

**NÜKLEOZİDLERİN ZWİTTERİYONİK MONOLİTİK
KOLONLAR İLE KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFİ
SİSTEMİNDE AYRIMI**

**SEPARATION OF NUCLEOSIDES BY ZWITTERIONIC
MONOLITHIC COLUMNS IN CAPILLARY
ELECTROCHROMATOGRAPHY SYSTEMS**

SİSEM EKTİRİCİ

PROF. DR ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2019

SİSEM EKTİRİCİ'nin hazırladığı "Nükleozidlerin Zwitteriyonik Monolitik Kolonlarla Kapiler Elektrokromatografi Sisteminde Ayrımı" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Başkan




Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Danışman



Doç. Dr. Deniz Türkmen
Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Neslihan İDİL
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak .. / .. /.. tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Annem Filiz Tek'e

ETİK

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

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

beyan ederim.

18/06/2019

SİSEM EKTİRİCİ



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

.18... / 06... / 2019

(İmza)

SİSEM EKTİRİCİ



ÖZET

NÜKLEOZİDLERİN ZWİTTERİYONİK MONOLİTİK KOLONLAR İLE KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFİ SİSTEMİNDE AYRIMI

Sisem EKTİRİCİ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Eş Danışman: Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Haziran 2019, 81 sayfa

Boronik asitler, nükleozid ve glikoproteinler gibi cis-diol gruplarını içeren bileşiklerin seçici tanınması ve zenginleştirilmesi için kullanılan önemli ligandlardır. Bu özellik boronik asitleri moleküler tanıma, proteomik ve metabolomik çalışmalarında kullanılmak üzere mükemmel ligandlar yapmaktadır. Boronat afinite kovalent bağlanma esasına dayalı olduğu için nonspesifik etkileşimleri baskılayarak yüksek spesifite sağlamaktadır. Hidrofobik etkileşim boronat afinitenin seçiciliğini etkileyen en önemli ikincil etkileşimlerden birisidir. Afinite materyalleri olarak kullanılan boronik asit ligandları genellikle aromatik boronik asitlerdir ki bunlar proteinlerin nonspesifik adsorpsiyonunu sebep olan π - π etkileşimlerine sebep olurlar.

Monolitik silika kolonlar, yüksek kolon etkinliği, hidrofilitesi, yüksek geçirgenliği ve yüksek yüzey alanı gibi üstün avantajları sebebi ile proteomik ve metabolomik çalışmalarında oldukça fazla uygulama alanı bulmuştur. Bununla birlikte organik monolitik kolonlarla kıyaslandığında hazırlama prosesi oldukça zor ve post-

modifikasyonları zaman alıcıdır. Alternatif olarak, organik-silika hibrit monolitik kolonlar daha az büzülme, mekanik kararlılık, pH kararlılığı gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu çalışmada nükleozitlerin spesifik izolasyonuna yönelik organik-silika hibrit monolitik kolonlar sentezlendi. Temel prensip, boronik asitler ile cis-diol grupları arasındaki alkali/asidik koşullar altındaki tersinir kovalent kompleks oluşum/ayrılma mekanizmasına dayanmaktadır. Boronat afinite kromatografi (BAC) kovalent bağlanma temeline dayandığı için spesifik olmayan etkileşimler uygun koşullar seçildiğinde baskılanır ve yüksek spesifisiklik elde edilir. Ribozillenmiş metabolitler, özellikle modifiye nükleozidler kanser biyoişaretleyici olarak kullanılmaktadır. Boronat adsorbentler, nükleozidleri kompleks matris ortamlarından ekstrakte etmek için kullanılabilecek umut verici malzemelerdir. Bununla birlikte, düşük miktarlarda bulunan metabolitlerin zenginleştirilmesi mevcut boronat adsorbentlerin sınırlı kapasiteleri ve düşük seçicilikleri nedeni ile halen sorun teşkil etmektedir. Bu amaçla hibrit inorganik-organik metakril polihedral oligomerik silseskuiokzan- metakriloil histidin- fenil boronik asit ([POSS-MAH-PBA]) bazlı BAC adsorbentler, [POSS-MAH] monolitik kolonların önce sentezlenmesi ve PBA ile modifiye edilmesi ile elde edildi. Metakriloil histidin (MAH) monomeri, fenil boronik asidin (PBA) bağlanması için oldukça fazla sayıda bağlanma bölgeleri sağladığından adsorpsiyon kapasitesinin benzer monolitik kolonlara göre arttığı tespit edilmiştir. MAH monomeri hem hidrofilitiyi artırarak spesifik tanımayaya yol açmış, hemde mobil fazda organik çözücü kullanılmasını engellemiştir. Sentezlenen hibrit [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlar, şişme testi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR), elemental analiz, taramalı elektron mikroskopu (SEM), bilgisayarlı mikrotomografi (micro-CT) ve Brunauer–Emmett–Teller analizi (BET) ile karakterize edilmiştir.

[POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonların yüzey alanı analizi ile tespit edilen yüzey alanları sırası ile 110.79 ve 507.60 m²/g olarak ölçülmüştür. PBA ile fonksiyonlandırıldıktan sonra, geniş yüzey alanına sahip olan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonu, adenzin nükleozid için yüksek bir bağlanma kapasitesi (13.38 mg/g) göstermiştir.

Sentezlenmiş olan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun, adenozin nükleozid molekülünün adsorplama kapasitesine pH, derişim, sıcaklık, iyonik şiddet, akış hızı ve etkileşim süresi gibi farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. pH 8.0, 0.1 mg/ml adenozin derişimi, 0.01 mg/ml NaCl tuz derişimi, 0.5 ml/dak akış hızı ve 60 dakika etkileşim süresi optimum değerler olarak tespit edilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi olarak 25 mM formik asit ve metanol çözeltisi karışımı (1:1, v/v) kullanılmıştır.

[POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren moleküllere afinitesinin PBA fonksiyonel grubundan kaynaklandığını göstermek için, PBA içermeyen [POSS-MAH] monolitik kolon sentezlenerek adenozin bağlama kapasitesi incelenmiş ve 1.89 mg/g olarak bulunmuştur.

[POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adenozin molekülünü adsorpsiyon davranışı Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar incelendiğinde adenozin molekülünün tek tabakalı olarak bağlanma bölgelerine eşit bir şekilde bağlandığı tespit edilmiştir.

Tekrar kullanılabilirlik testlerinde, adsorpsiyon kapasitesindeki azalma, arka arkaya 5 tekrarlı adsorpsiyondan sonra sadece %1.6 olarak tespit edilmiştir.

[POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren nükleozidlere seçici afinitesi, deoksiadenozin trifosfat (dATP) molekülünü içeren örneğin incelenmesiyle gösterildi.

İdrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi önce adenozin (0.25 mg/ml) ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi. Adsorbe olan adenozin molekülünün tespit edilen miktarı kalabalık etkisi yapan iyonların yarışmacı özelliğinden dolayı 10.05 mg/g olarak tespit edilmiştir. Adsorbe olan adenozin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile doğrulanmıştır.

Hazırlanan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren bileşiklere grup spesifik afinitesini göstermek için, yine aynı şekilde yapay idrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitleri incelendi. Bunun için, yapay idrar çözeltisi nükleozidler

(0.25 mg/ml) ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi ve desorbe edilen nükleozidler HPLC yöntemi ile tayin edildi ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun nükleozidler adsorplama özelliği gösterilmiş oldu.

Son olarak hassasiyeti artırmak için, aynı oranlarda hazırlanmış olan kapiler [POSS-MAH-PBA] monolitik kapiler kolonu ile elektrokromatografik analizler gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Boronat Afinite Kromatografisi, Nükleozidler, POSS, Monolitik Kapiler Kolon, Metakriloil Histidin.

ABSTRACT

SEPARATION OF NUCLEOSIDES BY ZWITTERIONIC MONOLITHIC COLUMNS IN CAPILLARY CHROMATOGRAPHY SYSTEMS

Sisem EKTİRİCİ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Fatma Yılmaz

June 2019, 81 pages

Boronic acids are important ligands for selective recognition and enrichment of compounds containing cis-diol groups such as nucleosides and glycoproteins. This feature makes boronic acids excellent ligands for use in molecular recognition, proteomics and metabolomics studies. Since boronate affinity is based on covalent binding, it provides high specificity by suppressing nonspecific interaction. The hydrophobic interaction is one of the most important secondary interactions affecting the selectivity of boronate affinity. Boronic acid ligands used as affinity materials are generally aromatic boronic acids and cause π - π interactions which leads to nonspecific adsorption of proteins.

Monolithic silica columns have found high application in proteomics and metabolomics studies due to their superior advantages such as high column efficiency, hydrophilicity, high permeability and high surface areas. However, the preparation process is very difficult and post-modifications are time consuming

compared to organic monolithic columns. The hybrid organic silica monolithic columns used in the thesis have significant advantages such as less shrinkage, more stable mechanical and pH stability as an alternative. In this study, organic-silica hybrid monolithic columns were synthesized for specific isolation of nucleosides.

The basis of the mechanism is the reversible covalent complex formation between boronic acids and cis-diol groups which vary depending on the alkali/acidic conditions.

Since boronic acid chromatography (BAC) is based on covalent binding, nonspecific interactions are suppressed when appropriate conditions are selected and high specificity is obtained. Ribozylated metabolites, particularly modified nucleosides, are used as cancer biomarkers. Boronate adsorbents are promising materials that can be used to extract nucleosides from complex matrix media. Despite that due to the limited capacity and low selectivity of boronate affinity materials, the determination of metabolites in low amounts is still a problem. For this aim, before modification by phenyl boronic acid (PBA), methacryl polyhedral oligomeric silsesquioxane- methacryloyl histidine ([POSS-MAH]) monolithic column was synthesized to form methacryl polyhedral oligomeric silsesquioxane- methacryloyl histidine-phenyl boronic acid ([POSS-MAH-PBA]) based BAC adsorbents. PBA, which is bound to [POSS-MAH] monolithic column with its numerous binding sites introduced by methacryloyl histidine (MAH) monomer, has a higher adsorption capacity in the column compared to other materials used for this purpose.

The synthesized hybrid [POSS-MAH] and [POSS-MAH-PBA] monolithic columns were characterized by swelling test, fourier transform infrared spectrometry (FTIR), elemental analysis, scanning electron microscope (SEM), micro computed tomography (Micro-CT) and BET. The surface areas of the [POSS-MAH] and [POSS-MAH-PBA] monolithic columns determined by Brunauer–Emmett–Teller (BET) analysis were 110.79 and 507.60 m²/g, respectively. After functionalization with PBA, the [POSS-MAH-PBA] monolithic column with a large surface area showed a high binding capacity (13.38 mg/g) for adenosine nucleoside.

The effect of different parameters such as pH, concentration, temperature, ionic strength, flow rate and interaction time on the adenosine nucleoside adsorption capacity of the prepared [POSS-MAH-PBA] monolithic column was investigated. pH 8.0, adenosine concentration of 0.1 mg/ml, NaCl salt concentration of 0.01 mg/ml, the flow rate of 0.5 ml/min and the interaction time of 60 min were determined as maximum values for adenosine adsorption. A mixture of 25 mM formic acid and methanol solution (1: 1, v/v) was used as the desorption solution.

In order to show that the affinity of [POSS-MAH-PBA] monolithic column to cis-diol-containing molecules is due to PBA functional group, [POSS-MAH] monolithic column was prepared and the binding capacity of adenosine molecule was examined and estimated to be 1.89 mg/g.

Adenosine nucleoside adsorption behavior of [POSS-MAH-PBA] monolithic column was investigated by applying Langmuir and Freundlich adsorption models. Experimental results showed that adenosine molecule was bound to the binding sites as a monolayered and equally.

In reusability tests, the decrease in adsorption capacity was only 1.6% after 5 consecutive repeated adsorption. The selective affinity of the [POSS-MAH-PBA] monolithic column to cis-diol-containing nucleosides was demonstrated by examining the sample containing the deoxyadenosine triphosphate (dATP) molecule.

In addition, to examine the nucleoside metabolites passed to the urine solution, the artificial urine solution was first spiked with adenosine (0.25 mg/ml) and adsorbed to the [POSS-MAH-PBA] monolithic column. The amount of adsorbed adenosine molecule was determined to be 10.05 mg/g due to the both ions that make up crowd effect and the competing molecules. Adsorbed adenosine was confirmed by HPLC.

To demonstrate the group specific affinity of the prepared [POSS-MAH-PBA] monolithic column to the cis-diol containing compounds, in the same way, the

nucleoside metabolites passed to the artificial urine solution was examined. For that, the artificial urine solution was spiked with nucleosides (0.25 mg/ml) and adsorbed to the [POSS-MAH-PBA] monolithic column and the desorbed nucleosides were determined by HPLC method. The [POSS-MAH-PBA] monolithic column's ability to adsorb nucleosides was demonstrated.

Finally, in order to increase the sensitivity, electrochromatographic analyses were performed with the capillary [POSS-MAH-PBA] monolithic capillary column prepared in the same proportions.

Keywords: Boronate Affinity Chromatography, Nucleosides, POSS, Methacryloyl Histidine.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bütün bilgi birikimiyle hem bilimsel hem de manevi anlamda hep yanımda olan, bana bütün imkanları sağlayan, destek ve güç veren, bir hoca ve danışmandan çok ailemden birisi gibi davranan sevgili hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye

İnsan olmanın değerlerini, bilimin insana ve insanlığa katılabileceği bütün olguları, mücadele ruhunu kısacası sahip olduğum her şeyi bana katan, hayatımda hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, attığım ilk adımdan başlamak üzere diğer bütün adımlarımda yanımda olan, sadece annem olarak değil bir insan olarak da çok büyük saygı duyduğum biricik annem Filiz Tek'e ve bana destek olan, insanlığına ve vicdanına hayranlık duyduğum, hayatı yanyana öğrendiğim güzel ablam Ezgi Ektirici Altun'a

Her zaman yanımda olan, kendime bir rol model olarak aldığım, çıktığım yolda bana yol gösteren, güzel gülümsemesiyle aklımdaki bütün karanlıkları bir anda aydınlığa dönüştüren canım hocam Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a

Lisans dönemimden beri sürekli yanımda olan, bana destek veren, yol gösteren amiyane tabirle bütün kahrımı sıkıntımı bir kez bile bıkmadan dinleyen, sevgili hocam Dr. Ali Derazshamshir'e,

Tezime verdikleri katkılarından dolayı sevgili hocalarım Prof. Dr. Handan Yavuz, Doç Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Deniz Türkmen'e

Herhangi bir şeye ihtiyacım olduğu anda bana bir kez bile bıkmadan yardımcı olan sevgili Ilgım Göktürk, Yeşeren Saylan, Semra Akgönüllü, Monireh Bakhshpour, Sevgi Aslıyüce ve diğer Bioreg üyesi hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nükleozidler	5
2.2. Polimerler.....	7
2.2.1. Başlatıcılar	7
2.2.2. Çapraz Bağlayıcılar	8
2.2.3. Polimerizasyon Yöntemleri.....	8
2.3. Monolitler	10
2.3.1. Monolitlerin Hazırlanışı.....	11
2.4. Polihedral Oligomerik Silseskuiookzan Bazlı Polimerler	11
2.5. Afinite Kromatografisi.....	13
2.5.1. Afinite Kromatografisinin Genel Prensipleri	14
2.6. Boronat Afinite Kromatografisi	16
2.7. Kapiler Elektrokromatografi.....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	21
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	21
3.2. Kullanılan Cihazlar	21
3.3. Deneysel Yöntem	21
3.3.1. [POSS-MAH] Kolonların Hazırlanışı	21
3.3.2. [POSS-MAH-PBA] Kolonların Hazırlanışı.....	22
3.3.3. [POSS-MAH] Monolitik Kapiler Elektrokromatografi Kolonların Hazırlanışı	23

3.3.4. [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kapiler Elektrokromatografi Kolonlarının Hazırlanışı	23
3.4. Adsorpsiyon Çalışmaları	23
3.5. Seçicilik Çalışmaları	24
3.6. Yapay İdrardan Nükleozid Tayini	25
3.7. Kapiler Elektrokromatografi Çalışmaları	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	29
4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolon Karakterizasyonu	29
4.1.1. Şişme Testi Sonuçları	29
4.1.2. FTIR Sonuçları	31
4.1.3. Elemental Analiz Analiz Sonuçları	32
4.1.4. SEM Sonuçları	32
4.1.5. Micro-CT Sonuçları	36
4.1.6. Yüzey Alanı Analizi Sonuçları	36
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları	37
4.2.1. pH'ın [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	37
4.2.2. Akış Hızının [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	39
4.2.3. Başlangıç Derişiminin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	40
4.2.4. Sıcaklığın [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	41
4.2.5. İyonik Şiddetin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	43
4.2.6. Etkileşim Süresinin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	44
4.3. Adsorpsiyon Modelleri	44
4.4. Kinetik Çalışmalar	48
4.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi	51
4.6. Seçicilik Çalışmaları	52
4.7. Yapay İdrardan Nükleozid Tayini	54

4.8. Kapiler Elektrokromatografi Çalışmaları.....	58
4.8.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] ile Nükleozid Tayini	58
4.9. Literatür Çalışmaları.....	63
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR.....	71
EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nükleozidlerin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.2. AIBN molekülünün sıcaklık altında parçalanma reaksiyonu	7
Şekil 2.3. POSS molekülünün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.4. POSS molekülüne R grubu bağlanmış hali, R: Metakril.....	13
Şekil 2.5. Afinite Kromatografisinin çalışma prensibi	15
Şekil 2.6. Boronik Asitler ve Cis-Diol içeren bileşiklerin kimyasal etkileşimleri.....	18
Şekil 4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara ait su tutma davranışı a) şişme yüzdesi b) şişme kinetiği.....	30
Şekil 4.2. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik kolonlarının FTIR sonuçları....	31
Şekil 4.3. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlarına ait SEM görüntüleri.....	33
Şekil 4.4. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kapiler kolonlara ait SEM görüntüleri.....	35
Şekil 4.5. [POSS-MAH] (A) ve [POSS-MAH-PBA] (B) boronat afinite monolitik kolonlara ait Micro-CT görüntüleri.....	36
Şekil 4.6. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna pH etkisi. pH 5.0 10 mM asetat tamponu, pH 6.0-8.0 10 mM PB, pH 10 10 mM karbonat tamponu; Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml; akış hızı: 1 ml/dak; sıcaklık: 25°C; etkileşim süresi: 60 dak.....	39
Şekil 4.7. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Akış hızı: 0.5-2.0 ml/dak; Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml; pH 8.0 10 mM PB; sıcaklık: 25°C; etkileşim süresi: 60 dak.....	40
Şekil 4.8. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Adenozin derişimi: 0.01-0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.	41
Şekil 4.9. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Sıcaklık: 4-45°C, Adenozin derişimi: 0.01-0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.....	42

Şekil 4.10. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenzin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. NaCl derişimi: 0.001-0.01 mg/ml; Adenzin derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; 10 mM PB, akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.	43
44	
Şekil 4.11. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenzin adsorpsiyonuna etkileşim süresinin. Adenzin derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; 10 mM PB, akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 0-90 dak.	44
Şekil 4.12. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona ait Langmuir adsorpsiyon izotermi.	46
Şekil 4.13. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona ait Freundlich adsorpsiyon izotermi.	47
Şekil 4.14. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon için yalancı birinci derece grafiği. pH 8.0, 10 mM fosfat tamponu; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dakika; sıcaklık: 25°C.....	49
Şekil 4.15. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon için yalancı ikinci derece grafiği. pH 8.0, 10 mM fosfat tamponu; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi 60 dakika; sıcaklık: 25°C.....	50
Şekil 4.16. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonların tekrar kullanımını. Adenzin derişimi: 0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; sıcaklık: 25°C; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.....	52
Şekil 4.17. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenzin ve dATP için seçici adsorpsiyon çalışması. Adenzin, dATP derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.	54
Şekil 4.18. Adenzine ait kalibrasyon grafiği. Adenzin konsantrasyonu: 0.005, 0.05, 0.01 mg/ml. Dalga boyu: 260 nm, mobil faz: A: 20 mM Amonyum Asetat, B: Asetonitril, 20 mM Amonyum Asetat (95:5, v/v).....	56
Şekil 4.19. POSS-MAH-PBA monolitik kolona uygulanan adenzin içeren yapay idrar örneğinin HPLC sisteminde tayini. uygulanan adenzin konsantrasyonu: 0.25 mg/ml. sıcaklık: 25°C; 1 numaralı sinyal: afinite kolona uygulamadan önceki; 2 numaralı sinyal afinite kolona uygulandıktan sonra çözeltide kalan adenzin miktarı.	57
Şekil 4.20. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanan nükleozidleri içeren yapay idrar örneğinin HPLC sisteminde tayini. Uygulanan nükleozid konsantrasyonu: 0.25 mg/ml. sıcaklık: 25°C.	58

- Şekil 4.21. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlara ait a) geçirgenlik b) geri basınç grafiği..... 59
- Şekil 4.22. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun alkil benzenleri CEC sisteminde ayırma performansı Hareketli faz, %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); injeksiyon, 5 kV 5 s; dalgaboyu, 260 nm. pik sırası, (THA)-tiyoüre, (E.B) etil benzen (P.B) propil benzen (B.B) bütül benzen, (P.B) pentil benzen. 60
- Şekil 4.23. Nükleozidlerin [POSS-MAH-PBA] monolitik boronat afinite kolon ile ayrılması. Mobil faz: %50 ACN ve %50 PB (10 mM, pH 8.0); örnek alımı: 5 kV 30 s; analiz voltajı: 10 kV; dalga boyu: 260 nm. 1. Üridin, 2. Sitidin 3. Guanozin, 4. Adenozin. 62
- Şekil 4.24. Nükleozidlerin [POSS-MAH] monolitik boronat afinite kolon ile ayrılması. Mobil faz: %50 ACN ve %50 PB (10 mM, pH 8.0); örnek alımı: 5 kV 30 s; analiz voltajı: 10 kV; dalga boyu: 260 nm. Nükleozidler: üridin, sitidin, guanozin ve adenozin karışımı. 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hazırlanan [POSS-MAH] monolitik kolonların kimyasal içerikleri.....	22
Çizelge 4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite polimerlerin elemental analiz sonuçları	32
Çizelge 4.2. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite monolitik kolonların spesifik yüzey alanları, toplam gözenek hacimleri ve ortalama gözenek çapları.	37
Çizelge 4.3. Adenozin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon değerleri ve korelasyon katsayıları.	48
Çizelge 4.4. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.....	51
Çizelge 4.5. Adenozin ve dATP molekülleri için K , K_d ve K' değerleri.....	53
Çizelge 4.6. [POSS-MAH-PBA] monolitik boronat afinite kolonların performanslarının alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin CEC sisteminde tespit edilerek tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	61
Çizelge 4.7. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun nükleozidler için kromatografik ayırma parametreleri.	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

K_d	Dağılım Katsayısı
Q_{eq}	Dengedeki Adsorplanmış Madde Miktarı
C_{eq}	Dengedeki Madde Konsantrasyonu
b	Langmuir Sabiti
Q_{max}	Maksimum Adsorpsiyon Kapasitesi
K_f	Freundlich Sabiti
$1/n$	Heterojenite Sabiti
k_1	Yalancı 1. Dereceden Hız Sabiti
k_2	Yalancı 2. Dereceden Hız Sabiti
q_e	Denge Adsorpsiyon Kapasitesi (mmol/g)
q_t	t Anındaki Adsorpsiyon Kapasitesi (mmol/g)
K	Seçicilik Katsayısı
K'	Bağıl Seçicilik Katsayısı
η	Viskozite
F	Akış Hızı
H	Etkin Plaka Yüksekliği
L	Kolon Uzunluğu
N	Etkin Tabaka Sayısı
k	Kapasite Faktörü
μ_{EO}	Elektroozmotik Hareketlilik
R_s	Ayırıcılık
t_R	Alıkonma zamanı

Kısaltmalar

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
CE	Kapiler Elektroforez
CEC	Kapiler Elektrokromatografi
EOF	Elektro Ozmotik Akış
POSS	Metakril Polihedral Oligomerik Silseskuiokzan
MAH	Metakriloil Histidin
PBA	Fenil Boronik Asit
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitril)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fouirer Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre
Micro-CT	Bilgisayarlı Mikrotomografi
ABs	Alkil Benzenler

1.GİRİŞ

İnsan vücudunun çeşitli hastalıklara verdiği cevaplar biyolojik sıvılarda görülen çeşitli metabolitler aracılığıyla yansıtılır. Kansere tıpkı diğer hastalıklar gibi, metabolik bozukluklar ile eşlik edilen bir hastalık olup, hücre turnover hızına, enzimleri değiştirici aktiviteye ve DNA/RNA (deoksiribonükleik asit/ ribonükleik asit) modifikasyonlara sebep olur. Kanserin erken teşhisi için güvenilir biyoişaretleyicilerin klinik araştırması gittikçe önem kazanan bir alan olmaktadır, çünkü bugün kullanılan biyoişaretleyicilerin birçoğu ile tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir. Kansere ya da AIDS (edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu) gibi güçlü metabolik bozuklukların eşlik ettiği hastalıklarda oldukça fazla metabolik son ürünle birlikte anormal düzeyde modifiye edilmiş nükleozidler ve nükleozidlerle biyokimyasal olarak ilişkili bileşiklerin idrara atılımı gerçekleşir.

