun*, 2011. **17**(2): p. 212-33.
62. Brunnbauer, P., et al., *The nanomolar sensing of nicotinamide adenine dinucleotide in human plasma using a cycling assay in albumin modified simulated body fluids*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 16110.
63. Liu, X.-C., *Boronic Acids as Ligands for Affinity Chromatography*. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006. **24**(1): p. 73-80.
64. Günal, G., et al., *Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica- and polymer-based stationary phases*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **74**: p. 10-20.
65. Gunal, G., et al., *Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018. **46**(1): p. 178-184.

66. Elmas, B., et al., *Synthesis of uniform, fluorescent poly(glycidyl methacrylate) based particles and their characterization by confocal laser scanning microscopy*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2005. **269**(1): p. 125-134.
67. Salimi, K., et al., *Ti(IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂ microspheres with stable magnetic properties for highly selective enrichment of phosphopeptides*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017. **153**: p. 280-290.
68. Salimi, K., et al., *Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres*. RSC Advances, 2017. **7**(14): p. 8718-8726.
69. Kip, C., et al., *Isolation of RNA and beta-NAD by phenylboronic acid functionalized, monodisperse-porous silica microspheres as sorbent in batch and microfluidic boronate affinity systems*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019. **174**: p. 333-342.
70. Gündoğdu, Y., *Manyetik ve Optik Özelliklere Sahip Nanopartikül Sentezi ve Analitik Uygulamaları*, in *Analitik Kimya Anabilim Dalı*. 2009, Gazi Üniversitesi: ANKARA.
71. Şahan, A., *Farmosetik Maddelerin Aktif Çamur Arıtma Prosesinde Abiyotik Gideriminin İncelenmesi* in *Çevre Mühendisliği A.B.D.* 2007, Çukurova Üniversitesi: ADANA.
72. Karaman, İ., *Soma Linyitinin Fiziksel Aktivasyonu Ve Aktiflenmiş Ürüne Boyarmadde Adsorpsiyonu*, in *Kimya Mühendisliği A.B.D.* 2010, Ankara Üniversitesi: ANKARA.
73. Ayawei, N., A.N. Ebelegi, and D. Wankasi, *Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms*. Journal of Chemistry, 2017. **2017**: p. 3039817.
74. Köse, K., *Nükleik Asit Bazları İçeren Kriyojellerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Biyokromatografide Adsorbent Olarak Kullanımı* in *Kimya Anabilim Dalı*. 2014, Hacettepe Üniversitesi: ANKARA.
75. Nethaji, S., A. Sivasamy, and A.B. Mandal, *Adsorption isotherms, kinetics and mechanism for the adsorption of cationic and anionic dyes onto carbonaceous particles prepared from Juglans regia shell biomass*. International Journal of Environmental Science and Technology, 2013. **10**(2): p. 231-242.

76. Koçer, O., *Zeytin Posası (Pirina) Üzerine Malaşit Yeşili'nin Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu* in *Kimya Anabilim Dalı*. 2013, Kilis 7 Aralık Üniversitesi: KİLİS.
77. Desta, M.B., *Batch Sorption Experiments: Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the Adsorption of Textile Metal Ions onto Teff Straw (Eragrostis tef) Agricultural Waste*. *Journal of Thermodynamics*, 2013. **2013**: p. 375830.

EKLER

EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Çiğdem Kip, Hilal Gülüşür, Eda Çelik, Duygu Deniz Usta, Ali Tuncel, Isolation of RNA and beta-NAD by phenylboronic acid functionalized, monodisperse-porous silica microspheres as sorbent in batch and microfluidic boronate affinity systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. 174: p. 333-342.