Günümüzde yaklaşık 100 adet modifiye nükleozid bilinmektedir. Her biri taşıyıcı RNA (tRNA), mesajcı RNA (mRNA), ribozomal RNA (rRNA), tmRNA, küçük çekirdek RNA gibi hücresel RNA'ların belli bir düzeye kadar modifiye olması ile oluşur. Yapısal modifikasyonlar riboz metilasyonu, baz izomerizasyonu, indirgenme, tiyollenme ya da deaminasyon gibi modifikasyonlardır. Bütün modifikasyonlar adenozin, guanozin, üridin, sitidin, gibi normal nükleozidlerin RNA'da post-transkripsiyonel olarak modifiye olması ile gerçekleşir. Spesifik fosforilazların eksik olması sebebi ile modifiye nükleozidler tekrar dönüşüme girememekte ve idrara boşaltılmaktadır. Bu nükleozidler hasarlanmış ribonükleik asit metabolizmasının bozunma ürünleridir [1].

İdrarda bulunan nükleozidlerin tayinine yönelik oldukça fazla metod uygulanmıştır. Bunlar; yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) [2], kapiler elektroforez (CE) [3], HPLC sisteminin, gaz kromatografisi, kapiler sıvı kromatografisi ya da kütle spektrometresi (ESI-ITMS) ile birleştirilmesi ile tayin [4] ESI tandem MS [5] ya da termosprey iyonizasyonu ve hızlı atom bombardmanı [6] gibi yöntemlerdir.

Boronik asitler, nükleozid ve glikoprotein gibi cis-diol içeren bileşiklerin seçici tanınması ve bağlanmasında kullanılan önemli ligandlardır. Boronat afinite kromatografisi, boronik asitler ile cis-diol içeren bileşikler arasındaki bazik/asidik

koşullardaki tersinir kompleks oluşum/ayrılma temeline dayanmaktadır. Bu pH duyarlı bağlanma/ayrılma mekanizması boronik asit ligandlarını proteomik ve metabolomik [7–13] çalışma alanlarında kullanılan mükemmel ligandlar yapmaktadır.

Monolitik kolonlar geleneksel kromatografik kolonlara göre kolay üretim, düşük geri basınç, hızlı konvektif kütle transferi gibi özelliklere sahiptir [14]. Bu önemli avantajları sebebi ile boronat afinite monolitik kolonlar son yıllarda hızlı gelişme göstermektedir [15]. Bununla birlikte boronat afinite kolonların geniş uygulama alanları bulmasında bazı engeller bulunmaktadır. Örneğin geleneksel boronik asitler cis-diol içeren bileşiklerin tamamı ile bağlanabilmesi için bazik ortama ihtiyaç duymaktadır. Bu durum serum ya da idrar gibi nötrale yakın cis-diol içeren bileşiklerin kuvvetli bağlanmasını engeller. Aynı zamanda fenil boronik asit gibi sıradan ligandlar sınırlı afiniteye sahip olduğundan cis-diol içeren bileşiklere eser miktardaki derişimde bağlanabilirler.

Nötral ya da zayıf asidik koşullardaki, boronat afinitenin etkinliğinin artırılmasına yönelik, bağlanma pH'ının düşürülmesi gibi yaklaşımlar denenmiştir. Bunlar; fenil halkasına elektron çekici grupların eklenmesi [16–20], wulff-tipi bor atomuna molekül içi B-N koordinasyonu yapabilecek N grubunun bulunması [21,22], geliştirilmiş wulff-tipi bor atomuna molekül içi B-O koordinasyonu yapabilecek oksijen grubunun bulunması [23–27], amin ve boronik asit arasında takım oluşturarak boronat afinite [10,28] sağlama şeklindedir. Bu yaklaşımlar çerçevesinde, 2,4-difloro-3-formifenilboronik asitle (DFFPBA) fruktoza karşı pH 7.4 ve 6.0 da ultrayüksek (~10 kat) afinite göstermiştir [29]. Aynı şekilde florofenilboronik asit temelli biyosensörlerde cis-diol içeren bileşiklerin tayininde kullanılmıştır [30].

Yüksek ayırım gücü, hassasiyet, kesinlik ve pratikteki kolay uygulama özelliğine rağmen yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi ile kan, serum, idrar gibi kompleks biyolojik sıvı örneklerinden analiz yapmak, analizi yapılacak hedef molekül ile makromolekül içeren matriks bileşenleri arasındaki girişimler nedeni ile matriksin ön işlemlere tabi tutulmasını gerektirmektedir. Sıvı-sıvı, katı-faz ekstraksiyonu gibi eş zamanlı olmayan uygulamalar gerektiren bu ön işlemler

zaman alıcı ve hatalı sonuç almaya eğilimlidir. Bu problemleri çözmek için geri kazanım ve tekrarlanabilirliği artırmak için örneğin direkt uygulanabildiği destek malzemeleri geliştirilmiştir. Boos ve arkadaşları modifiye olmayan ribonükleozidlerin insan idrar ve serumundan grup spesifik tayinine yönelik yüksek performans afinite kromatografi yöntemi (HPAC-ters faz HPLC) geliştirmiştir [31]. Affi-Gel601 gibi boronik asitle türevlendirilmiş selüloz, akrilamid, silika bazlı malzemeler uygulamada kullanılmıştır. Silika ve bazı kopolimerler dışındaki destek malzemeleri esneklik, pH stabilite ve şişme gibi problemler yüzünden HPLC çalışmaları için uygun değildir.

Monolitik silika kolonlar, yüksek kolon etkinlikleri ve hidrofilik özellikleri, yüksek geçirgenlikleri ve yüksek yüzey alanına sahip olmaları nedeni ile proteomik ve metabolomik çalışmalarında oldukça fazla uygulama alanı bulmuştur [32]. Bununla birlikte monolitik organik kolonlara göre hazırlama prosesleri zor ve post-modifikasyonları zaman alıcıdır. Yeni bir alternatif olarak organik-silika hibrit monolitik kolonlar düşük büzülme, iyi mekanik kararlılık, pH stabilitesi, ve serbest post-modifikasyon özelliği gibi önemli avantajlara sahiptir [33]. Lin ve arkadaşları tarafından hazırlanan hibrit boronat afinite monolit, glikoprotein gibi cis-diol içeren bileşiklere karşı mükemmel seçicilik göstermiştir [34].

Poliheral oligomerik silseskuioksan bazlı organik-inorganik hibrit materyaller son on yılda oldukça fazla dikkat çekmiştir [35]. Silikon atomuna direkt olarak alkil grubunun eklenmesi pH değişimlerine karşı hidrolik stabilite ve azaltılmış aktivite sağlamaktadır. Ayrıca sol-jel yöntemi ile monolit hazırlarken yapısal kırıklıklara sebep olan yüksek ısıya gerek kalmamaktadır. POSS içeren sübstitite [POSS-MA] bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında çapraz bağlayıcıya ihtiyaç kalmamaktadır [36].

Düşük miktarlarda bulunan metabolitlerin zenginleştirilmesi mevcut boronat adsorbentlerin sınırlı kapasiteleri ve düşük seçicilikleri nedeni ile sorun teşkil ettiğinden bu problemin giderilmesine yönelik, cis-diol grubu içeren nükleozidler için grup spesifik bağlanma özelliği gösteren silika bazlı boronik asit temelli hibrit inorganik-organik [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolon incelenmiştir. POSS monomerinin monolitik kolona kazandırdığı kafes yapısı ve ayrıca MAH

monomerinin sağlamış olduğu göreceli hidrofilitate [POSS-MAH-PBA] kolonu için iyi mekanik kararlılık, pH stabilitesi gibi üstün özellikler kazandırmıştır.

Sentezlenmiş olan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun, adenozin molekülünün adsorplama kapasitesine pH, derişim, sıcaklık, iyonik şiddet, akış hızı ve etkileşim süresi gibi farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren nükleozidlere seçici afinitesinin PBA fonksiyonel grubundan kaynaklandığını göstermek için, PBA içermeyen [POSS-MAH] monolitik kolonu sentezlenmiş ve adenozin molekülünü bağlama kapasitesi incelenmiştir.

[POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren nükleozidlere seçici afinitesi, deoksiadenozin trifosfat (dATP) molekülünü içeren örneğin incelenmesiyle kanıtlandı.

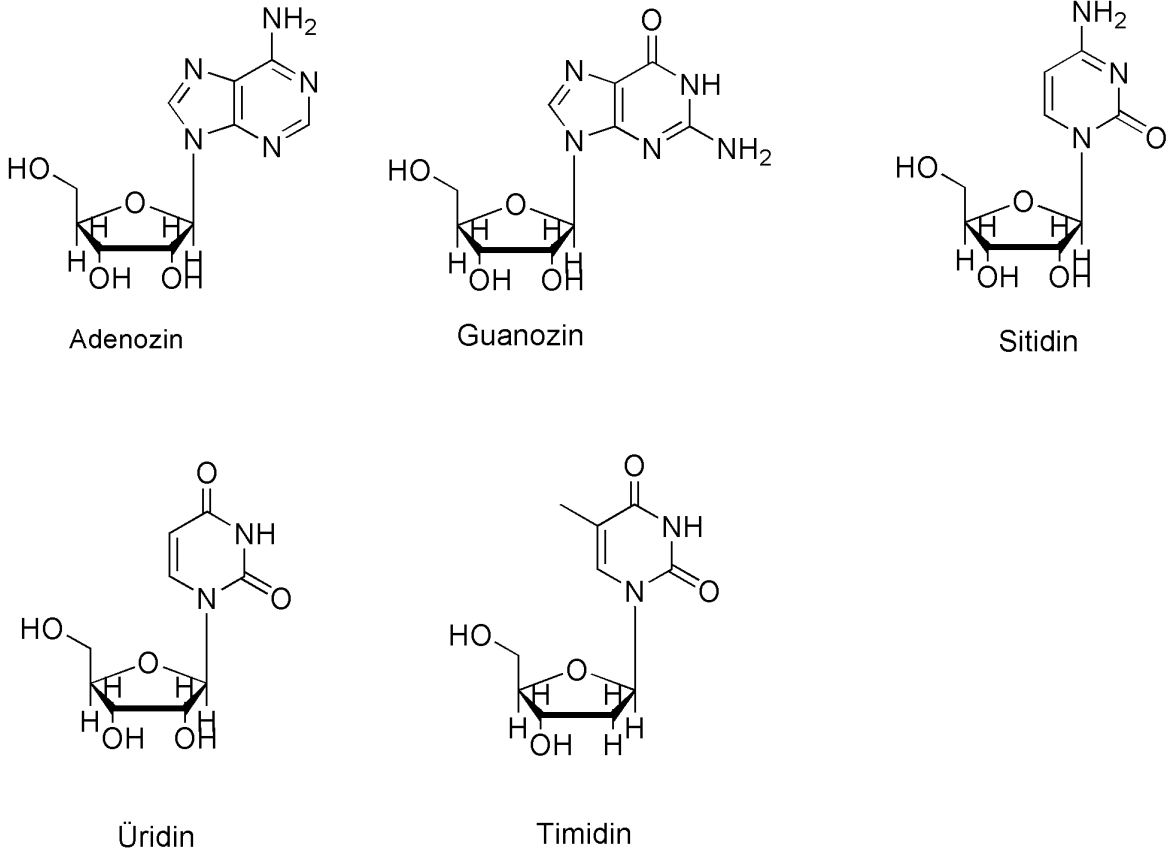
Ayrıca idrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi adenozin molekülü ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi. Adsorbe olan adenozin miktarı UV-VIS spektroskopi ile 260 nm dalga boyunda ölçülmüş ve HPLC metodu ile doğrulanmıştır. Yine aynı şekilde idrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi nükleozidler ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi ve desorbe edilen nükleozidler HPLC yöntemi ile tayin edildi ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun grup spesifik seçici özelliği nükleozidleri adsorplama özelliği doğrulanmış oldu.

Hassasiyeti artırmak için, aynı oranlarda hazırlanmış olan kapiler [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonu ile elektrokromatografik analizler gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nükleozidler

Nükleozidler azot içeren heterosiklik nükleobaz ve 5 karbonlu şekerden oluşan organik bileşiklerdir [Şekil 2.1]. Nükleobaz riboz veya deoksiriboz farketmeden 5 karbonlu şekerle β-glikozidik bağla bağlıdır. Ribonükleozidlerde, pürin veya pirimidin bazı riboz ile bağlanırken, deoksinükleozidlerde bu bazlar deoksiriboz ile bağlanmıştır. Dört nükleozid; adenozin, sitidin, üridin ve guanozin, sırasıyla adenin, sitozin, urasil ve guaninden oluşur. Dört deoksinükleozid, deoksiadenozin trifosfat (dATP), deoksisitidin, deoksitimidin ve deoksiguanozin, sırasıyla adenin, sitozin, timin ve guaninden oluşur.



Şekil 2.1. Nükleozidlerin kimyasal yapıları

Nükleozidler birçok biyolojik süreçte önemli yere sahiptir. Bu bileşikler bütün memeliler, bakteriler ve bitki hücrelerinde DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit)'yı oluşturmakla birlikte aynı zamanda genetik bilginin depolanması

ve transferinde hayati önem taşımaktadırlar. Ayrıca nükleozidler biyosentetik yolların bir kısmında, enerji transferinde bazı koenzimlerin bileşenleri olarak önemli biyolojik düzenleyicilerdir [37]. İnsan vücudu bu molekülleri endojen olarak, yani sürekli oluşup parçalanarak, sentezleyebilmektedir. Eksojen olarak gıda yoluyla vücuda giren nükleozidlerin absorpsiyonu ve kullanımı da mümkündür [38,39].

Önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle nükleozidlerin tayınları kimya, biyokimya, tıp, genetik, metabolomik ve çevre gibi alanlarda önemli çalışma alanı oluşturmaktadır [40]. Bu biyomoleküllerin analizleri birçok hastalık ve metabolik bozuklukların teşhisinde oldukça önem taşımaktadır. Nükleozidler aynı zamanda kanser işaretleyici [2] ve insan bağışıklık eksikliği virüsü (insan bağışıklık virüsü, HIV) belirteci [41] olarak kullanılmaktadırlar. Kan ve idrardaki nükleozid seviyeleri miyokardiyal hücresel enerji seviyesini belirlemek için kullanılırken kardiyak dokusunun enerji metabolizmasının incelenmesinde de kullanılmaktadırlar [42,43]. Aynı zamanda yapılarında bulunan azot ve oksijen atomlarındaki eşleşmemiş elektron çiftleri diğer organik moleküller ve metal iyonlarıyla etkileşmelerini sağlar [44,45]. Bu özellikleri sayesinde fonksiyonel nanomateryallerin sentezi ve fabrikasyonunda da kullanılmaktadırlar [46–53].

Nükleozidlerin ayrımları için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu biyomoleküllerin ayrımları için en çok kullanılan yöntemin HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) olması yanısıra aynı zamanda CZE (kapiler bölge elektroforez), MEKC (misel elektrokinetik kromatografi) ve CEC (kapiler elektrokromatografi) yöntemleri ile de ayrımlar gerçekleştirilmiştir [54].

Geniş bir kimyasal işlev aralığına sahip çeşitli enzim kofaktörleri yapılarında adenozin bulundurur. Bu kofaktörler birbiriyle adenozin içermeleri dışında yapısal olarak bir yakınlığa sahip değildir. Bu kofaktörlerin yapısında adenozin hiçbir zaman birincil işlevde yer almaz, ancak adenozinin uzaklaştırılması sonucunda kofaktör aktivitesi dramatik olarak azalır. Bu tür yapılarda diğer büyük molekülleri kullanmak yerine adenozin kullanılmasının nedeni evrimsel ekonomidir. Adenozinin önemi sahip olduğu özgün kimyasal özellikler ve içerdiği bağların enerjisi değil, tek bir bileşiğin çoklu role sahip olmasından gelen evrimsel üstünlüktür. ATP (adenin trifosfat) bir kez evrensel enerji kaynağı haline geldiğinde sistemler ATP sentezini

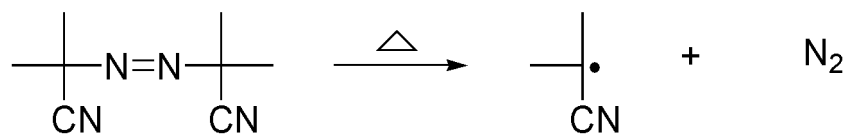
diğer nükleotitlere göre daha fazla miktarda gerçekleştirir ve sonuçta ATP'nin birçok yapıya dahil olması akılcı bir çözüm olarak belirir. Ekonomi protein yapısı için geçerlidir. Birçok enzimde adenozin bağlanan protein bölgesi kullanılır. Nükleotit-bağlayan katlanma adı verilen bu bölge ATP ve nükleotit bağlayan bir çok enzimde bulunur [55].

2.2. Polimerler

Polimerler 10^3 - 10^7 aralığında yüksek molekül ağırlığına sahip büyük zincir molekülleridir. Bu moleküller tek bir birimin kendisini zincir içerisinde sürekli olarak tekrar etmesiyle oluşurlar. Kendini tekrar eden bu birimlere 'monomer' adı verilmektedir. Polimerizasyon derecelerine göre polimerler; homopolimerler, kopolimerler, terpolimerler; polimer zincirine göre polimerler; düz zincirli polimerler, çapraz bağlı polimerler, dallanmış zincirli polimerler, hazırlanma yöntemlerine göre polimerler; kondenzasyon reaksiyonu ile oluşan polimerler, katılma reaksiyonu ile oluşan polimerler, fiziksel özelliklerine göre polimerler; termoplastikler, termosetler, elastomerler, uygulama alanlarına göre polimerler; yapıştırıcılar, kaplayıcı polimerler, fiberler olarak ayrılabilirler.

2.2.1. Başlatıcılar

Polimer zincirlerinin oluşum reaksiyonları genellikle bir başlatıcı etkisinde oluşmaktadır. Başlatıcılar; termal başlatıcılar, redoks tipi başlatıcılar, fotobaşlatıcılar ve yüksek enerjili (iyonlaştırıcı) radyasyon olarak sınıflandırılırlar. Termal başlatıcılar ısıya maruz kaldıklarında radikal veya katyon üreten bileşiklerdir. 2,2'-azobis(izobütilnitril) (AIBN) ve Benzoil Peroksit (BPO) gibi bileşikler termal başlatıcılardır. Redoks tipi başlatıcılar suda çözünen polimerler oluşturmakla beraber sıcaklığın düşük olduğu ortamda reaksiyona girmektedirler. Fotobaşlatıcılar ise sıcaklıktan bağımsız olarak reaksiyonu başlatırlar.



Şekil 2.2. AIBN molekülünün sıcaklık altında parçalanma reaksiyonu

2.2.2. Çapraz Bağlayıcılar

Polimerler zincirlerine çapraz bağlayıcı ilavesi kristaliteye bağlı olarak zincirin fiziksel özelliklerini değiştirmektedir. Çapraz bağlayıcılar polimerlerin elastikliğini yüksek ölçüde değiştirebilmektedirler. Örneğin elastomerler kontrollü çapraz bağlayıcıyla elde edilmektedir. Çapraz bağlayıcı oranının artması polimeri daha fazla sert hale getirir; polimer viskozitesi düşer. Çapraz bağlayıcılar genel olarak polimerlerin viskozitesini dşrrlr. Polimerlerin akışı için zincirlerin birbirinin üzerlerinden hareket etmesi gerekir ve çapraz bağlayıcılar bunu engellerler. Bu kimyasallar güçlü kovalent bağlar ile polimer zincirlerini birbirine yaklaştırır ve polimerin znrlğn dşrrlr. Çapraz bağlayıcılar zclerde znmezken zcleri absorplarlar. Ortamdaki zcy absorplayan çapraz bağlayıcılar jel adı alırlar. Çapraz bağlı poliakrilamit jel bu tip kimyasallara örnek olarak verilebilir. Çapraz bağlayıcılar Tg değerini arttırlar. Örneğin borik asit ile çapraz bağlanmış PVA (polivinil alkol)'nın camsı geçiş sıcaklığının artması gibi [56]. Çapraz bağlayıcılar polimerlerin erime noktalarını dşrrlr. Düşük apraz bağlanmaya sahip kristalin polimerlerde kristal bağlanma davranışında bir azalma vardır. Çünkü apraz bağlanma daha düşük erime noktasına sahip olan daha yumuşak ve elastik polimer ile sonuçlanan zincir oryantasyonuna engel oluşturur.

2.2.3. Polimerizasyon Yöntemleri

2.2.3.1. Kondenzasyon Polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerizasyonu düşük molekül ağırlığına sahip fonksiyonel gruplar için tercih edilir. Reaksiyonların stokiyometrik oranlarının bulunduğu grup reaksiyonları istenilen nihai ürünler için sabitlenir. İşlem sırasında zcnn kullanılması zorunlu değildir. Bu reaksiyonlar genellikle sıcaklık kontrollü olarak gerçekleştirilir ve katalizör ilavelidirler. Yüksek dereceli polimerizasyona ulaşabilmek için vakumlama ya da azeotropic destilasyon sistemi kullanır.

2.2.3.2. Katılma Polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonu yönteminde reaksiyon sıcaklık kontrollü ve katalizör varlığında gerçekleşir. Katılma polimerizasyonu yöntemleri; yığın, çözelti, süspansiyon, homojen ve heterojen polimerizasyon olarak sınıflandırılabilir.

2.2.3.2.1. Yığın Polimerizasyonu

Bu polimerizasyon yöntemiyle en saf polimerler elde edilmektedir. Yığın polimerizasyonu için sadece monomer, başlatıcı ve eğer gerekliyse zincir transfer ajanı kullanılmaktadır. Bu yöntemin devamlı kullanımı ile polistiren ve diğer termoplastik ürünler kalıplanabilmektedirler.

2.3.3.2.2. Çözelti Polimerizasyonu

Bu yöntemde reaksiyonun gerçekleşmesi için çözelti içerisindeki maddelere etki etmeyecek bir çözücü kullanılır. Eklenen çözücü ısı kapasitesini artırır böylece viskoziteyi azaltır ve ısı transferini kolaylaştırır. Çözücünün bir kısmı reaksiyon ortamından ısıyı uzaklaştırmak için geri soğutucu altında reaksiyondan uzaklaştırılabilir. Yığın polimerizasyonu ile karşılaştırıldığında çözelti polimerizasyonu reaksiyon hızını ve de ürünlerin molekül ağırlığını düşürmektedir.

2.2.3.2.3. Süspansiyon Polimerizasyonu

Yığın polimerizasyonunda ortaya çıkan ısının kontrol edilebilmesi için Süspansiyon Polimerizasyonu geliştirilmiştir. Reaksiyon kütleli sulu fazda çapı 0.01-1 mm boyutunda küçük damlacıklar halinde dağılmaktadır. Bu damlaların her biri küçük hacimli reaktörler gibi davranırlar. Damlalarda oluşan ısı transferi yüksek ısı kapasitesine ve düşük viskoziteye sahiptir. Ortaya çıkan ısıyı uzaklaştırmak için ısı ceketleri kullanılmaktadır. Damla büyüklüklerini ve dağılımlarını korumak için karıştırıcılarla birlikte sulu fazdaki süspansiyon edici maddeler kullanılmaktadır. Süspansiyon polimerizasyonu ile küçük ve homojen polimer kümeleri elde edilmektedir.

2.2.3.2.4. Emülsiyon Polimerizasyonu

Bu yöntem en yaygın kullanılan polimerizasyon yöntemidir. Bu proses ile ısı kontrolü ve düşük dereceli polimerizasyon zorlukları aşılabilmektedir. Emülsiyon

polimerizasyonunda organik reaksiyon kütlesi sürekli sulu fazda sabunla emülsiyeye edilir. Dağılmış parçacıkların boyutları süspaniyon polimerizasyonuna göre daha küçüktür (0.1 μm). Ek olarak sabunun dengeliyici etkisinden dolayı elde edilen emülsiyon kararlıdır ve karıştırmaya gerek yoktur. Bazı reaksiyonlarda suda çözünen bir başlatıcı kullanılabilmektedir. Emülsiyon polimerizasyonun ana ürünü kauçuk boylarının temelini oluşturan kauçuktur. Kauçuğu iyonik tuzlar ve asitlerle pıhtılaştırmak suretiyle lastik de elde edilebilir.

2.2.3.2.5. Homojen Polimerizasyon

Homojen yağın polimerizasyonunda ana reaktant gaz, sıvı ya da katı monomerlerdir. Başlatıcı veya katalizör bu polimerizasyon yönteminde kullanılmamaktadır. Bu yöntemde kullanılan monomer çözücü içerisinde tamamiyle çözünmelidir.

2.2.3.2.6. Heterojen Polimerizasyon

Heterojen emülsiyon polimerizasyonundaki monomer molekülleri misel formlarında sulu ortamda emülsiyeye olurlar. Heterojen Süspaniyon polimerizasyonunda monomer molekülleri sulu ortama büyük damlalar halinde süspanse olurlar.

2.3. Monolitler

Monolitler geleneksel olarak katalizör peletleri veya toz halinde hazırlanan yapılardır. Bu yapılar geleneksel katalizör peletlerine göre daha iyi kütle transferi, daha iyi basınç düşüşü, termal stabilite ve iyi mekanik dayanım sağlarlar [57,58]. Monolitler genellikle seramik ya da metalik formlarında uygulama alanı bulmaktadırlar [59]. Yapıları yuvarlak, kare, üçgen, hegzagonal olabilmektedir. Monolitlerin geometrik şekilleri ısı ve kütle transfer özelliklerini ve katalitik performanslarını etkilemektedir [60]. Örneğin katalitik yakıcılarda kare şeklindeki monolitlerin ısı ve kütle transferinde daha iyi oldukları görülmüştür [61].

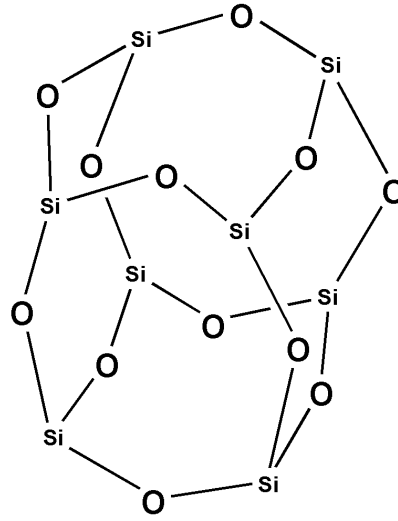
Genel olarak monolitler için ideal bir geometriden söz edilmese de monolit geometrisi istenilen reaksiyona göre seçilmektedir [57].

2.3.1. Monolitlerin Hazırlanışı

Monolitler genellikle seramik ya da metalik yapılar olarak hazırlanmaktadır. Bu iki çeşit farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmakla birlikte farklı avantaj ve dezavantajlara sahiptirler. Seramik monolitler metalik monolitlere göre daha iyi gözenek yapısında ve termal stabiliteye sahipken metalik monolitler daha iyi ısı transferi, basınç düşüşü mekanik dayanım ve hacime sahiptirler [59]. Seramik monolitler termal genleşme katsayıları nedeniyle iyi bir termal stabiliteye sahip olsalar da sıcaklıktaki değişimlerle yapıları bozunabilmektedir [58-62].

2.4. Polihedral Oligomerik Silseskuiokzan Bazlı Polimerler

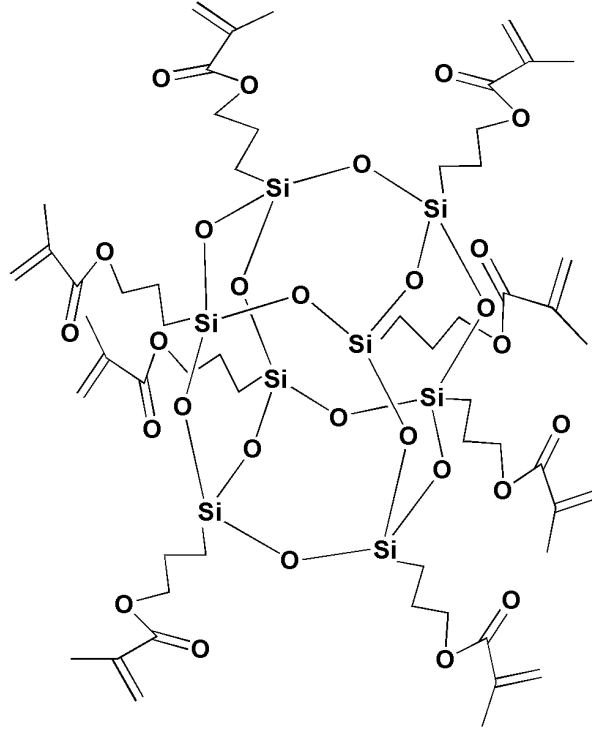
70 yıl önceki keşiflerinden beri sentetik polimerler günlük hayatta önemli yer kaplamaktadır. Ancak polimerlerin bu geniş kullanım alanları yüksek sıcaklıklara veya oksidasyona dayanım gibi özelliklerin geliştirilmesini de getirmiştir. Polimer endüstrisi bu özellikleri katkı maddeleri, çapraz bağlayıcılar veya karıştırma teknolojileriyle sınırları zorlamaktadır. Plastik ve polimer sistemlerinin çeşitliliği ve türleri oldukça etkileyici olmakla birlikte, bu çalışmanın çoğu nispeten sınırlı sayıda monomerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimerlere yeni bir yaklaşım geleneksel organik sistemlerle seramiklerin ortak özelliklerine dayalı bir sistem geliştirmiştir. Bu yaklaşımdan yol çıkarak preseramik polimerler; polifosfoazinler, polikarbosilanlar, polisilanlar ve polisiloksanlar üretilmiştir. POSS (polihedral oligomerik silseskuiokzan) nanokompozitleri direkt olarak polimer zincirlerine bağlamaktadır. Diğer hibrit sistemlerin aksine POSS teknolojisi malzemeleri, organik monomerler ile aynı şekilde veya bağlanabilir reçineler formunda kullanılabilme avantajına sahiptir.



Şekil 2.3. POSS molekülünün kimyasal yapısı

Silseskuioksan teknolojisi üzerinde yarım asırdan fazla çalışılsa da son yıllarda bu alandaki çalışma alanı dramatik olarak artış göstermiştir [63]. Silseskuioksan kelimesi kimyasal yapıları $(\text{RSiO}_{1.5})_n$ şeklinde olan moleküllerin adlandırılması için kullanılır. R grubu polihedral moleküllerinin tepe noktasını temsil eden; hidrojen, alkil, alken, aril gibi gruplardır [64]. Silseskuioksan grupları moleküler yapılarına göre kafesiz ve kafesli yapılar olarak ikiye ayrılabilirler. Kafesiz yapılar; kısmi kafes yapılı, merdiven yapılı ve rastgele yapılı olarak sınıflandırılabilirler [65]. Kafes yapılı silseskuioksanlar genellikle polihedral oligosilseskuioksanlar ya da polihedral oligomerik silseskuioksanlar olarak adlandırılırlar. Bu sınıf nanoboyutta yüksek simetridir, 1-3 nm arası çapa sahip en küçük silika parçacıklarıdır [66].

Geleneksel organik bileşiklerin aksine POSS türevleri kokusuz, kalıcı ve çevreye zararı olmayan bileşiklerdir. Polimerlerin mekanik özellikleri POSS ilavesi ile dramatik olarak değişim göstermektedir. Aynı zamanda yanıcılığı ve viskoziteyi düşürmektedir. Bu özelliklerinden ötürü POSS termoplastikler, yüksek performanslı termoplastik polimerler, termoset polimerler ve diğer fonksiyonel materyallerin özelliklerinin değiştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [65–67].



Şekil 2.3. POSS molekülüne R grubu bağlanmış hali, R: Metakril

2.5. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi uygulanan veya enjekte edilen bileşiklerin immobilize edilmiş bir biyolojik maddeye veya bununla ilişkili taklit edici bir maddeye (afinite ligandı) bağlanmalarına göre ayrıldığı bir sıvı kromatografisi yöntemidir [68,69].

Bu yöntem biyolojik ajanlarla kimyasallar arasında oldukça güçlü ve tersinir etkileşimler oluşturmaktadır. Bu uygulamaya ait bazı örnekler antipadinin bir antijenle bağlanması veya bir enzimin bir substrata bağlanması şeklinde verilebilir. Bağlanmanın seçiciliği ve gücü; hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri, sterik etkiler gibi immobilize ajan ve hedefindeki molekülün arasında gerçekleşen kuvvetlerden kaynaklanmaktadır. Afinite kromatografisi enzimler, antipadiler, proteinler gibi biyokimyasal moleküllerin ayrımalarında kullanılmaktadır [69]. Ayrıca bağlanma ajanı ile hedef molekül arasındaki bağlanma kısımlarının etkileşimlerinin termodinamiğinin ve kinetiğinin aydınlatılmasında da kullanılmaktadır. Bu özellikler afinite kromatografisini biyokimyasalların ayrımı, klinik veya biyokimyasal analizleri, biyoteknoloji ve biyokimyasal proseslerin incelenmesinde popüler bir yöntem yapmaktadır [70,71]. Bu yöntemde immobilize ajanla birlikte pek çok destek

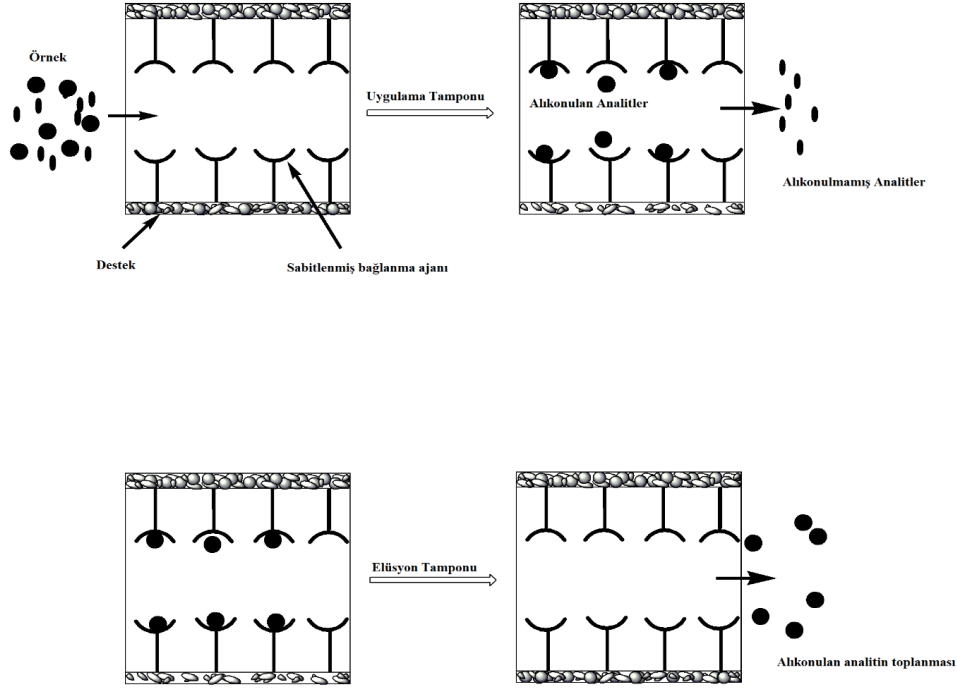
kullanılabilir. Geçmiş yillarda agaroz taneleri, silika parçacıkları, çeşitli organik polimerlerden yapılan destekler gibi parçacık bazlı malzemeler bu amaçla sıklıkla kullanılmıştır [75].

2.5.1. Afinite Kromatografisinin Genel Prensipleri

şekil 2.5 Afinite Kromatografisinin genel çalışma prensibini göstermektedir. Bu şema genellikle afinite kromatografisinin “açık/kapalı” modu olarak adlandırılmaktadır [69]. Bu modda istenilen analiti ya da hedef molekl içeren zelti hedef molekülün immobilize ajana bağlanmasını sağlayan afinite kolonundan geçirilir. İlk basamak kolon içerisinde hedef molekülün immobilize ajana güçlü bağlarla bağlanmasını sağlayan bir pH tamponu içerisinde uygulanır. Bu basamakta etkileşime girmeyen/ zayıf etkileşen moleküller kolonu terkeder. Ardından hedef moleküllü kolondan serbest bırakmak için bir elüsyon tamponu geçirilir. Hedef molekülün kolondan ayrılmasının ardından tekrar kullanımı için toplanabilir. Birçok durumda kolon tampon zeltinin tekrar geçirilmesiyle rejenere olabilir.

şekil 2.5'te gösterilen açık/kapalı durum genellikle immobilize bağlanma ajanı ve hedef molekl arasında güçlü etkileşimler olduğunda uygulanmaktadır [72].

Bu yaklaşım hedef molekl ve immobilize bağlanma ajanı arasındaki etkileşim sabitinin en az 10^6 M^{-1} olduğu durumlarda kullanılır [69].



Şekil 2.4. Afinite Kromatografisinin çalışma prensibi

Bu modda kullanılan elüsyon tamponu, hedef molekülün bağlayıcı ajandan ayrılması için uygulama tamponundan farklı bir pH, iyonik kuvvet, polarite veya katkı maddesi içeriğine sahip olabilir. “Spesifik olmayan elüsyon” olarak adlandırılan bu yaklaşım hızlı ayırımın istendiği durumlarda kullanılmaktadır [69-73].

Alternatif bir yaklaşım olarak hedef molekülün immobilize edilmiş bağlayıcı ajandan salınmasını sağlamak için rakip ajan içeren bir elüsyon tamponu kullanmaktır. “Biyospesifik Ayırım” olarak bilinen bu yöntem genellikle daha yumuşak elüsyon koşulları olduğunda uygulanır [72-74].

Eğer hedef molekül ve immobilize ajan zayıf bağlanmaya sahipse (bağlanma sabiti 10^5-10^6 M^{-1} ve daha azsa), hedef molekülü izokratik koşullar altında ayırımı yapılmaktadır. Bu son yöntem ise “zayıf afinite kromatografisi” olarak bilinmektedir [75].

Ayırmanın başarısı birçok faktöre bağlı olabilir. En önemli faktörlerden bir tanesi kolona yerleştirilen ve sabit faz olarak kullanılan immobilize edilmiş ajandır [68]. Bu bağlayıcı madde hangi hedef moleküllerin kolona bağlanacağını ve bu hedeflerin hangisinin tutunacağını belirleyen ana faktördür.

Afinite kromatografisinde önemli başka bir faktör ise kolonda kullanılan destek malzemesidir. Agaroz ya da diğer karbonhidrat bazlı destekler biyolojik moleküllere göre daha iyi pH kararlılığı, daha büyük gözenek çapı gibi özellikleri nedeniyle daha fazla tercih edilmektedirler [68]. Destek materyali olarak ayrıca farklı organik polimerler de kullanılmaktadır (polistiren destekler gibi) [75]. Bu malzemeler immobilizasyonu kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle sağlamaktadırlar.

2.6. Boronat Afinite Kromatografisi

Glikoproteinler, glikopeptidler, karbonhidratlar ve nükleozidler gibi cis-diol taşıyan biyomoleküller hastalık teşhislerinde kritik rol oynamaktadırlar [76, 77]

Cis-diol içeren bu moleküllerin ortak özelliği özellikle kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların erken evrelerinde oldukça az miktarda bulunmalarıdır [78]. Bu özellikleri de analizlerini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple bu biyomoleküllerin analizleri ve ayrımları için yeni teknolojiler üretmek oldukça önem taşımaktadır.

Cis-diol içeren moleküllerin izolasyonu ve zenginleştirilmesi için lektinler [79], antibadiler [80], hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi [81] ve boronat afinite kromatografisi [82-83] kullanılmaktadır. Lektinler ve antibadilerin uygulama yöntemlerinin zor olmasıyla birlikte kararsızdırlar. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde ise seçicilik oldukça zayıftır. Diğer yaklaşımlarla karşılaştırıldığında boronat afinite kromatografisi yüksek seçiciliği, kolay uygulanabilirliği, pH değişiminin kolay kontrolü, ucuzluğu ve kütle spektrometresiyle uyumluluğu bu yöntemi oldukça popüler hale getirmektedir [84].

Boronat afinite materyalleri seçici izolasyon ve cis-diol içeren bileşiklerin zenginleştirilmesi için güçlü sorbentlerdir. Ana prensip alkalın/asidik sulu çözelti

içerisinde boronik asit ve cis-diol bileşikler arasında kovalent komplekslerin oluşması/ayrışmasına dayanır. Genel olarak boronat afinite materyallerinin seçiminde seçicilik ve bağlanma kapasitesi ana etkenlerdir. Bu da yüksek boronat afinitesi gösteren materyallerin düşük pH'ta olması demektir. Seçiciliği arttırmak için çeşitli aromatik boronik asitler ve bunların düşük pK_a 'lı varyasyonlarının kullanılmasıdır.

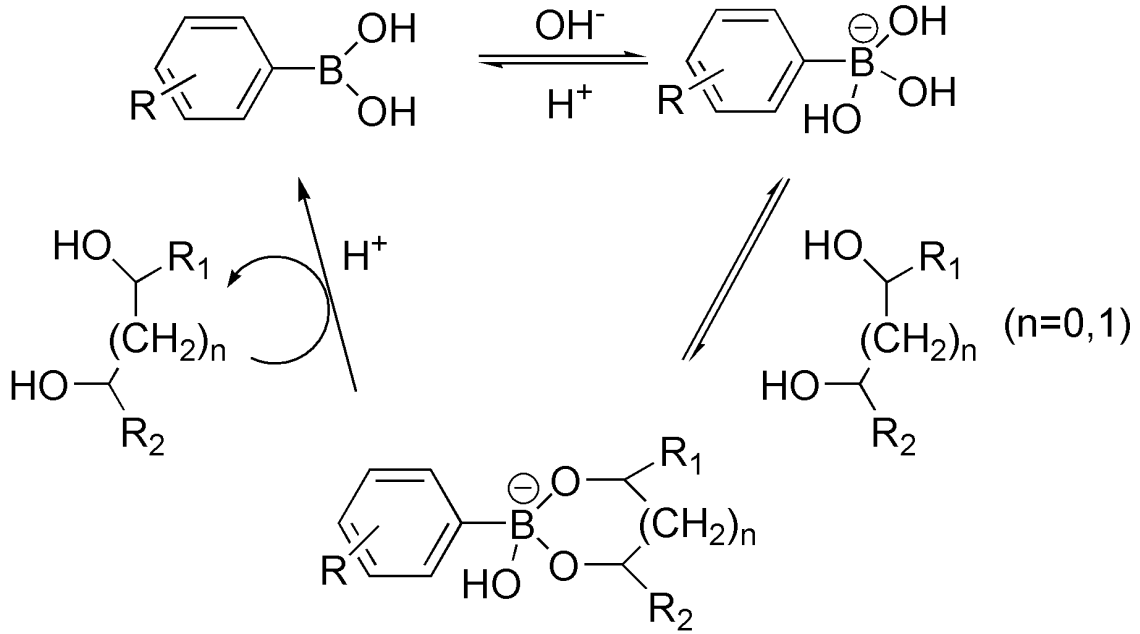
Diğer yandan bağlanma kapasitesini geliştirmek için ise boronat afinite materyallerinin yüzeyindeki fonksiyonel grupların yoğunluğunun artırılmasıdır. Boronat afinitesi yüzeyin modifikasyonuna göre 3 sınıfa ayrılabilir; küçük molekül modifikasyonu, polimer modifikasyonu ve dendrimer modifikasyonu. Ancak küçük molekül modifikasyonu konvansiyonel boronat afinite materyalleri yüzeydeki sınırlı bağlanma kapasiteleri nedeniyle pek fazla tercih edilmemektedir [85].

Son zamanlarda boronat afinite materyallerinin polimer modifikasyonu bağlanma kapasitesini arttırmak için geliştirilmiştir. Li ve arkadaşları polietilenamini $Fe_3O_4@SiO_2$ yüzeyine boronat gruplarından önce graft etmişlerdir. Aminoasit gruplarının yoğunluğu nedeniyle polietilenimin polimeri fazla sayıda bağlanma noktası sağlayabilmektedir. Bu da cis-diol içeren bileşiklerin diğer materyallere göre daha fazla adsorbent bölge bulundurmasına sebep olur [86].

Son on yıl içerisinde boronat afinite materyalleri yeni bir yaşa girmişlerdir. Makrogözenekli monolitler [10,34, 87-90], mezogözenekli materyaller [89,90], nanoparçacıklar, moleküler baskılanmış polimerler ve sıcaklığa cevap veren materyaller [91–95], nükleozidler, nükleotidler, nükleik asitler [96], karbonhidratlar ve glikoproteinler gibi cis-diol taşıyan moleküllerin ayırımında kullanılan boronat afinite materyalleridir. Ayrıca bağlanma pH'ı, afinite ve seçicilik gibi temel problemlere de son on yıl içerisinde çözüm getirilmiştir. Bu çalışmalarla birlikte boronat afinite materyalleri klinik teşhislerde oldukça fazla çalışma alanına sahiptir.

Boronat afinitesindeki moleküler etkileşimlerin prensibi boronik asit ve cis-diol içeren bileşiklerin arasındaki tersinir kovalent tepkimelerdir. Şekil 6 bu etkileşimi gösterir. Ortamın pH'ı boronik asidin pK_a değerinden daha büyük olduğu zaman boronik asit

tetragonal boronat anyonunu ortaya koymaktadır. Bu anyon cis-diol içeren bileşiklerle reaksiyona girer ve 5 ya da 6 karbonlu siklo esterleri oluşturur. Ortamın pH'ı asidik olduğu zaman boronik asit cis-diol kompleksi çözünür çünkü böyle bir pH durumunda boronik asit trigonal bir konfigürasyonda bulunur ve boronik asit bu yapıda genellikle cis-diol içeren moleküllerle çok az etkileşime geçer.



Şekil 2.5. Boronik Asitler ve Cis-Diol içeren bileşiklerin kimyasal etkileşimleri

2.7. Kapiler Elektrokromatografi

Kapiler elektrokromatografi (CEC) elektrik akımıyla birlikte oldukça iyi bir kromatografik performans sergileyen modern sıvı kromatografi tekniklerinden bir tanesidir. Bu yöntem yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemlerinin hibrit bir teknolojisidir. Kapiler elektroforez yöntemindeki gibi ayırım kapiler kolon içerisinde elektroozmotik akışın (EOF) oluşturduğu sıvı hareketi ile gerçekleşir. Ayrıca durgun faz HPLC sistemlerinde olduğu gibi mikro ölçeklidir.

CEC sistemleri ayırım için hem nötral hem yüklü bileşiklerin ayrımları, düşük miktarda numune kullanımı ve organik çözücü kullanımının azaltımı gibi avantajlar sağlamaktadır. HPLC yöntemine kıyasla CEC teknolojisi daha yüksek ayırma

kapasitesi, daha iyi çözünürlük, daha yüksek potansiyel pik kapasitesi ve kısa analiz sürelerine sahiptir [97,98]. Ek olarak CEC teknolojisinin düşük hacimli akış hızları kütle spektrometresi (MS) ile oldukça uyumludur [99].

Kullanılan durağan faza göre CEC iki ana gruba ayrılmaktadır; açık-borulu CEC (OT-CEC) ve dolu kolon CEC (PC-CEC). OT-CEC yönteminde durağan faz kapilerin iç duvarına tutturulurken; PC-CEC yönteminde kapiler iki arasında tutturulmuş katı materyal ile doldurulmuştur. Ek olarak son zamanlarda kullanılan sürekli yatak kolonları CEC teknolojisinin 3. bir yöntemi olarak sayılabilir [100].

Sabit faz yüzeyindeki iyonlaşan gruplar CEC yönteminde uygun bir EOF üretmek için önem taşımaktadır [101]. Bu yöntemde kullanılan çoğu durağan fazlar iyon değiştiricilerdir. Zayıf katyon değiştiriciler olarak sayılan silika bazlı dolum materyalleri kolon içerisindeki kalan silanol gruplarının iyonlaşması nedeniyle katodik EOF üretmektedirler. Son yıllarda sülfonik asitler veya hidrokarbon zincirleri gibi kuvvetli iyonik gruplardan oluşan karma iyon değiştiriciler genişletilmiş bir pH aralığında kararlı EOF sağladıkları için oldukça ilgi görmektedir [102]. EOF'nin yönü, durağan fazların yüzeyindeki yüklere bağlıdır, bu nedenle, amino grupları veya amonyum grupları gibi pozitif yüklü fonksiyonel gruplara sahip sabit fazlar, katoddan anota bir EOF oluşturur. Buna karşın sülfonik asit ve karboksilik asit gibi negatif yüklü sabit fazlar katodik EOF üretir. Zwitteriyonik durağan faza sahip kolonlar EOF'yi diğer durağan faza sahip materyallere kıyasla çift yönlü üretir. Sıvı kromatografi ayırma metodlarından birisi olan zwitteriyonik olarak modifiye edilmiş materyaller son yıllarda baskın olarak bir çalışma alanı oluştursa da bu materyallerin kromatografik ayırma kullanımlarına yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır [103–106]. Bununla birlikte, HPLC'de kullanılan zwitteriyonik ayırma materyallerinin çoğu, hem pozitif yüklü kuaterner amonyum grupları hem de negatif yüklü sülfonik grupları taşıyan ve güçlü kategorisine ait olan sülfobetain tipi zwitteriyonik fonksiyonel gruplara sahip malzemelerdir; yani hem negatif hem de pozitif gruplar, bütün çalışılan pH aralığı boyunca yüklerini üzerlerinde tutarlar. Başka bir deyişle zwitteriyonik kısımlar net olarak hiç yük tutmazlar. Bu tür zwitteriyonik malzemelerin bu karakteri, CEC için dezavantajlıdır, çünkü EOF'yi desteklemek için sabit fazların yüzeyinde yüklü grupların bulunması gerekir. Bütil metakrilat (BMA), etilen

dimetakrilat (EDMA), metakrilik asit (MAA) ve 2-(dimetil amino) etil metakrilat (DAMA) gibi kimyasallar EOF'nin hem yönünü hem de gücünü kontrol etmek için CEC yönteminde kullanılan zwitteriyonik materyallerdir [107].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında nükleozidler; adenozin, sitidin, timidin, üridin ve guanozin, fonksiyonel monomer; N-metakriloil-L-histidin metil ester (MAH), gözenek yapıcı ve çözücü; etilen glikol ve bütanol, başlatıcı; 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) ve fenil boronik asit (PBA) Sigma Aldrich firmasından, çapraz bağlayıcı; Metakril Polihedral Oligomerik Silseskuiokzan (POSS) Hybrid Plastics, USA firmasından temin edilmiştir. Bütün kimyasallar analitik saflıktadır. Sulu çözeltiler için kullanılan suyun saflaştırılması için yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm' dir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında yüzey morfolojisini tayin için kullanılan SEM cihazı Tescan marka olup modeli GAIA 3'tür. Micro-CT cihazının markası ise Bruker; modeli Skyscan 1272'dir. Elemental analiz cihazının markası Leco, modeli Truspec, yapı analizi için kullanılan FTIR cihazının markası Thermo Fisher, modeli Nicolet is50, Kapiler Elektrokromatografi analizleri için kullanılan kapiler elektrokromatografi (CEC) cihazı PRINCE CE-C 760'tır.

3.3. DeneySEL Yöntem

3.3.1. [POSS-MAH] Kolonların Hazırlanışı

Nükleozid adsorpsiyonuna ve ayırımına yönelik olarak kullanılacak olan boronat afinite temelli kolonu hazırlamak için optimum özelliğe sahip [POSS-MAH] monolitik kolon hazırlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla dört farklı polimer içeriğine sahip karışım hazırlanmıştır. Çizelge 3.1 optimum performanslı [POSS-MAH] kolon elde etmek için hazırlanan karışımların içeriğini göstermektedir.

Çizelge 3.1. Hazırlanan [POSS-MAH] monolitik kolonların kimyasal içerikleri

Kolon Numarası	Bütanol (µL)	Etilen Glikol (µL)	POSS (g)	MAH (µL)	AIBN (mg)	Geçirgenlik
1	1404	160	0.30	364	15	Var
2	1404	160	0.60	364	15	Yok
3	1586	160	0.30	182	15	Yok
4	702	862	0.30	364	15	Yok

Metanol çözeltisi ile geçirgenliği kontrol edilen çizelge 3.1'deki kolonlardan en iyi geçirgenlik özelliği gösteren 1 numaralı kolon PBA ile fonksiyonlandırılmak üzere çalışma kolonu olarak seçilmiştir.

1 numaralı monolitik kolonun hazırlanması için 1404 µl Bütanol, 160 µl Etilen Glikol, 0.30 gram POSS, 364 µl MAH ve 15 mg AIBN kullanılmıştır. Doldurulan kolon 60 °C sıcaklıkta 24 saat su banyosunda bekletilmiştir. Polimerleşme gerçekleştiikten sonra hazırlanan kolon 1 saat süreyle etil alkol ile yıkanmıştır. Yıkanılan kolon pH 8.0 fosfat tamponu ile dengelenmiştir. Desorpsiyon çalışmaları için desorpsiyon çözeltisi olarak 25 mM formik asit ve metanol çözeltisi karışımı (1:1, v/v) kullanılmıştır.

3.3.2. [POSS-MAH-PBA] Kolonların Hazırlanışı

[POSS-MAH-PBA] monolitik kolon 3.1'de seçilerek hazırlanan [POSS-MAH] monolitik kolon (Kolon 1) reçetesinin modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Monolitik kolonun hazırlanması için 1404 µl Bütanol, 160 µl Etilen Glikol, 0,30 gram POSS-MA, 364 µl MAH ve 15 mg AIBN kullanılmıştır. Doldurulan kolon 60 °C sıcaklıkta 24 saat su banyosunda bekletilmiştir. Polimerleşme gerçekleştiikten sonra kolon 1 saat süreyle etil alkol ile yıkanmıştır. Hazırlanan kolondan pH 6.0 MES tamponu içerisinde hazırlanan 0.25 mg/ml 50 ml PBA çözeltisi 45 dakika boyunca geçirilerek kolonun yüzeyine PBA fonksiyonel grupları bağlanmıştır.

3.3.3. [POSS-MAH] Monolitik Kapiler Elektrokromatografi Kolonların Hazırlanışı

[POSS-MAH] monolitik kapiler elektrokromatografi kolonu hazırlamak için, boş kapiler kolonların yüzeyinde silanol (-Si-OH) gruplarının oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla kapiler kolonlar sırasıyla 0.2 M sodyum hidroksit (3 sa), su (30 dak), metil alkol (30 dak) ile muamele edilmiş ve azot gazı (30 dak) ile kurutulmuştur. Daha sonra yıkanan kolondan 3-trimetoksisililpropilmetakrilat-metil alkol (TMPSPM-MeOH) (%50 v/v) karışımı 30 dak süresince geçirilmiş ve 35°C'de 24 saat su banyosunda bekletilerek yapıya vinil gruplarının takılması sağlanmıştır. Son olarak kapiler kolon 15 dak MeOH ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. Silanlama işleminin ardından kapiler kolona seçilmiş olan reçeteye göre 260 µl bütanol, 40 µl etilen glikol, 7.5 mg AIBN, 182 µl MAH karışımın çözeltisi doldurulmuş 60°C'de 24 saat bekletilerek polimerleşme sağlanmıştır.

3.3.4. [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kapiler Elektrokromatografi Kolonların Hazırlanışı

Bölüm 3.3.3.'te anlatılan [POSS-MAH] monolitik kapiler elektrokromatografi kolonların hazırlanışı kısmındaki prosedürle hazırlanan [POSS-MAH] monolitik kolon hazırlandıktan sonra kolondan 10 mL pH 6 MES çözeltisinin içerisinde çözünmüş olan 2.5 mg/ml PBA içeren çözelti kolondan geçirilmiştir. Hazırlanan kolon 30 dak boyunca distile deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.4. Adsorpsiyon Çalışmaları

Hazırlanan [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolona nükleozidlerden model bileşik olarak seçilen adenosin molekülünün adsorpsiyon çalışmaları kapsamında adsorpsiyona pH, akış hızı, başlangıç derişimi, sıcaklık, iyonik şiddet ve etkileşim süresi gibi parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Adsorpsiyon modelini tespit etmek için adsorpsiyon izotermi incelenmiş, fizikokimyasal süreçlerin adsorpsiyona etkisini açıklamak için adsorpsiyon kinetiği çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren moleküllere afinitesinin PBA fonksiyonel grubundan kaynaklandığını göstermek için, PBA içermeyen [POSS-

MAH] monolitik kolonu sentezlenerek adenozin molekülünü bağlama kapasitesi incelenmiştir.

Adsorpsiyon çalışmalarındaki [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolona adsorplanan adenozin miktarını (Q) hesaplamak için Eşitlik 3.1 kullanılmıştır. Eşitlikteki C_i ve C_f , moleküllerin ilk ve son konsantrasyonlarını (mg/ml); V, çözelti hacmi (ml) ve m, kullanılan [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonun kütlesini (g) tanımlamaktadır.

$$Q = \left(\left[\frac{C_i - C_f}{m} \right] \times v \right) \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

pH etkisi incelenirken pH 5.0-10 aralığında çalışılmış, pH 5.0 için 10 mM asetat tamponu, pH 6.0-8.0 için 10 mM fosfat tamponu (PB) ve pH 10 için 10 mM karbonat tamponu içeren çözeltiler kullanılmıştır. Akış hızı etkisi incelenirken, akış hızı 0.5 den 2.0 ml/dak ya artırılmıştır. Başlangıç derişimi etkisinde ise derişim aralığı 0.01-0.25 mg/ml adenozin konsantrasyonu için incelenmiştir. Sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesine etkisi 4-45°C sıcaklık aralığında çalışılmış, son olarak adsorpsiyona iyonik şiddetin etkisi ortamda bulunmazken ve farklı iyonik şiddette (0.001-0.01 mg/ml) NaCl tuzunu içeren adenozin çözeltilerinin adsorplanması ile incelenmiştir. Etkileşim süresinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun belirli zaman aralıklarıyla 90 dakika boyunca adsorpsiyon miktarı ölçülmüştür.

3.5. Seçicilik Çalışmaları

Nükleozidler, glikoproteinler gibi cis-diol grubu içeren bileşiklerin ayrımları ve analizleri için sıklıkla kullanılan boronik asit ligandları tersinir kovalent bağlanmaları, hızlı bağlanma kinetikleri ve kütle spektrometresiyle uyumluluğu gibi birçok önemli avantaja sahiptirler. Bu ligandların cis-diol grupları içeren moleküllerle etkileşimleri boronik asit bünyesindeki borun bir anyon oluşturup tetragonal yapıya geçmesiyle birlikte hedef molekül ile tersinir kompleks oluşturmalarına dayanmaktadır. Bu kompleks oluşumu pH kontrollü olarak gerçekleştirilmektedir. Boronik asit ligandının tez kapsamında seçilen cis-diol grubu

taşıyan adenozin nükleozidini seçici adsorplaması için fenil boronik asit ile modifiye edilmiş [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonu hazırlanmıştır. Grup seçici özelliği gösteren [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonu cis-diol grubu içermeyen deoksiadenozin trifosfat (dATP) ile muamele edilmiş, adenozin ve dATP'nin konsantrasyonları ile UV-VIS spektroskopi ile 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Adenozin ve dATP'nin seçicilik ve dağılım katsayıları eşitlik 3.2, 3.3, 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır:

Eşitlik 3.2.'de K_d ; dağılım katsayısını (ml/g); C_i ve C_f , adenozin ve dATP moleküllerin sırasıyla ilk ve son konsantrasyonlarını (mg/ml); V , çözelti hacmini (ml) ve m , kullanılan [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun kütlesini (g) tanımlamaktadır.

$$K_d = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \left(\frac{V}{m} \right) \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

Adenozin molekülünün yarışmacı bir molekül olması durumunda bağlanma seçiciliğini ifade eden seçicilik katsayısı K , Eşitlik 3.3'e göre denge bağlanma verileri kullanılarak elde edilir.

$$K = \frac{K_{d, \text{ adenozin}}}{K_{d, \text{ dATP}}} \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

Baskılama seçiciliğini ifade eden k değerleri baskılamadaki seçiciliği tanımlar. Bağlı seçicilik katsayısı (k') eşitlik 3.4. ile tanımlanmıştır:

$$k' = \frac{K_{\text{BPA fonksiyonlandırılmış}}}{K_{\text{BPA fonksiyonlandırılmamış}}} \quad \text{Eşitlik 3.4}$$

3.6. Yapay İdrardan Nükleozid Tayini

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona idrarda bulunan nükleozidlerin adsorpsiyonu çalışmaları için 0.25 mg/ml nükleozid spike edilmiş adsorbe olan adenozin miktarı UV-VIS spektroskopi ile 260 nm dalgaboyu'nda ölçülmüştür.

Daha sonra ise adsorbe olan adenozin molekölü HPLC metodu ile doğrulanmıştır. Sentezlenen boronat afinite kolonun yapay idrardan adenozin molekölünü ne kadar tutabildiğini tespit edebilmek için adenozin spike edilmiş idrar örneğinden kolona uygulanmadan ve uygulandıktan sonra alınan örnekler HPLC sisteminde aynı koşullarda incelenmiş; tutulan adenozin tespit edilmiştir.

Yine aynı şekilde idrar çözeltisi nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi nükleozidler (adenozin, guanozin, sitidin, üridin) ile 0.25 mg/ml derişim içerek şekilde spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi ve desorbe edilen nükleozidler HPLC yöntemi ile tayin edildi ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun grup spesifik seçici özelliği, nükleozidleri adsorplaması ile doğrulanmış oldu.

Bütün HPLC çalışmaları DIONEX Ultimate 3000 cihazında, DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak A: 20mM Amonyum Asetat, B: Asetonitril ve 20 mM Amonyum Asetat (95:5, v/v) çözeltileri kullanılmıştır. Analizde gradient sistemi uygulanmış olup 10 dakika içinde B çözeltisi %5'ten %40'a 1 ml/dak akış hızında artırılmıştır. Analiz 260 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Sentetik idrar örneği, Avrupa komisyonu "Referans Materyaller ve Ölçümler" merkezinin hazırlamış olduğu rapora göre, doğal idrar örneğinin simule edilmesiyle hazırlanmıştır [108]. Kalibrasyon çözeltisi olarak adenozin molekölünün 0.005, 0.05 ve 0.01 mg/ml derişimindeki çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC analizleri ters faz (RP) yöntemi ile C18 polar (Fusion-RP) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. C18 kolonu Phenomenex (Torrance, CA, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.7. Kapiler Elektrokromatografi Çalışmaları

[POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kapiler kolon ile gerçekleştirilen elektrokromatografi çalışmaları için öncelikle kolon performansı incelenmiş olup sonraki aşamada nükleozidlerin elektrokromatografik ayırımı gerçekleştirilmiştir. Kolon performansını incelemek için kullanılan mobil faz karışımı, %50 ACN ve %50 fosfat tamponundan (PB) (10 mM, pH 8.0) oluşmuştur. Her analiz öncesi, mobil faz

karışımı Nano-LC pompası ile oda sıcaklığında (25°C) 2 saat süre ile [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolondan geçirilmiştir.

Kolon performansını incelemek için alkil benzenlerin (ABs) ve alikonmayan işaretleyici olarak kullanılan tiyoürenin (THA) mobil fazdaki 0.1 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ and 0.25 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ derişimindeki çözeltileri CEC sistemine uygulanmıştır. Tekrarlanabilir çalışmalar elde edebilmek için her örnek 5 kV potansiyelde 30 s boyunca elektrokinetik olarak kolona yüklenmiştir.

Kolon geçirgenliği K, kolondan metanol çözeltilisinin geçirilmesi ve geri-basıncın ölçülmesi ile denklem 3.5.'e göre hesaplanmıştır.

$$K = (F\eta L)/(\pi r^2 \Delta P) \quad \text{Eşitlik 3.5}$$

Burada F akış hızını, η viskoziteyi, L kolon uzunluğunu, r kolonun iç çapını, ΔP ise basınç düşmesini göstermektedir. Elektro-osmotik mobilite, μ_{eof} , denklem 3.6'ya göre hesaplanmaktadır.

$$\mu_{\text{eof}} = L_e L_t / V t_R \quad \text{Eşitlik 3.6}$$

Nükleozidlerin CEC sisteminde ayırımını incelemek için ise mobil faz karışımı [%50 ACN ve %50 PB, 10 mM, pH 8.0] ile 0.5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ derişiminde hazırlanan örnekler 5 kV 30 s süresince [POSS-MAH-PBA] kolona yüklenmiş ve analiz boyunca 10 kV akım uygulanmıştır.

Kromatografide minimum zamanda, optimum ayırım elde etmek önemlidir. İki pik arasındaki ayırım değerinin (R_s)>1.5 ve üzerinde olması, pik alanının yada yüksekliğinin ölçülebilir olmasını olanaklı kıldığından ayırım pozitif yönde katkı sunmaktadır. Ayırım değeri (R_s), eşitlik 3.7.'ye göre hesaplanmaktadır.

$$R_s = 2[t_{R2} - t_{R1}] / w_1 + w_2 \quad \text{Eşitlik 3.7}$$

Kolon tarafından ayrılan her bir sinyalin R_s değeri ayırımı ifade etmektedir. t_{R2} ve t_{R1} elüsyon zamanlarını, w_1 ve w_2 ise her bir bileşiğin pik genişliğine karşılık gelmektedir.

Alıkonma zamanlarıyla seçicilik faktörleri (α) Eşitlik 3.8 kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$\alpha = (t_A/t_B) \quad \text{Eşitlik 3.8.}$$

Bu denklemlerdeki t_A ve t_B A- ve B- pikleri için alıkonma zamanlarını göstermektedir. Ayırıcılık aynı zamanda etkin tabaka sayısına (N) ve kapasite faktörüne (k) bağlıdır. Tabaka sayısı ve kapasite faktörü Eşitlik 3.9 ve Eşitlik 3.10'a göre hesaplanır.

$$N=5.54(t_R/W_{1/2})^2 \quad \text{Eşitlik 3.9.}$$

Denklemden t_R alıkonma zamanını, $W_{1/2}$ pik yüksekliğinin ortasındaki pik genişliğini tanımlamaktadır.

$$k=t_R-t_0/t_0 \quad \text{Eşitlik 3.10.}$$

Denklemden t_R alıkonma zamanını, t_0 ise tutunmayan maddenin alıkonma zamanını belirler.

Etkin plaka yüksekliği H ise kolon uzunluğunun (L) teorik plaka sayısına bölünmesi ile eşitlik 3.11'e göre hesaplanır.

$$H=L/N \quad \text{Eşitlik 3.11}$$

Kolon üretim tekrarlanabilirliği işlemi, seçilen AB'lerin alıkonma zamanları kontrol edilerek gerçekleştirildi. Bunun için a) kolondan kolona parti içi b) partiler arası (partiden partiye) hazırlanan kolonlar ile alıkonulan AB'lerin alıkonma zamanları incelendi. Herbir kolonun üç partide ve her partide üç kolon olmak üzere toplam

dokuz kolon hazırlandı. Alıkonma değerlerin tekrarlanabilirliği istatistiksel olarak değerlendirildi ve yüzde göreceli standart sapma (%RSD) olarak kaydedildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolon Karakterizasyonu

4.1.1. Şişme Testi Sonuçları

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun ve PBA ile modifiye edilmeden sentezlenen [POSS-MAH] monolitik kolonun kafes yapılarından dolayı gözenekli olduğu görülmüş ve su tutma kapasitelerini incelemek için şişme testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için alınan kuru monolitik örnekler dikkatli bir şekilde tartılmış ve 50 mL'lik behere konularak sıcaklığı sabit izotermal banyoda (25±0.5 °C) 90 dak süre ile belirli zaman aralıklarında sudan çıkarılıp filtre kağıdı ile kurulandıktan sonra yeniden tartılarak ölçüm alınmıştır. Kuru ve ıslak örneklerin ağırlık oranları Eşitlik 4.1 kullanılarak % şişme oranı hesaplanmıştır;

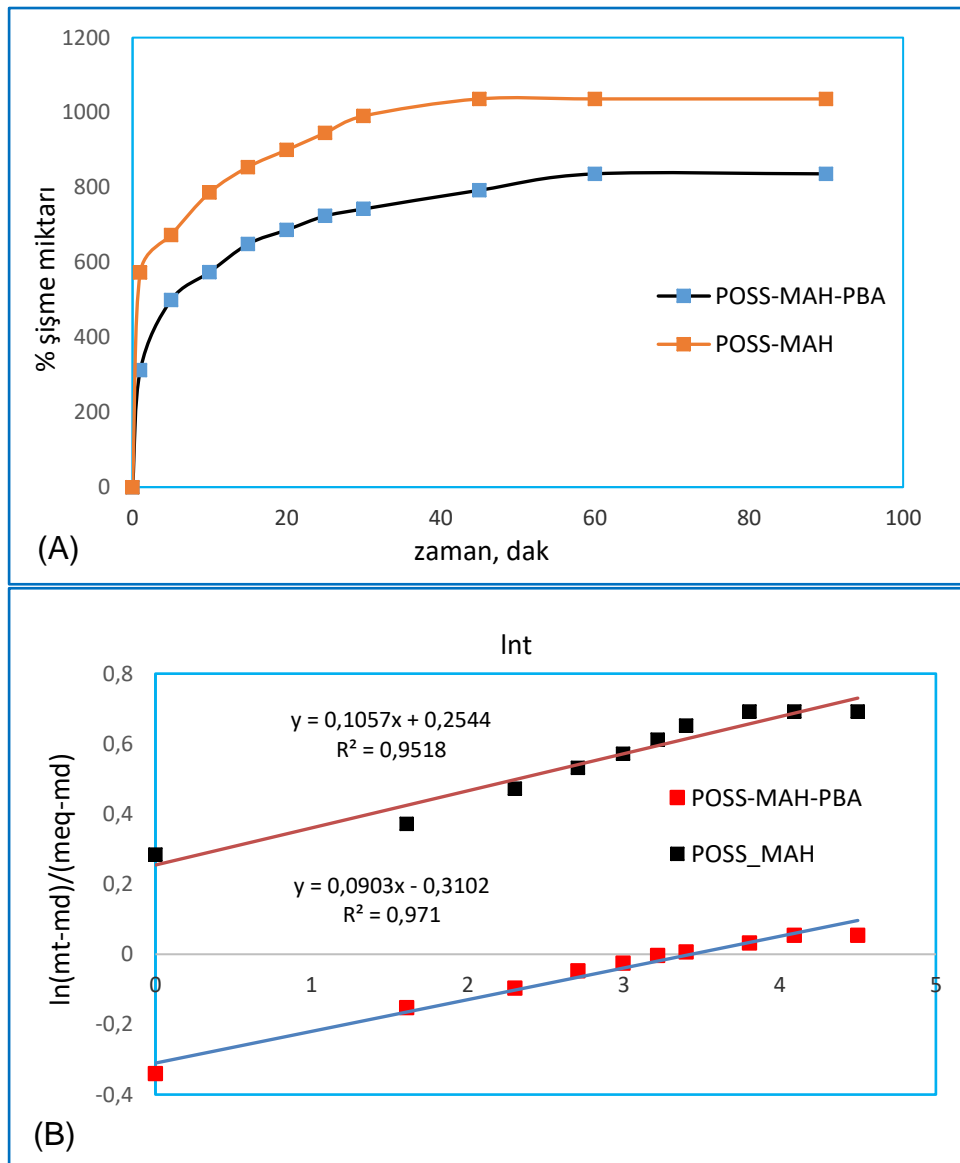
$$\text{Şişme derecesi (\%)} = \frac{W - W_0}{W_0} * 100 \quad \text{Eşitlik 4.1.}$$

Burada W monolitik kolonun ıslak halini W₀ ise monolitik kolonun kuru halini göstermektedir. Sentezlenen [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonlar MAH'ın göreceli hidrofilik olması ve PBA ligandın ise hidrofobik olması nedeni ile su alma kapasiteleri Şekil 4.1'de görüldüğü üzere farklı şişme dinamiği göstermiştir.

Sentezlenmiş olan [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlar sahip oldukları kafes yapıları nedeni ile mobil fazın su olduğu ortamlarda yüksek şişme özelliği kazanmıştır. Ayrıca kafes yapısının mobil fazın akışına engel teşkil etmeyecek şekilde gözenekli olması, geri basınç dinamiklerini etkilemiş ve monolitik kolonlarda karşılaşılan problemlerden biri olan geri basınç problemini ortadan kaldırmıştır. POSS monomeri monolitik kolonların sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcı ihtiyacını ortadan kaldırarak, çapraz bağlayıcının polimerik

yapıda küçük gözenekler oluşturması ihtimalini bertaraf etmiş, böylelikle düşük geri-basınca sahip akış dinamiği elde edilmiştir.

PBA ile modifiye edilmeden elde edilen [POSS-MAH] monolitik kolonun şişme oranı % 1036.36 iken hidrofobik PBA ile modifiye edilerek oluşturulan [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun şişme oranı % 836.32 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen şişme özelliğindeki bu kayda değer azalış monolitik yapının hidrofobik PBA ile modifiye olduğunu göstermektedir.

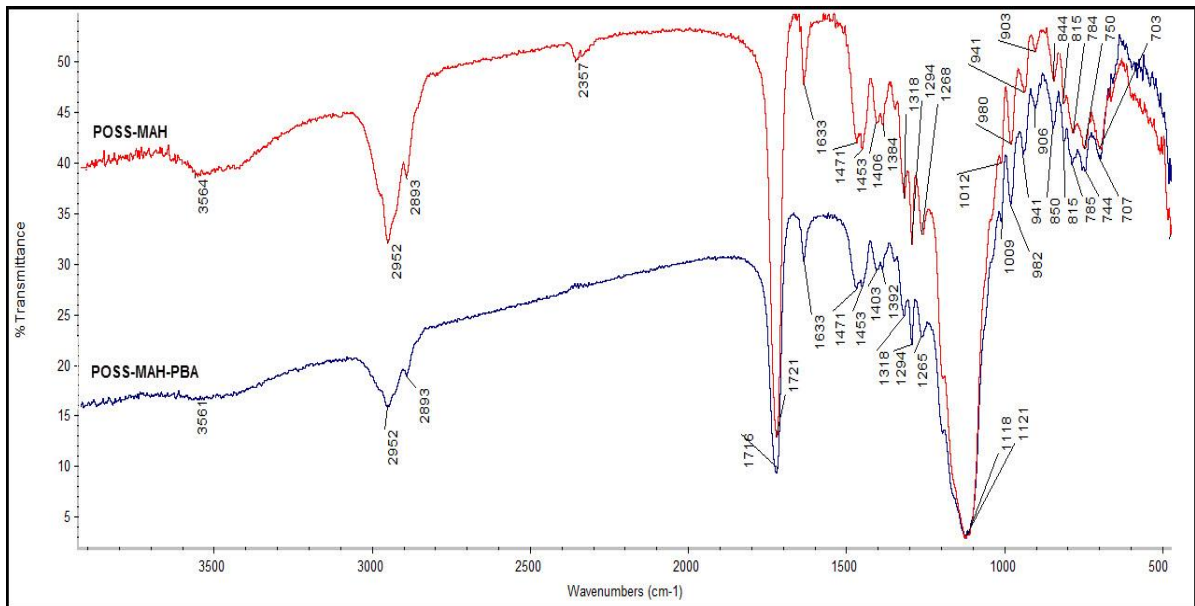


Şekil 4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara ait su tutma davranışı a) şişme yüzdesi b) şişme kinetiği.

4.1.2. FTIR Sonuçları

1118–1121 cm^{-1} dalga sayısındaki titreşimler [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonundaki Si–O–Si titreşim bandlarına aittir. 1716–1721 cm^{-1} sinyalleri –C=O gerilme bandlarına aittir. 2952 ve 2893 cm^{-1} deki bandlar sırası ile N-H ve C-H gerilme bandlarına aittir.

MAH monomerine ait karakteristik amid I ve amid II bandları sırası ile 1633 cm^{-1} ve 1453 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir. 1118-1121 cm^{-1} dalga sayısındaki titreşimler aynı zamanda imidazol halkasının C-N titreşim bandına ait olup Si-O bandları tarafından örtülmektedir. MAH monomerine ait 1584 cm^{-1} deki C-C=C simetrik gerilme bandlarının kaybolması MAH monomerinin POSS-MA yapısına katıldığını göstermektedir. 844 cm^{-1} düzlem dışına C-N eğilme bandının kaybolması ve 850 cm^{-1} fenil boronik astteki –B-O simetrik gerilme bandının ortaya çıkması olup boronik asitin yapıya girdiğini göstermektedir. Ayrıca 1633 cm^{-1} deki band imidazol halkasının C=C gerilme bandına aittir. 2357 cm^{-1} deki C=N bağına ait bandın kaybolması imidazol halkasının PBA üzerindeki bor ile tetragonal yapı oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik kolonlarının FTIR sonuçları.

4.1.3. Elemental Analiz Analiz Sonuçları

Bu çalışmada literatürde ilk defa hibrit inorganik-organik bazlı [POSS-MAH] monolitik polimer sentezlenmiş olup daha sonra sentezlenen polimer PBA ile modifiye edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonlar hazırlanmıştır. Sentezlenen afinite kolonların yapısına katılan elementlerin analizi için karbon (C), hidrojen (H), azot (N) ve bor (B) içeriği elemental analiz ile tespit edilmiştir. Çizelge 4.1.'deki [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite polimerlerin elemental analiz değerlerine bakıldığında [POSS-MAH] polimerin %N içeriğinin 2.5 olması ve [POSS-MAH-PBA] polimerinin %B içeriğinin 5.4 olması MAH monomerinin ve PBA fonksiyonel grubunun yapıya başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite polimerlerin elemental analiz sonuçları

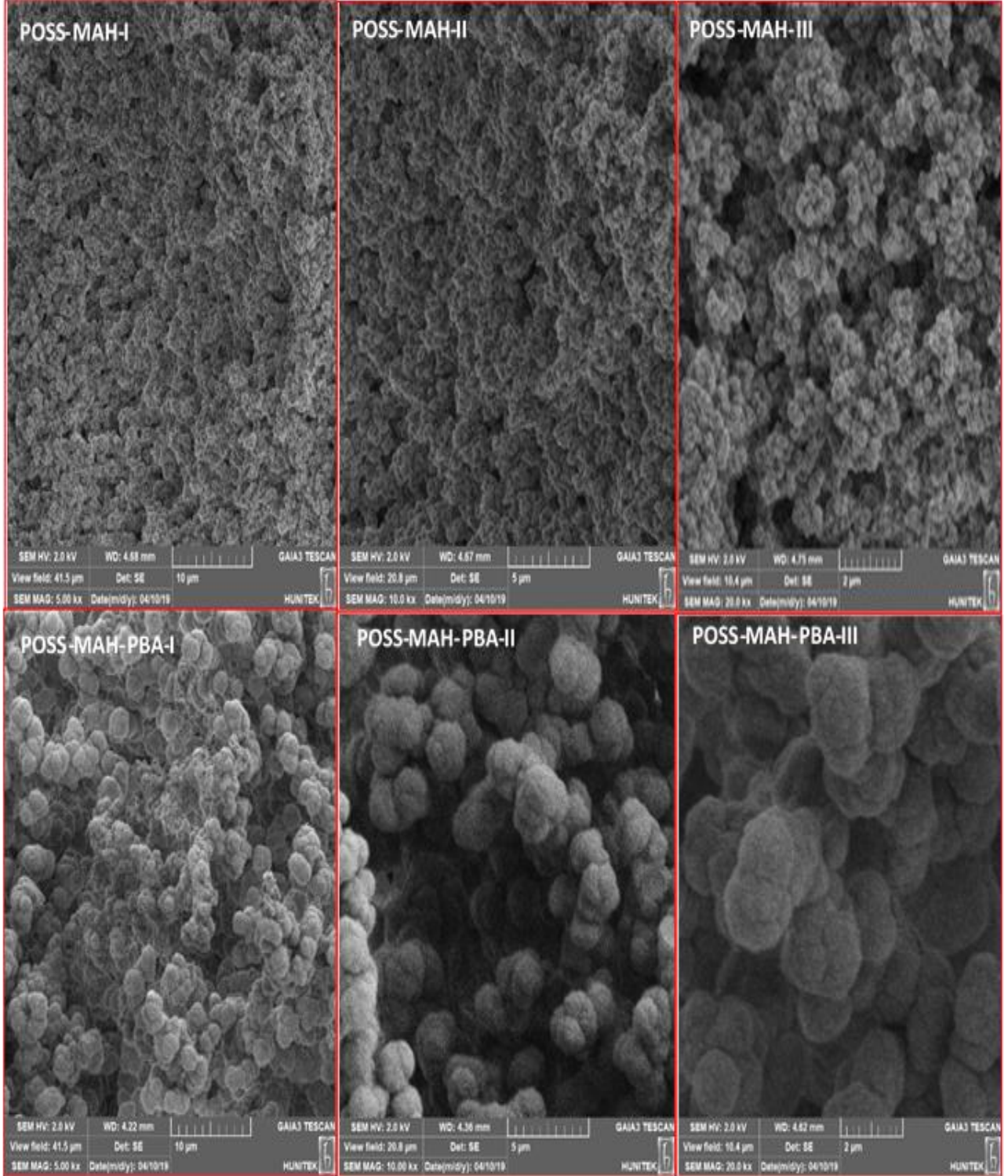
Kolon	%C	%H	%N	%B
[POSS-MAH-PBA]	48.6	6.08	2.3	5.4
[POSS-MAH]	47.8	6.04	2.5	-

4.1.4. SEM Sonuçları

4.1.4.1. POSS-MAH ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonların SEM görüntüleri

Nükleozid ayırımında sorbent olarak kullanılacak olan [POSS-MAH] ve PBA ile modifiye edilmiş [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonların SEM görüntüleri farklı büyütme oranlarında çekilmiştir. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonların 5000x, 10000x, 20000x büyütme oranlarında görüntüleri alınmış ve bu büyütme oranlarındaki görüntüler [POSS-MAH-I], [POSS-MAH-II], [POSS-MAH-III] ve [POSS-MAH-PBA]-I, [POSS-MAH-PBA]-II, [POSS-MAH-PBA]-III şeklinde kodlanmıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere monolitik yapıyı oluşturan polimerler küresel partiküllerden oluşmuştur. [POSS-MAH]

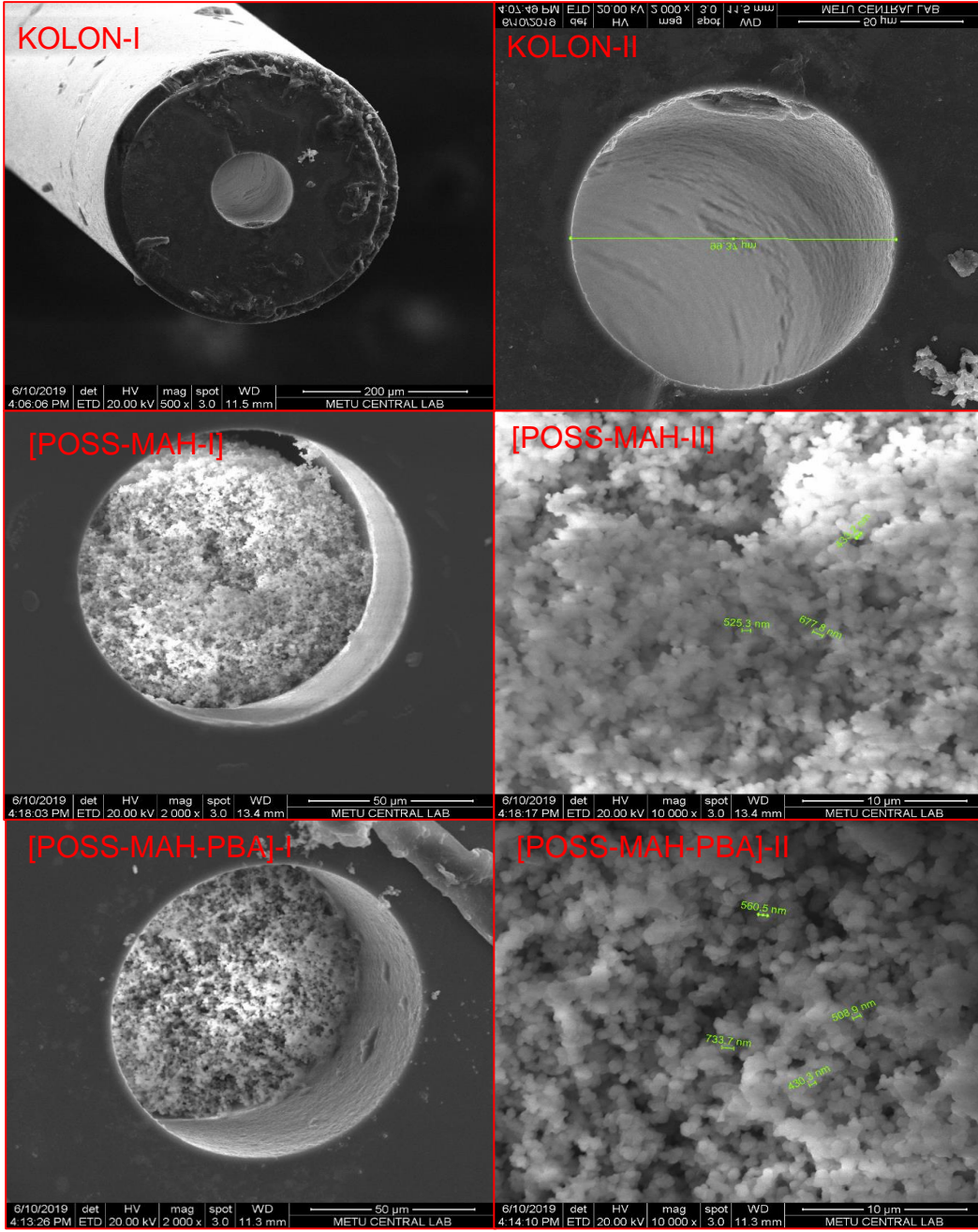
yapısını oluşturan küresel partiküller mikron altı boyutta olup büyüklüğü yaklaşık 500-600 nm düzeyindedir. PBA ile modifiye edildikten sonra elde edilen [POSS-MAH-PBA] yapısındaki küresel partiküllerin büyüklüğü artmış olup 600-700 nm boyutuna ulaştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlarına ait SEM görüntüleri.

4.1.4.2. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kapiler Kolonların SEM görüntüleri

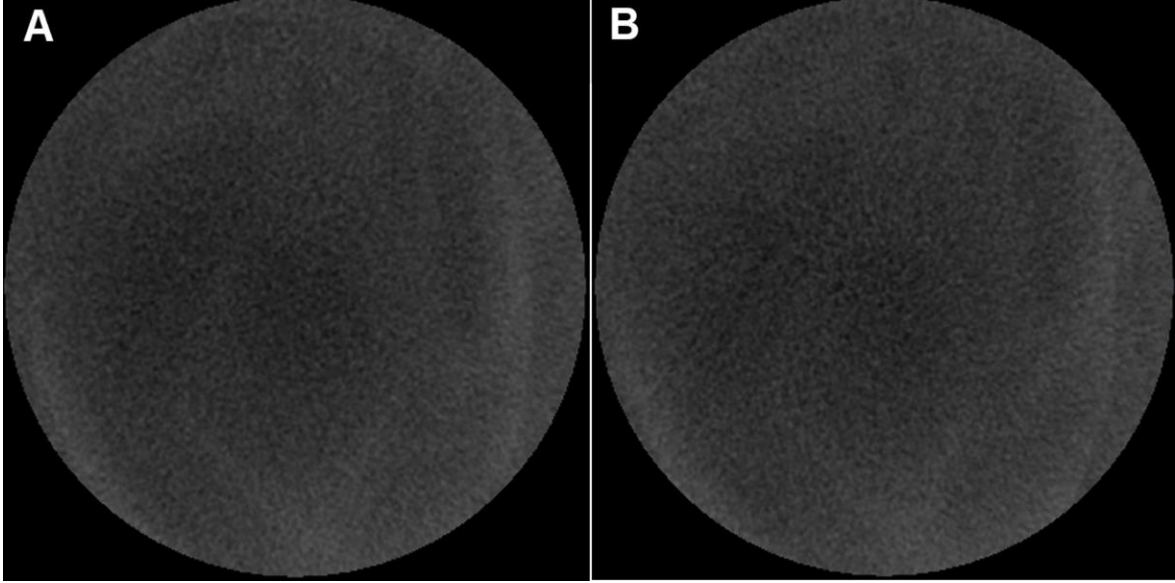
[POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kapiler kolonların görüntüleri 5000x, 10000x, 20000x büyütme oranları gibi farklı oranlarda alınmıştır. Polimer doldurulmadan önceki boş kolonlar x500 ve x2000 büyütme oranlarında görüntülenmiş KOLON I ve KOLON II olarak kodlanmıştır. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] kolonlar ise sırasıyla [POSS-MAH-I], [POSS-MAH-II] ve [POSS-MAH-PBA]-I, [POSS-MAH-PBA]-II olarak kodlanmıştır. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] kolonlar ise x2000 ve x10000 büyütme oranlarında görüntülenmiştir. Boş kolonların ve polimer dolgulı kolonların SEM görüntüleri incelendiğinde polimerik mikroküresel yapıların kolon duvarlarına tutunduğu görülmüştür. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere monolitik yapıyı oluşturan polimerler küresel partiküllerden oluşmuştur. [POSS-MAH] yapısını oluşturan küresel partiküller mikron altı boyutta olup büyüklüğü yaklaşık 500-600 nm düzeyindedir. PBA ile modifiye edildikten sonra elde edilen [POSS-MAH-PBA] yapısındaki küresel partiküllerin büyüklüğü artmış olup 600-700 nm boyutuna ulaştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kapiler kolonlara ait SEM görüntüleri.

4.1.5. Micro-CT Sonuçları

Micro-CT görüntüleme yöntemi X ışınları ile 2 boyutlu (2D) ve 3 boyutlu (3D) görüntü alma yöntemidir. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] polimerinin yapısına bakıldığında gözenekli yapının oluştuğu görülmekte olup PBA ile modifikasyondan sonra gözenek boyutunun küçüldüğü görülmektedir.



Şekil 4.5. [POSS-MAH] (A) ve [POSS-MAH-PBA] (B) boronat afinite monolitik kolonlara ait Micro-CT görüntüleri.

4.1.6. Yüzey Alanı Analizi Sonuçları

Spesifik yüzey alanı, ortalama gözenek çapı, toplam gözenek hacmi ölçüm değerleri BJH yöntemi ile hesaplanlanmıştır. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun ve POSS-MAH monolitik kolonun spesifik adsorpsiyon yüzey alanları sırası ile 507.60 ve 110.79 m²/g olarak tespit edilmiştir. PBA ile fonksiyonlandırılmış [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun dikkate değer atmış olan yüzey alanı, yüzeylerinde adenozin bağlayacak olan boronik asit fonksiyonel grup moleküllerinin oluşturduğu bağlanma bölgelerinin artmış olmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen yüksek yüzey alanı değerleri sayesinde [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir artış görülmüştür. PBA ile fonksiyonlandırılmış [POSS-MAH-PBA]

boronat afinite kolonun ve [POSS-MAH] monolitik kolonun spesifik yüzey alanları, ortalama gözenek çapları ve toplam gözenek hacimleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Afinite kolon	Yüzey alanı ^a (m ² /g)	Toplam gözenek hacmi ^b (cm ³ /g)	Ortalama gözenek çapı ^c (Å)
[POSS-MAH-PBA]	507.60	0.055388	21.374
[POSS-MAH]	110.79	0.001186	25.015

Çizelge 4.2. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite monolitik kolonların spesifik yüzey alanları, toplam gözenek hacimleri ve ortalama gözenek çapları.

^aÇok noktalı BET metodu ile tayin edilmiştir.

^b17.000-3.000.000 Å arasındaki gözeneklerin BJH kümülatif adsorpsiyon gözenek hacmi.

^cBJH adsorpsiyon ortalama gözenek çapı (4V/A).

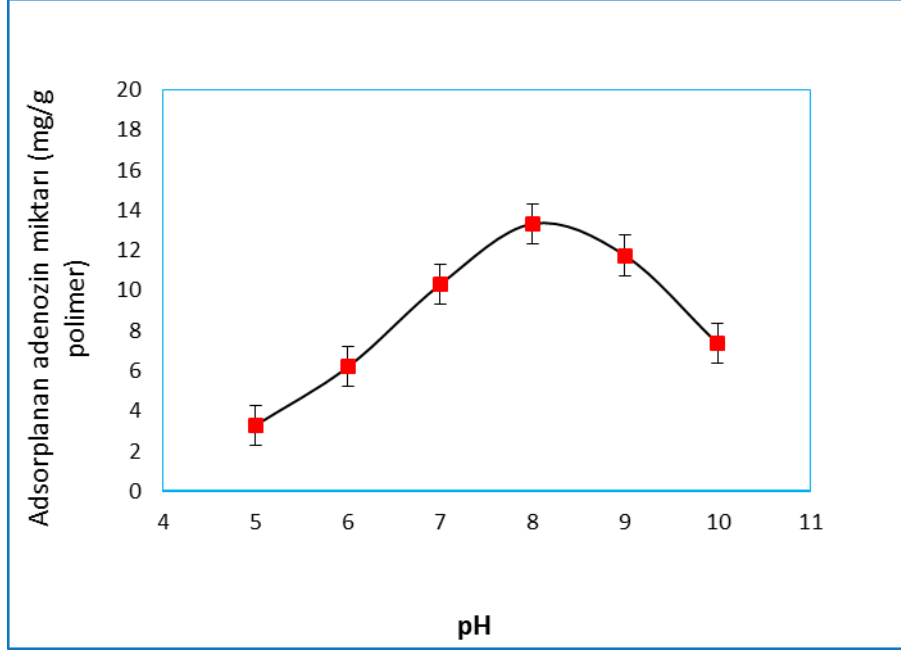
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1. pH'ın [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Boronat afine kolonu olarak hazırlanan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonunun fonksiyonel ligandı PBA ile adenozin nükleozidin cis-diol grupları arasındaki etkileşimi ve bu etkileşim sonucunda gerçekleşen kovalent bağ oluşumunu ortamın pH'ı belirler. Adsorpsiyon kapasitesine pH'ın etkisini incelemek adsorbent olarak kullanılan [POSS-MAH-PBA] kolon için pH 5.0-10 aralığında çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar 25°C sıcaklıkta 0.25 mg/ml adenozin derişiminde ölçülmüştür. Fenil boronik asite ait iyonlaşma sabiti pKa: 8.56 değerinde olduğundan düşük pH larda (pH<7) trigonal yapı halinde kaldığı gözlenmiştir. Düşük pH değerleri, idrar gibi pH değerleri düşük (pH: ~6) olan biyolojik sıvılarda yapılan analizler için uygun ortam sağlamasına rağmen trigonal yapıyı koruduğu için cis-diol grupları arasında etkin bir etkileşimin görülmesi beklenmez.

Şekil 4.6 incelendiğinde maksimum afinitenin ve adenozin adsorpsiyonun 13.32 mg/g olarak pH 8.0 de elde edildiği görülmüştür. Adenozin molekülü ile spesifik bağlanabilecek ligand olarak seçilen PBA'nın bağlanmaya etkisi de yine aynı pH değerlerinde incelenmiştir. Maksimum bağlanmanın tespit edildiği pH 8.0 değeri en uygun değer olarak kabul edilmiştir. Diğer parametrelerin incelendiği deneylerde pH 8.0 değerinde çalışılmıştır.

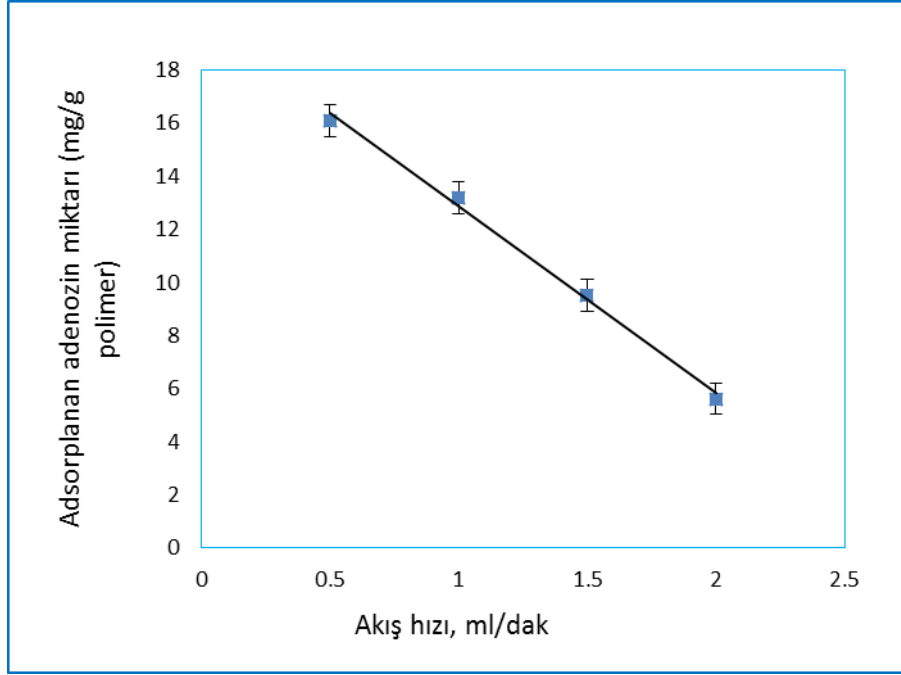
Adenozin molekülü ile spesifik bağlanabilecek ligand olarak seçilen PBA'nın bağlanmaya etkisi pH parametresi ile doğrulanmıştır. PBA içermeyen [POSS-MAH] monolitik kolonunda cis-diol grubu ile etkileşime girebilecek herhangi bir grup bulunmamaktadır. Ancak MAH üzerindeki Azot (N) molekülü ile nonspesifik etkileşim yapan adenozin molekülünün adsorplanma kapasitesi incelenmiş ve oldukça düşük 1.89 mg/g değeri elde edilmiştir. Bunun olası sebebi MAH molekülündeki histidin grubunun pKa değerinin 6.5 olması ve düşük pH değerinde iyonik etkileşimlerin gerçekleşmesi ancak artan pH ile azot üzerindeki hidrojen bağı yapabilme potansiyeli olan hidrojenin uzaklaşarak, adenozin üzerindeki hidroksil (-OH) gruplarının iyonlaşması sebebi ile (pKa: 3.6) hidrojen bağının azalmasıdır.



Şekil 6.6. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna pH etkisi. pH 5.0 10 mM asetat tamponu, pH 6.0-8.0 10 mM PB, pH 10 10 mM karbonat tamponu; Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml; akış hızı: 1 ml/dak; sıcaklık: 25°C; etkileşim süresi: 60 dak.

4.2.2. Akış Hızının [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Adsorpsiyonu etkileyen parametrelerden biri olan akış hızının adsorpsiyon kapasitesine etkisini incelemek için 0.25 mg/ml adenozin'in pH 8.0 de hazırlanmış çözeltisi, [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolondan sırası ile 0.5 ml/dak, 1.0 ml/dak, 1.5 ml/dak ve 2.0 ml/dak akış hızlarında geçirilmiş ve adsorbentin kapasitesi incelenmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde, akış hızı 0.5 ml/dak dan 2.0 ml/dak ya artırıldığında, adsorpsiyon kapasitesinin 16.08 mg/g dan 5.62 mg/g a azaldığı tespit edilmiştir. Bunun muhtemel sebebi, akış hızının artması ile adenozin molekülü ile [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonu arasındaki etkin etkileşim süresinin kısılmasıdır.

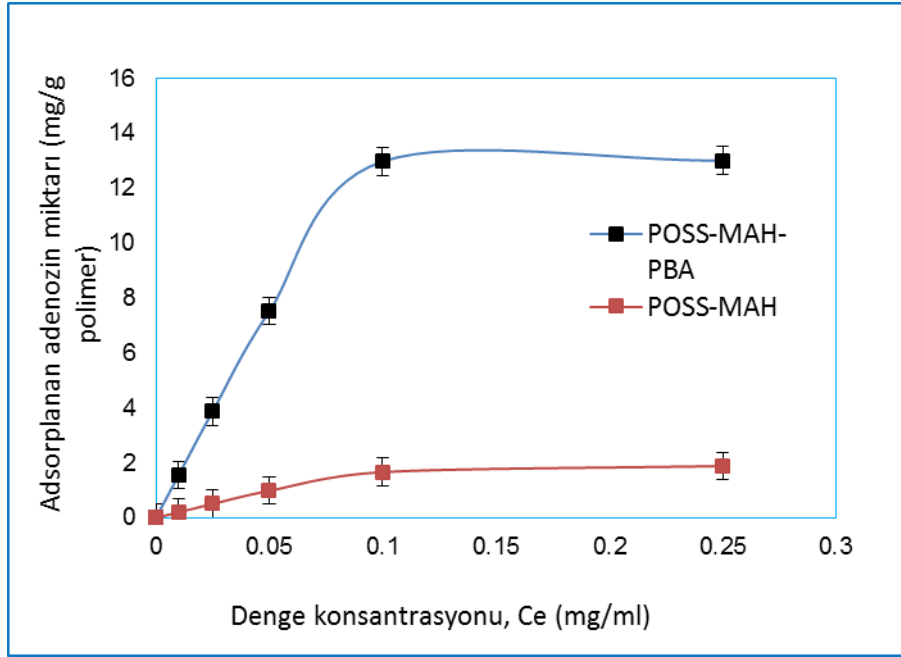


Şekil 4.7. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenosin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Akış hızı: 0.5-2.0 ml/dak; Adenosin derişimi: 0.25 mg/ml; pH 8.0 10 mM PB; sıcaklık: 25°C; etkileşim süresi: 60 dak.

4.2.3. Başlangıç Derişiminin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Adenosin molekülü ile spesifik bağlanabilecek ligand olarak seçilen PBA'nın bağlı olduğu, [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonu ve PBA bağlı olmayan [POSS-MAH] monolitik kolonlar için 0.01-0.25 mg/ml derişim aralığında hazırlanan adenosin çözeltileri kullanılmıştır. Başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi 25°C sıcaklıkta, 1 ml/dak akış hızında incelenmiştir. Şekil 4.9'de görüldüğü üzere, [POSS-MAH-PBA] ve [POSS-MAH] monolitik kolonlarının, pH 8.0 ortamında 0.25 mg/ml başlangıç derişiminde hazırlanan adenosin molekülü için tespit edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırası ile 13.01 ve 1.89 mg/g polimer şeklindedir. Adenosin derişiminin 0.01 den 0.25 mg/ml ye artması katı ve çözelti arasındaki derişim farkını artırmış, artan derişim farkı ise adenosin adsorpsiyonu için itici kuvvet oluşturarak adsorplanan adenosin miktarını artmıştır.

Adsorpsiyon miktarındaki artış miktarı, cis-diol grubu içeren bağlanma bölgelerine sahip PBA fonksiyonel ligandının bağlanma bölgelerinin dolması nedeniyle doygunluğa ulaşılmış, 0.1 mg/ml derişimden sonra dengeye ulaşmıştır.

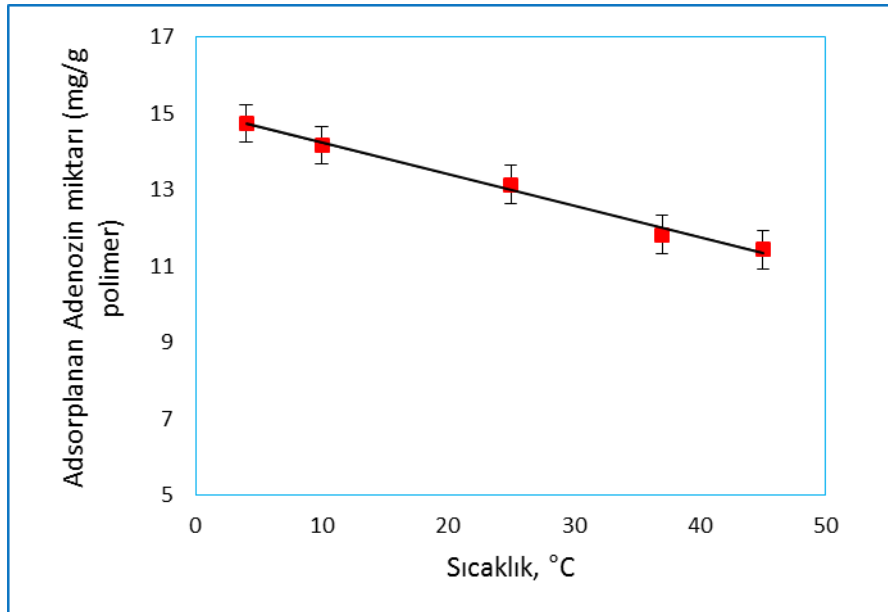


Şekil 4.8. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonunun adenozin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Adenozin derişimi: 0.01-0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.

4.2.4. Sıcaklığın [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

PBA immobilize [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonunun adenozin molekülünü adsorplama kapasitesine ortam sıcaklığının etkisi 4-45°C aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. pH 8.0 ortamında 0.25 mg/ml derişimde hazırlanan adenozin molekülü 4,10, 25 ve 45°C sıcaklıklarında, 1 ml/dak akış hızında [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanmıştır.

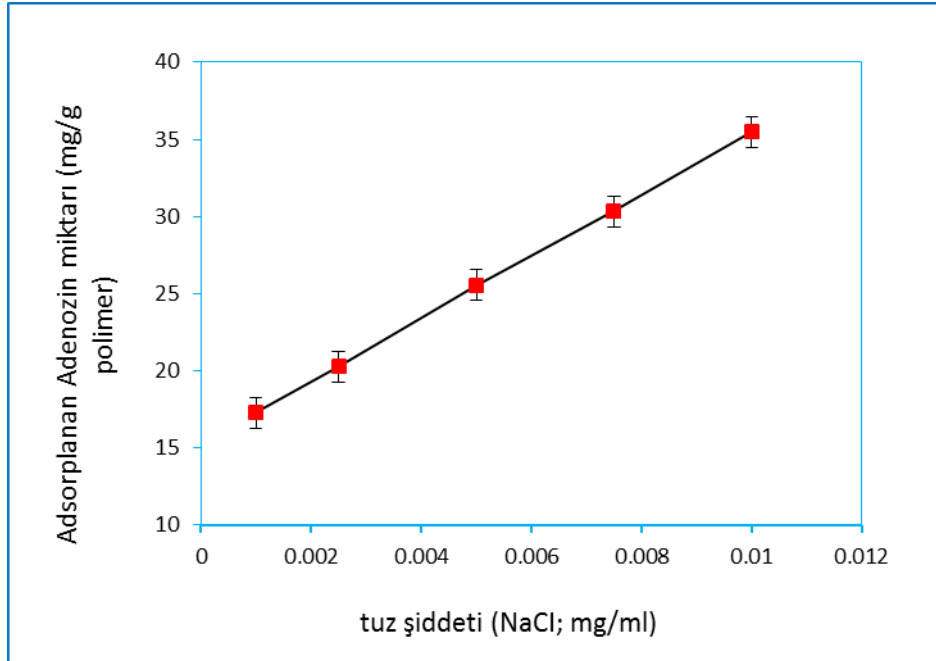
Sıcaklığın 4°C sıcaklıktan 45°C sıcaklığa artırılması ile, [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adsorpsiyon kapasitesi, 14.74 den 11.43 mg/g a azalmıştır. Şekilde görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonunun adenozin adsorpsiyon kapasitesinde düşüş gözlenmektedir. Artan sıcaklıkla, adsorpsiyon kapasitesinin azalması hidrojen bağlarının ve iyonik etkileşimlerin baskın olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca diğer bir muhtemel sebep, PBA halkasındaki boronat grubu ile, adenozin molekülü arasında oluşması beklenen tetrahedral kompleksin kararlılığının artan sıcaklıkla azalması ve bu kararsız durumun adsorpsiyon kapasitesinde azalmaya sebep olmasıdır. Artan sıcaklıkla birlikte adsorpsiyon kapasitesinde dramatik azalmanın görülmemesi PBA molekülündeki fenil halkası ile adenozin molekülünün adenin halkası arasındaki π - π etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.9. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Sıcaklık: 4-45°C, Adenozin derişimi: 0.01-0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.

4.2.5. İyonik Şiddetin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonunun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

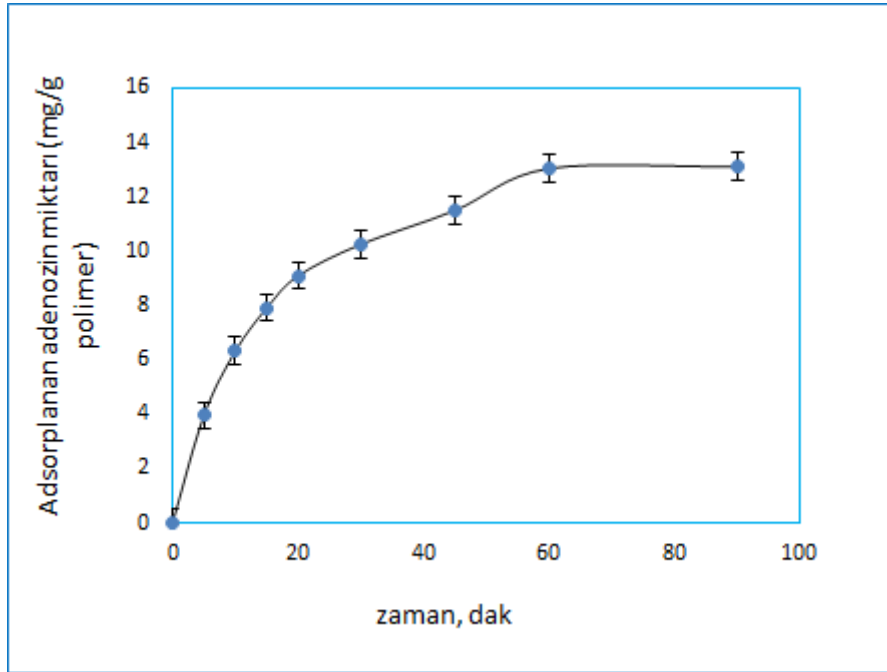
PBA immobilize [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonunun adenozin molekülünü adsorplamasına iyonik şiddetin etkisini incelemek için 0.001-0.01 mg/ml derişiminde NaCl içeren adenozin çözeltisi, pH 8.0 10 mM fosfat tamponu içeren ortamda 0.25 mg/ml derişimde hazırlanmış, 25°C sıcaklıkta, 1 ml/dak akış hızında [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanmıştır. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi iyonik şiddet arttıkça [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonunun adenozin adsorpsiyon kapasitesi de artarak 35.46 mg/g a çıkmıştır. Artan iyonik şiddetle, adsorpsiyon kapasitesinin artması PBA molekülündeki fenil halkası ile adenozin molekülünün imidazol halkası arasındaki hidrofobik etkileşimin arttığını göstermektedir. İyonik şiddetin artması katı-sıvı arasındaki elektriksel yük yoğunluğunun değişmesine neden olmuş böylelikle adsorpsiyon kapasitesini değiştirecek düzeyde etki göstermiştir.



Şekil 4.10. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. NaCl derişimi: 0.001-0.01 mg/ml; Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; 10 mM PB, akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.

4.2.6. Etkileşim Süresinin [POSS-MAH-PBA] Monolitik Kolonun Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

0.25 mg/ml derişimde pH 8.0 ortamında hazırlanmış olan adenozin [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanarak, etkileşim süresinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adsorpladığı adenozin miktarı belirli zaman aralıklarıyla 90 dakika boyunca ölçülerek tespit edilmiştir. Şekil 4.11 etkileşim süresinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini göstermektedir.



Şekil 4.11. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonuna etkileşim süresinin. Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; 10 mM PB, akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 0-90 dak.

4.3. Adsorpsiyon Modelleri

Adsorpsiyon izotermi, sabit sıcaklıkta çözelti konsantrasyonundan adsorbe edilen madde miktarını gösterir. Adsorpsiyon kapasitesi, adsorpsiyon izoterm modelleri kullanılarak belirlenir. Sıvı fazda adsorpsiyon işlemlerinin

modellenmesinde en yaygın kullanılan izotermier Freundlich ve Langmuir izoterm modelleridir [109].

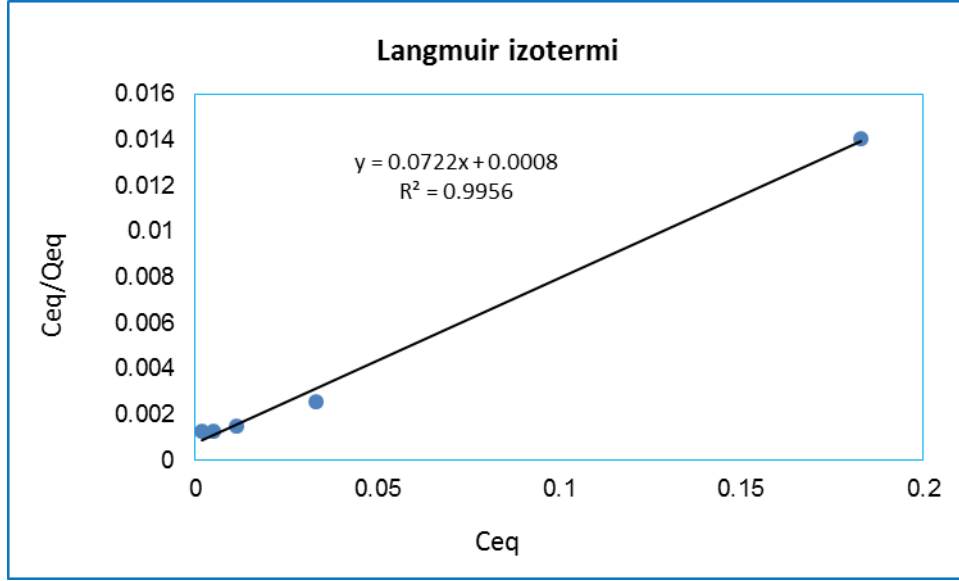
Adsorpsiyon izotermier, Freundlich ve Langmuir izoterm modelleri gibi izoterm modelleri temelinde deneysel sistemin tasarlanmasına, değerlendirilmesine ve deneysel veriler ile izoterm modelleri arasında sapma olup olmadığının anlaşılmasına yardımcı olur. Adsorpsiyon izotermier kullanılan adsorbent kapasitesini tanımlamaya yardımcı olmaktadır [109].

Langmuir modeline göre adsorpsiyon, adsorbentin aktif bölgelerinde düzgün bir şekilde gerçekleşir. Langmuir izoterm modeli, aşağıdaki formülle tanımlanmaktadır;

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

Yukarıdaki eşitlikte Q_{eq} dengede adsorplanmış madde miktarını (mg/g), C_{eq} dengedeki madde konsantrasyonunu, b Langmuir sabitini (ml/mg), Q_{maks} maksimum madde adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ifade etmektedir.

$1/C_{eq}$ değerine karşı $1/Q_{eq}$ grafiğinin eğimi $1/Q_{maks} \cdot b$ değerini vermektedir. Grafiğin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{maks}$ değerini vermektedir. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara adenozin adsorpsiyonu için elde edilen Langmuir İzotermi grafiği şekil 4.12'de verilmiştir.



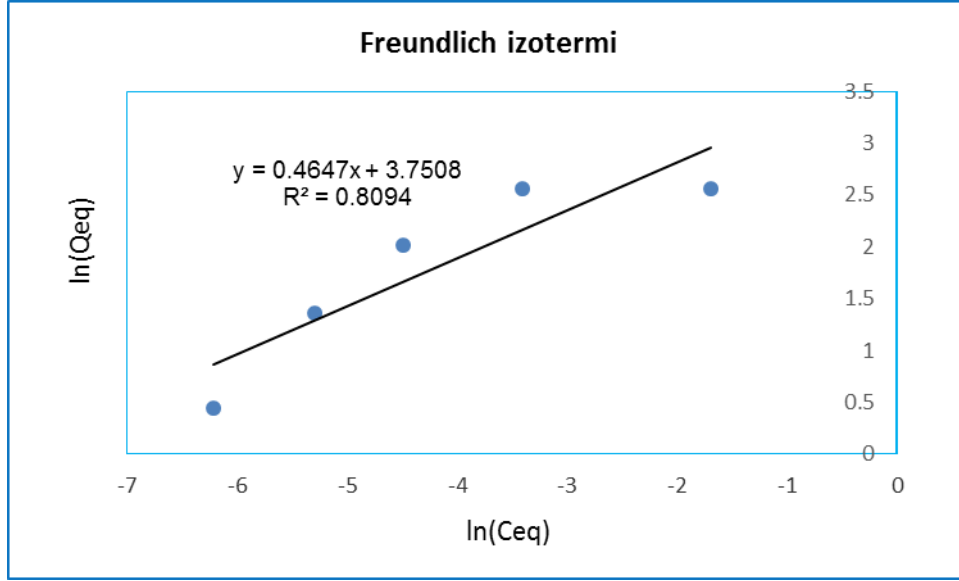
Şekil 4.12. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona ait Langmuir adsorpsiyon izotermi

Yapılan çalışmada, [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara maksimum adenozin adsorpsiyon kapasiteleri (Q_{max}) [POSS-MAH-PBA] için 13.85 mg/g ve [POSS-MAH] için 2.05 mg/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Langmuir korelasyon katsayıları hem [POSS-MAH] hem de [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlar için sırası ile $R^2:0.9956$ ve $R^2:0.9128$ şeklindedir. Sonuçlar, Langmuir adsorpsiyon modelinin daha uygun olduğunu göstermekte, diğer bir deyişle, PBA ligandı ile modifiye edilen monolitik kolonda adenozin için bağlanma bölgelerinin homojen dağıldığı, eş enerjili ve yanal etkileşimin olmadığını söylemek mümkündür.

Freundlich izotermi, heterojen bir yüzeye adsorpsiyona dayanan deneysel bir modeldir. Değişken özelliklere sahip yüzey, yani herhangi bir yüzey özelliği eşit olmayan bir şekilde dağılır, örneğin yüzey enerjisi belirli noktalarda farklıdır. Bu, ideal olmayan bir sorpsiyonun yanı sıra çok katmanlı bir adsorpsiyon prosesine uygulanabilir. Freundlich modeli aşağıdaki denkleme verilmiştir;

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + \left(\frac{1}{n}\right) \times (\ln C_{eq}) \quad \text{Eşitlik 4.3.}$$

Yukarıdaki eşitlikte K_f Freundlich afinite sabiti (mmol/g), $1/n$; Freundlich heterojenite faktörü, Q_{eq} absorpsiyon miktarını (mg/ml), C_{eq} denge konsantrasyonunu (mg/l) temsil etmektedir. Eşitlikteki $\ln Q_{eq}$ değerine karşı $\ln C_{eq}$ çizilen grafik K_f ve $1/n$ değerlerini vermektedir [109]. Şekil 4.13'te [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona ait Freundlich izotermi görülmektedir.



Şekil 4.13. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona ait Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Freundlich izoterminde yüzeyin heterojenliğini belirten K_f ve $1/n$ gibi iki önemli parametere bulunmaktadır. $1/n$, yüzey heterojenite indeksi olup, 1 değerine yaklaşması sistemin homojenliğini vurgularken, n değerinin sıfıra yaklaşması heterojenliğe vurgu yapmaktadır. Çizelge 4.3 incelendiğinde, hazırlanan [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun [POSS-MAH] kolona göre homojen bağlanma bölgelerine sahip olduğu verilen n değerinden anlaşılmaktadır. Adenozin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon değerleri ve korelasyon katsayıları incelendiğinde adsorpsiyonun çok katmanlı olmadığı tespit edilmiştir [110].

Çizelge 4.3. Adenozin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon değerleri ve korelasyon katsayıları.

Afinite kolon	Q _{deneysel} (mg/g)	Langmuir İzotermi Sabitleri			Freundlich İzotermi Sabitleri		
		Q _{max} (mg/g)	b (ml/mg)	R ²	K _f	1/n	R ²
[POSS-MAH-PBA]	13.01	13.85	90.57	0.9956	1.59	0.26	0.8094
[POSS-MAH]	1.89	2.05	17.88	0.9128	1.75	0.11	0.9536

4.4. Kinetik Çalışmalar

Kinetik denklemler kimyasal reaksiyonlarda reaksiyon hızının ortamdaki maddelerin konsantrasyonlarına bağlı olduğunu gösteren eşitliklerdir. Bu denklemlerin sonuçları deneysel olarak elde edilen verilerle bulunmaktadır. Adsorpsiyon kinetiği çalışmaları reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmaları için önemli bilgiler sağlarlar.

Adsorpsiyon kinetiği adsorpsiyon işleminin derecesini genel olarak belirlemeye yardımcı olur. Bu işlemin mekanizması kinetik denklemlerle, örneği sıfır, birinci ve ikinci dereceden, yalancı birinci ya da yalancı ikinci dereceden araştırılır [110,111]. Bu tez çalışması kapsamında, yalancı birinci dereceden ve yalancı ikinci dereceden adsorpsiyon kinetiği denklemleri kullanılarak adsorpsiyonun kinetiği açıklanmaya çalışılmıştır. Yalancı birinci derece kinetik modelinin denklemi Eşitlik 4.3 te verilmiştir;

$$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t})$$

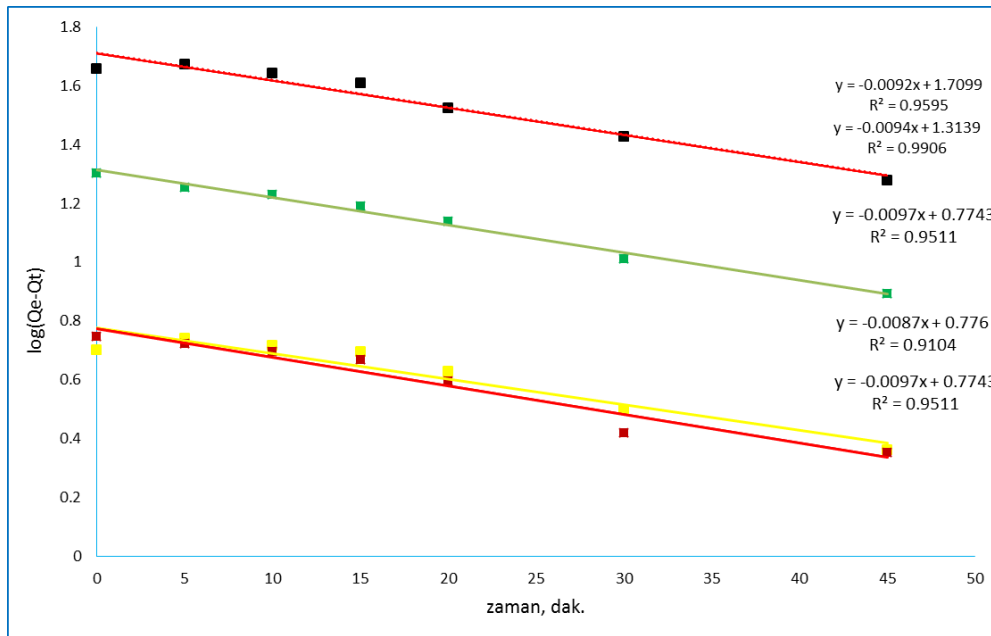
Eşitlik 4.3.

Yukarıdaki eşitlikte k_1 (dak⁻¹) yalancı birinci dereceden hız sabiti; q_e (mmol/g) denge adsorpsiyon kapasitesini, q_t (mmol/g) t anındaki adsorpsiyon kapasitesini

temsil etmektedir [109]. Sınır koşulları $t = 0, Q_t = 0$ ve $t = t, Q_t = Q_e$ olarak kabul edildikten sonra eşitliğin integrali alındığında Eşitlik 4.4 elde edilmektedir;

$$\log(Q_e - Q_t) = \log(Q_e) - \left(\frac{k_1 x t}{(2.303)} \right) \quad \text{Eşitlik 4.4.}$$

Kinetik çalışmalarda zamana (t) karşı $\log Q_e$ değerine çizilen grafik eğiminin doğrusallığı kinetik modelinin uygunluğunu gösterir. Şekil 4.14'te [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonu için yalancı birinci dereceden adsorpsiyon kinetiğinin grafiği gösterilmektedir.



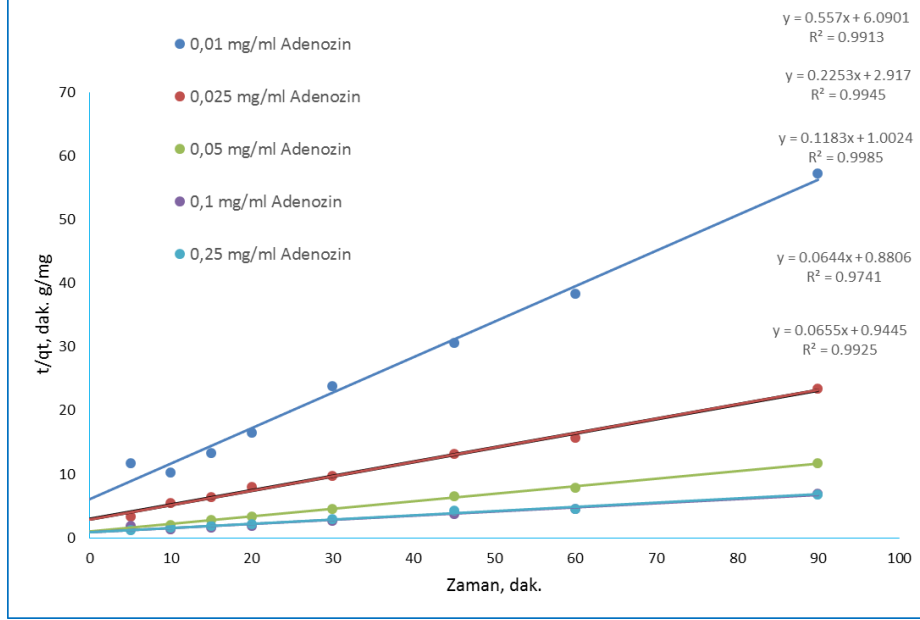
Şekil 4.14. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon için yalancı birinci derece grafiği. pH 8.0, 10 mM fosfat tamponu; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dakika; sıcaklık: 25°C.

Yalancı ikinci dereceden integre edilmiş kinetik model eşitliği aşağıdaki gibidir;

$$\left(\frac{t}{Q_t} \right) = 1/k_2 \times Q_e + \left(1/Q_e \right) \times t \quad \text{Eşitlik 4.5}$$

Yukarıdaki eşitlikte k_2 (dak^{-1}) yalancı ikinci dereceden hız sabitini; q_e (mg/g) adsorpsiyon kapasitesini, q_t ise t anındaki adsorpsiyon kapasitesini temsil

etmektedir [109]. Şekil 4.15'te [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon için yalnız ikinci derece grafiği gösterilmektedir.



Şekil 4.15. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon için yalnız ikinci derece grafiği. pH 8.0, 10 mM fosfat tamponu; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi 60 dakika; sıcaklık: 25°C.

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenozin adsorpsiyonu için, yalnız birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri çizelge 4.4'te verilmektedir. Sonuçlara göre, [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon kullanılarak, adenozinin sulu çözeltiden adsorpsiyonu ikinci derece kinetik modeli ile uygunluk göstermektedir. Adenozin molekülünün cis-diol grupları ile fenil boronik asitin -OH grupları arasındaki etkileşim kovalent bağ oluşumuna dayanmakta olup kimyasal kontrolü beraberinde getirmektedir. Ayrıca, elektrostatik, hidrofobik ve π - π etkileşimleri kimyasal kontrole katkı sağlamaktadır.

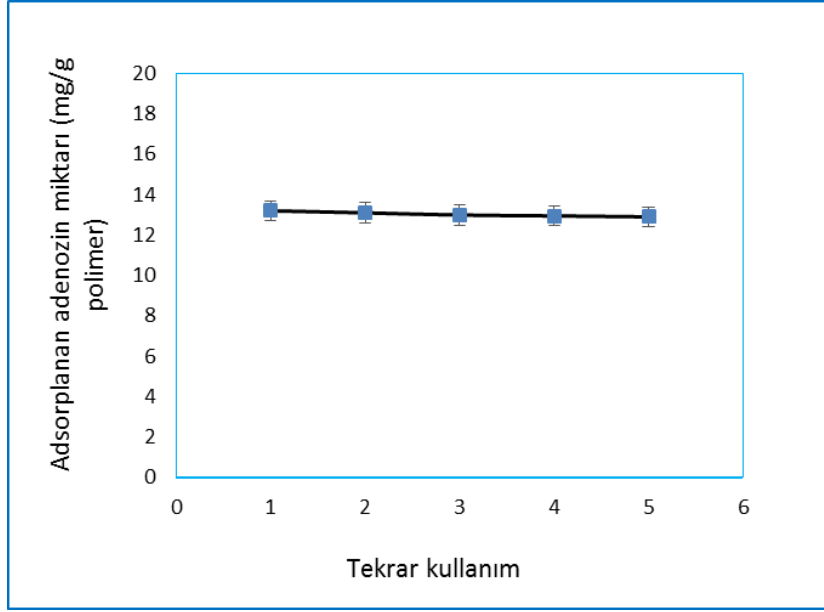
Çizelge 4.4. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.

Afinite kolon	Yalancı birinci derece				Yalancı ikinci derece		
	Q_{deneysel} (mg/g)	Q_{eq} (mg/g)	k_1 (1/dak.)	R^2	Q_{eq}	k_2 (g/mg.dak.)	R^2
[POSS-MAH-PBA]	13.01	5.94	0.0223	0.9511	15.26	0.0655	0.9925
[POSS-MAH]	1.89	0.65	0.0031	0.9765	1.75	0.0020	0.9536

4.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara adenozin adsorpsiyonu sürekli sistemde incelenmiştir. pH 8.0 10 mM PB'de 0.25 mg/ml derişimde hazırlanan adenozin çözeltisi 1.0 ml/dak akış hızında, 60 dak süresince [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon ile etkileşime sokulmuş, adenozin adsorpsiyonu gerçekleşen [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun desorpsiyonu için desorpsiyon çözeltisi olarak 25 mM formik asit ve metanol çözeltisi karışımı (1:1, v/v) kullanılmıştır. 30 dakika uygulanan desorpsiyon çözeltisi içindeki desorbe edilen adenozin miktarı 260 nm dalgaboyunda UV ile ölçülmüştür.

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlara adenozin adsorpsiyonu tekrarlanabilirlik çalışmaları, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı monolitik afinite kolon ile 5 defa tekrar edilerek gerçekleştirilmiştir. Her döngüde [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonlar pH 8.0 10 mM fosfat tamponu ile 20 dak dengelenmiş ve kolon rejenere edilmiştir. 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adsorplama kapasitesinde kayda değer azalma olmadığı tespit edilmiş ve kapasite oranı %98.40 olarak belirlenmiştir. Yüksek desorpsiyon oranı (ortalama %96.48) tekrar kullanım ile [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonların adsorplama özelliğini kaybetmediğini göstermektedir.



Şekil 4.16. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonların tekrar kullanımı. Adenozin derişimi: 0.25 mg/ml, pH 8.0 10 mM PB; sıcaklık: 25°C; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.

4.6. Seçicilik Çalışmaları

Dağılım ve seçicilik katsayılarının hesaplanması PBA molekülleri ile cis-diol içeren adenozin molekülü arasındaki seçici etkileşimi belirlemenin en güvenilir yoludur. Dağılım katsayısı; denge durumunda [POSS-MAH-PBA] boronat afinite ve [POSS-MAH] monolitik kolona bağlı bulunan adsorplanan madde miktarının sıvı fazda kalan miktarına oranlanmasıdır. Seçicilik katsayısı ise [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona bağlı maddenin dağılım katsayısının PBA içermeyen POSS-MAH haline oranıdır. Analitin iki fazdaki derişimini bulabilmek için adsorpsiyon hesaplamalarında oldukça önemli bir nicelik olan dağılım oranı hesaplanmıştır. Ayrıca dağılım oranı polimerin sıvı faza oranı değiştiği zaman madde dağılımının nasıl değişeceğini gösteren bir parametredir. Spesifik bağlanmanın gerçekleşmesi hedef molekül ve bu molekülü adsorbe eden polimerin arasında seçici bağlanma olduğunun bir göstergesidir.

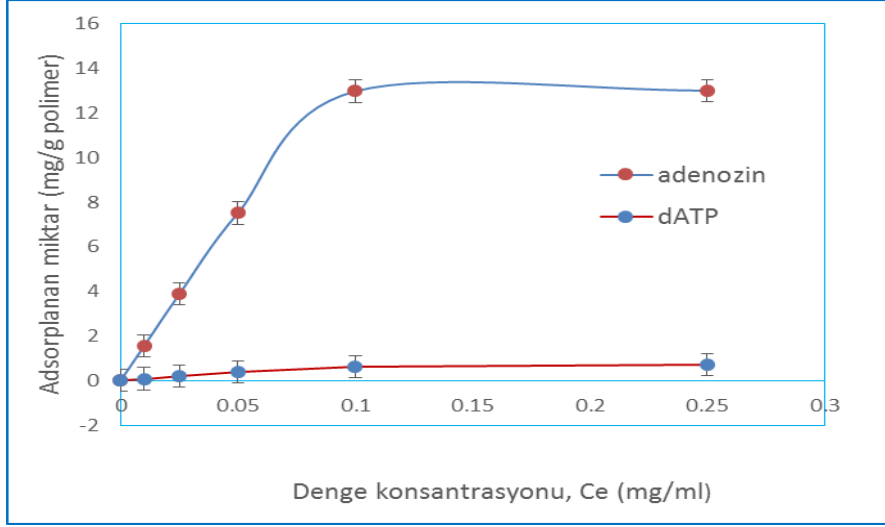
Adenozinin [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona seçici olarak bağlanmasını belirlemek için cis-diol grubu içermeyen ancak adenozine yapısal olarak benzeyen dATP molekülleri seçilerek yarışmacı moleküller olarak kullanılmışlardır.

Çizelge 4.5. Adenozin ve dATP molekülleri için K_d , K ve K' değerleri

	[POSS-MAH-PBA]		[POSS-MAH]		K'
	K_d	K	K_d	K	
Adenozin	21.97	-	15.30	-	-
dATP	5.49	4.00	16.11	0.94	4.25

Adsorpsiyon ortamlarındaki bu moleküllerin derişimleri seçicilik için 0.25 mg/mL olarak tutulmuştur (pH 8.0 10 mM fosfat tamponu; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25 °C). Çizelge 4.5'te adenozin ve dATP, moleküllerinin [POSS-MAH-PBA] ve [POSS-MAH] monolitik kolonlarında dağılımı, seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları (K_d , K ve K' değerleri) görülmektedir. Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda, [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonun benzer moleküller varlığında adenozin molekülü için tespit edilen seçicilik katsayısı (K) değerinin, PBA içermeyen [POSS-MAH] monolitik kolonun adenozin için seçicilik katsayısı değerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Seçicilik katsayısı adenozin molekülünün cis-diol aktif bağlanma bölgelerinin cis diol içermeyen dATP göre seçici bağlanma değerini ifade etmektedir. Bu değere göre, PBA bağı monolitik kolonun adenozin seçiciliği dATP moleküllerine göre 4 kat fazla olduğu görülmüştür. Bağıl seçicilik katsayıları kıyaslandığında [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adenozin için [POSS-MAH] monolitik kolona göre 4.25 kat daha seçici olduğu görülmektedir. Şekil 4.17'de POSS-MAH-PBA monolitik kolonun adenozin ve dATP için seçici adsorpsiyon çalışması grafiksel olarak gösterilmektedir.



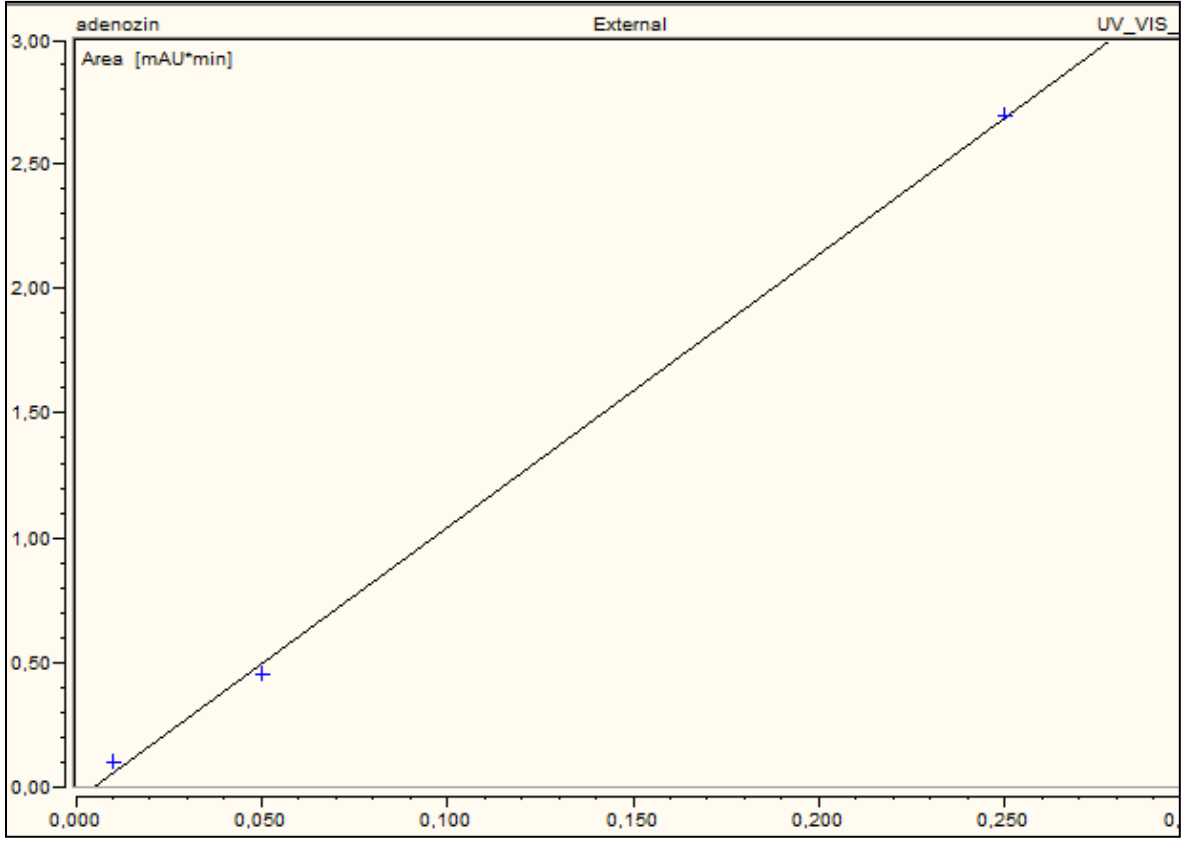
Şekil 4.17. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenosin ve dATP için seçici adsorpsiyon çalışması. Adenosin, dATP derişimi: 0.25 mg/ml, pH: 8.0; akış hızı: 1 ml/dak; etkileşim süresi: 60 dak.

4.7. Yapay İdrardan Nükleozid Tayini

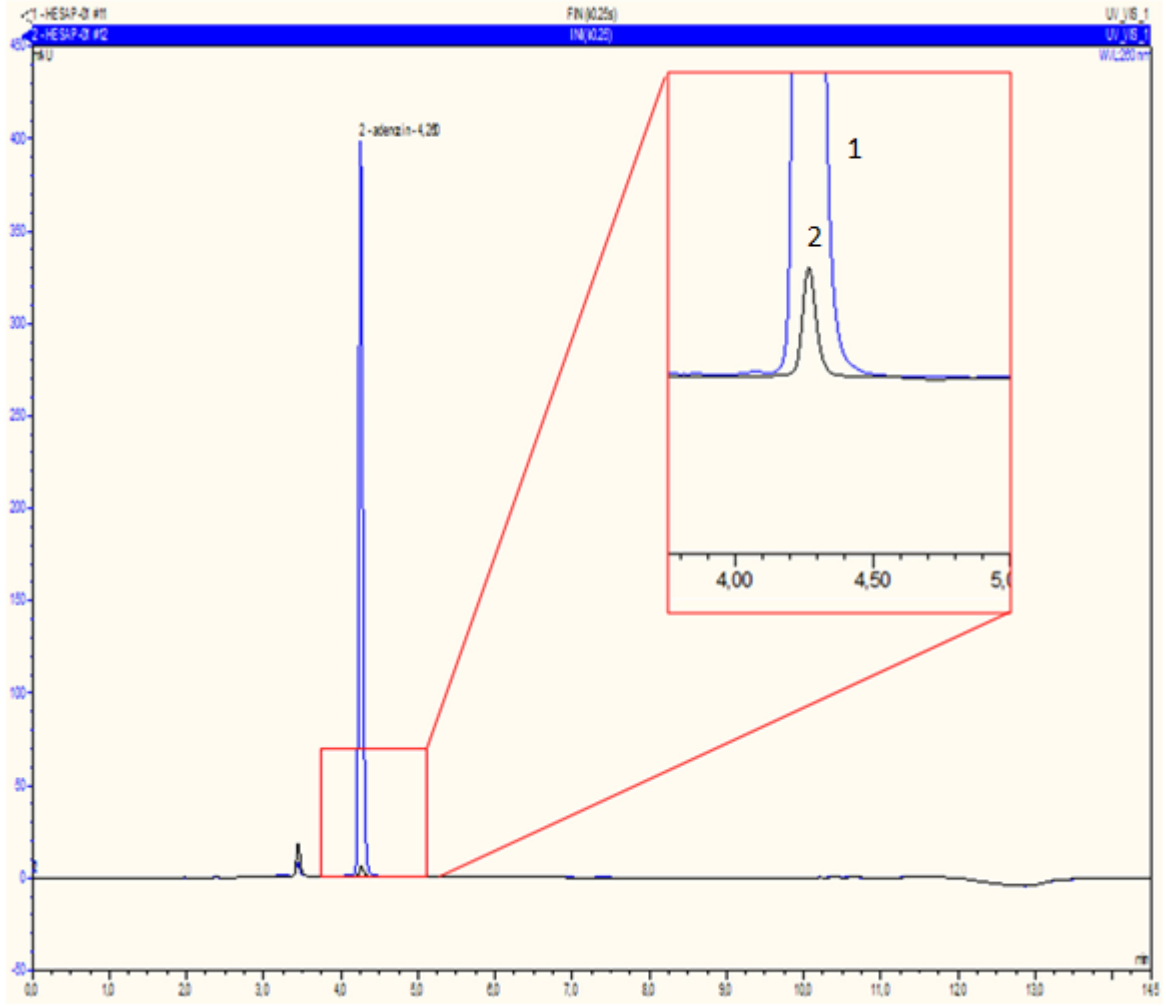
Hazırlanan [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun yapay idrardan adenosin molekülüne seçici bir şekilde bağlanabildiğini tespit edebilmek için 0.25 mg/ml adenosin spike edilmiş idrar örneği kolona uygulanmıştır. Adsorbe olan adenosin miktarı UV-VIS spektroskopi ile 260 nm dalgaboyu'nda ölçülmüştür. Adenosin spike edilmiş idrar çözeltisinin içerdiği adenosin miktarı 10.05 mg/g olarak tespit edilmiştir. Gözlenen göreceli düşük adsorpsiyon değeri ortamdaki hem sterik etki yaratabilecek hemde yarışmacı molekül olabilecek grupların fazlalığından kaynaklanabilir. Daha sonra ise adsorbe olan adenosin molekülü HPLC metodu ile doğrulanmıştır. Kalibrasyon çözeltisi olarak farklı derişimlerde hazırlanan (0.005, 0.05, 0.01 mg/ml) adenosin çözeltileri kullanılmış ve 260 nm de dalgaboyu'nda ölçümler yapılmıştır. HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kullanılan kolon C18 polar (Fusion-RP) kolonu olup polar moleküller bağlanarak füzyonlanmış terz faz kolonu oluşturulmuştur. Şekil 4.18 adenosine ait kalibrasyon grafiğini göstermektedir.

Başlangıç ve final çözeltilerinin içerdiği adenozin molekölü HPLC ile tespit edilmiştir. Final çözeltilisinin vermiş olduğu pikin şiddeti başlangıç çözeltilisinin vermiş olduğu pikin şiddetinden daha az olduğu görölmüş, [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adenezine bağlandığı tespit edilmiştir. Şekil 4.18 POSS-MAH-PBA boronat afinite kolona uygulamadan önceki (1) ve afinite kolona uygulandıktan sonra çözeltide kalan adenezine ait (2) sinyalleri göstermektedir.

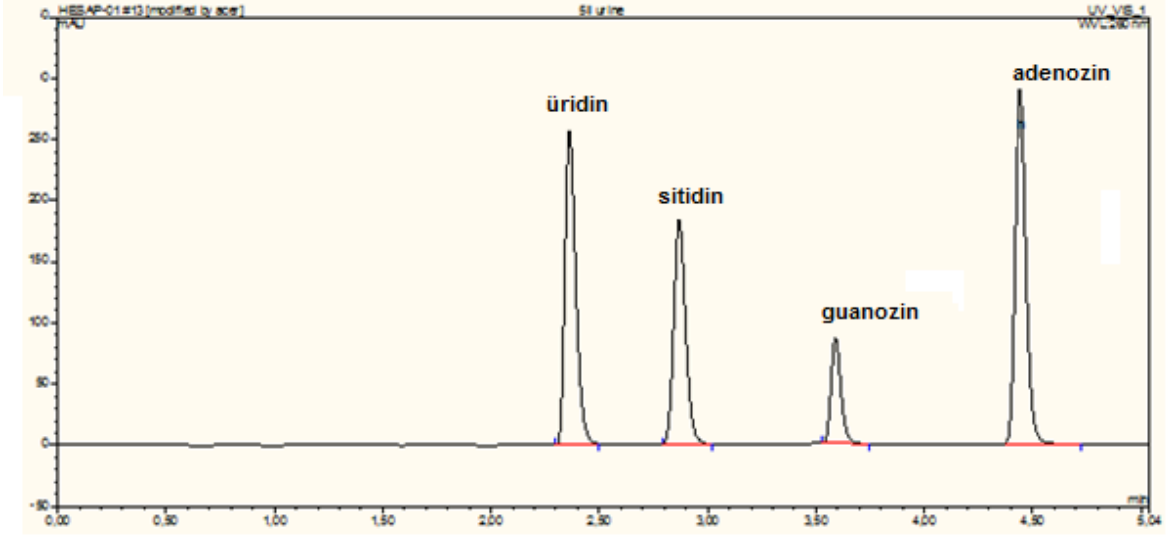
[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolona idrarda bulunan nükleozidlerin adsorpsiyonu çalışmaları için 0.25 mg/ml nükleozid spike edilmiş örnek desorbe edildikten sonra HPLC sisteminde incelenmiştir. HPLC kromatogramları incelendiğinde desorbe edilen nükleozidlerin dördünün de sinyal vermesi ve sinyallerin şiddeti incelendiğinde [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun grup spesifik olarak nükleozidlere bağlandığı tespit edilmiştir. Şekil 4.19. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanan nükleozid içeren yapay idrar örneğinin desorbe edildikten sonra HPLC sisteminde tayinini göstermektedir.



Şekil 4.18. Adenozine ait kalibrasyon grafiği. Adenozin konsantrasyonu: 0.005, 0.05, 0.01 mg/ml. Dalga boyu: 260 nm, mobil faz: A: 20 mM Amonyum Asetat, B: Asetonitril, 20 mM Amonyum Asetat (95:5, v/v).



Şekil 4.19. POSS-MAH-PBA monolitik kolona uygulanan adenosin içeren yapay idrar örneğinin HPLC sisteminde tayini. uygulanan adenosin konsantrasyonu: 0.25 mg/ml. sıcaklık: 25°C; 1 numaralı sinyal: afinite kolona uygulamadan önceki; 2 numaralı sinyal afinite kolona uygulandıktan sonra çözeltide kalan adenosin miktarı.

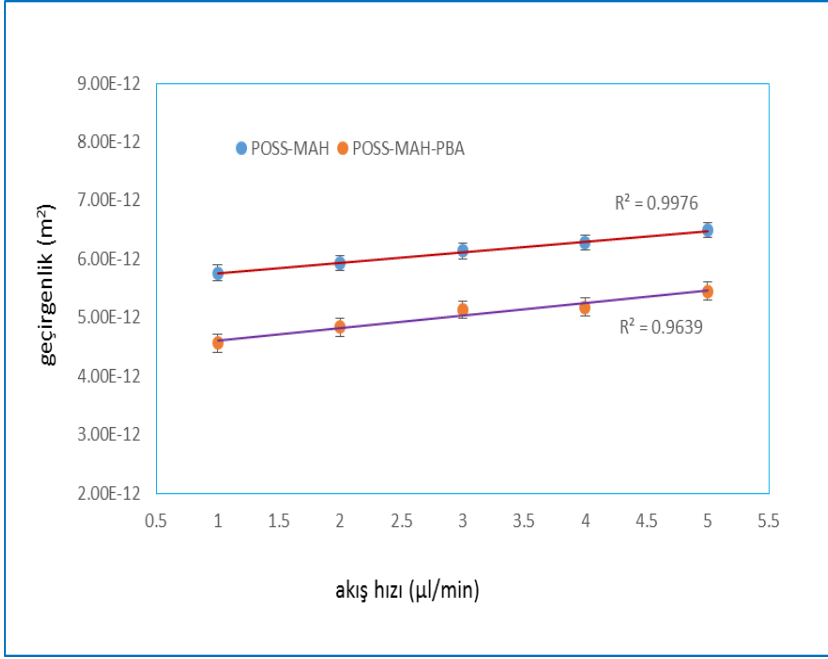


Şekil 4.20. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanan nükleozidleri içeren yapay idrar örneğinin HPLC sisteminde tayini. Uygulanan nükleozid konsantrasyonu: 0.25 mg/ml, sıcaklık: 25°C.

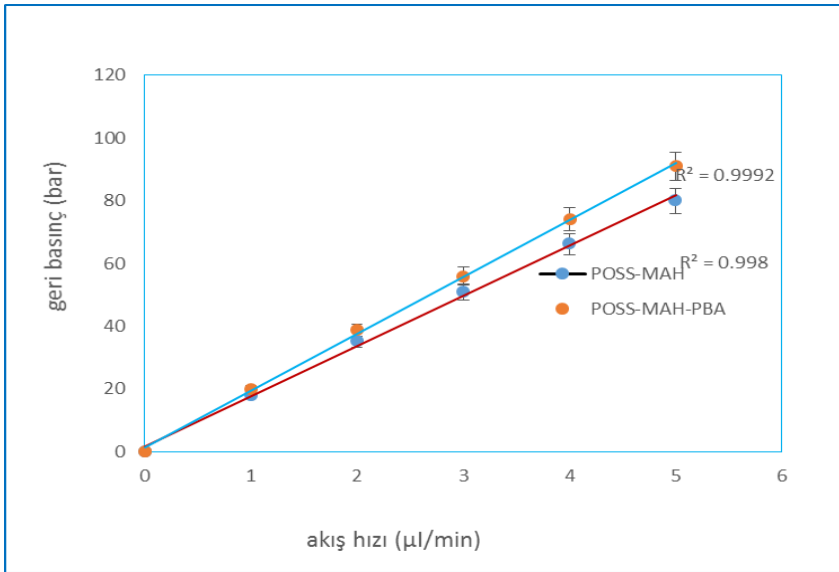
4.8. Kapiler Elektrokromatografi Çalışmaları

4.8.1. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] ile Nükleozid Tayini

Nükleozidlerin adsorpsiyonuna yönelik sentezlenen [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kapiler kolonun performansı alkil benzenlerin (ABs) elektrokromatografik ayırımı ile gerçekleştirildi. Bunun için alkil benzenlerin ve alıkonmayan işaretleyici tiyürenin (THA) mobil fazdaki çözeltileri hazırlanan CEC kolonuna uygulandı. Şekil 4.21 AB'lerin CEC sisteminde elektrokromatografik ayırımını göstermektedir. En hidrofobik alkil benzen olan pentil benzen en uzun elüsyon zamanına sahiptir. Bu hidrofobik etkileşimlerin baskın olduğunu göstermektedir. [POSS-MAH] monolitik kolonu PBA ile modifiye edildikten sonra PBA'dan kaynaklanan hidrofobisite arttığı için geçirgenlik azalmış geri basınç değerleri artmıştır. Şekil 4.20 [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlara ait a) geçirgenlik ve b) geri basınç grafiğini göstermektedir. Şekil 4.21 ise [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun alkil benzenleri elektrokromatografik ayırım grafiğini göstermektedir.

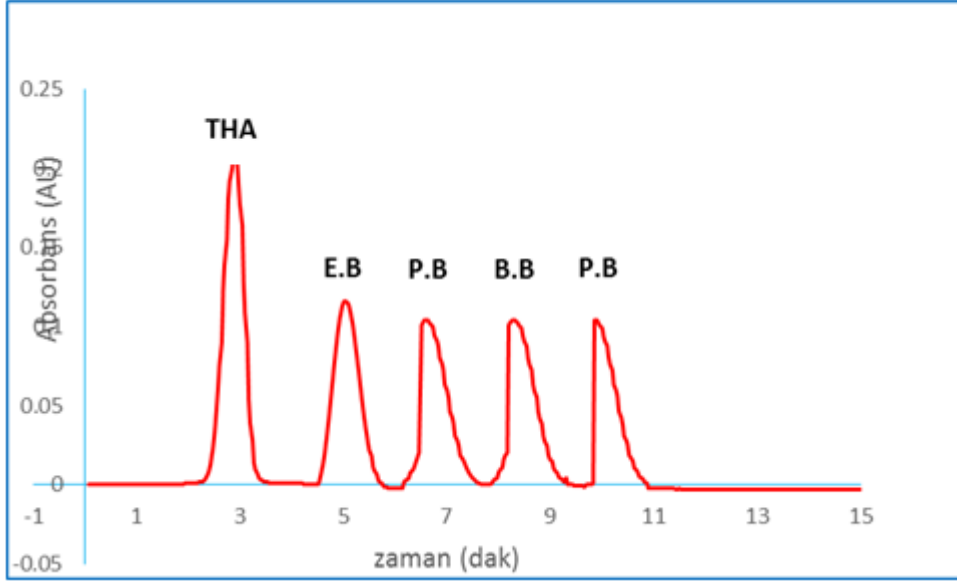


(a)



(b)

Şekil 4.21. [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonlara ait a) geçirgenlik b) geri basınç grafiği.



Şekil 4.22. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun alkil benzenleri CEC sisteminde ayırma performansı Hareketli faz, %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); injeksiyon, 5 kV 5 s; dalgaboyu, 260 nm. pik sırası, (THA)-tiyoüre, (E.B) etil benzen (P.B) propil benzen (B.B) bütül benzen, (P.B) pentil benzen.

Kolon üretim tekrarlanabilirlik işlemi seçilen AB'lerin alıkonma zamanlarının %RSD değerleri incelendiğinde $\%RSD < 1.5$ olması kolon üretiminin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Çizelge 4.6: [POSS-MAH-PBA] boronat monolitik afinite kolonların performanslarının alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin CEC sisteminde tespit edilerek tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesini göstermektedir.

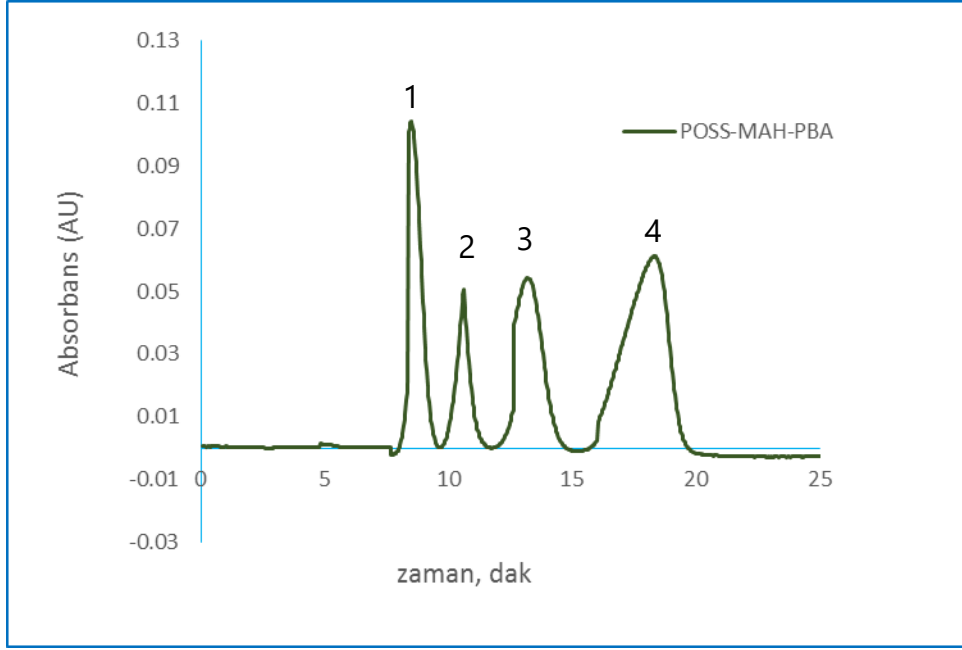
Çizelge 4.6. [POSS-MAH-PBA] monolitik boronat afinite kolonların performanslarının alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin CEC sisteminde tespit edilerek tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

[POSS-MAH-PBA]						
t_R (ort), dk (%RSD)						

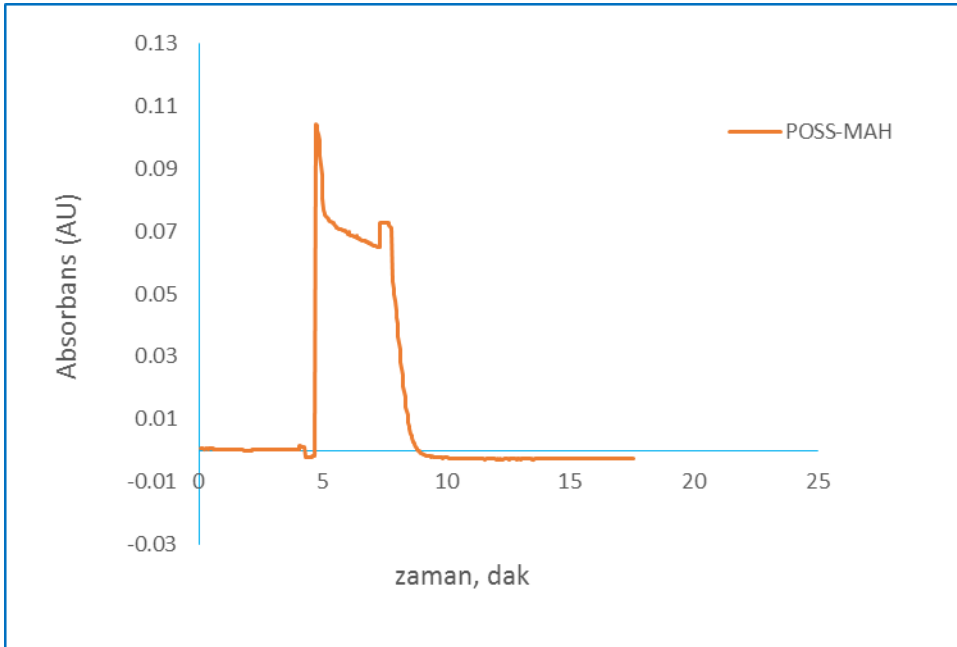
Seri	Monolitik Kolon	Tiyüre	Etil Benzen	Propil benzen	Bütil benzen	Pentil benzen
1	Kolon 1	2.93 (1.11)	5.02 (0.95)	6.63 (1.13)	8.42 (1.16)	9.92 (0.95)
2	Kolon 1	2.95 (1.39)	5.07 (0.95)	6.66 (1.11)	8.44 (1.17)	9.88 (0.95)
3	Kolon 1	2.98 (1.23)	5.00 (0.94)	6.65 (1.14)	8.41 (1.14)	9.93 (0.94)
ortalama	9	2.95 (1.32)	5.03 (0.94)	6.64 (1.12)	8.42 (1.15)	9.94 (0.94)

Nükleozidlerin CEC sisteminde ayırımını incelemek için örnekler [POSS-MAH-PBA] ve [POSS-MAH] kolonlara 5 kV akım ile 30 s boyunca yüklenmiştir. %50 ACN ve %50 fosfat tamponu (10 mM PB, pH 8.0) içeren mobil faz karışımı analiz boyunca kolonlara uygulanarak analiz 10 kV'ta gerçekleştirilmiştir.

[POSS-MAH-PBA] kolonda nükleozidlerin ayrımı gerçekleşirken POSS-MAH kolonda etkin ayırım görülmemiştir. Şekil 4.22 ve 4.23'te [POSS-MAH-PBA] ve [POSS-MAH] tarafından gerçekleştirilmeye çalışılan nükleozidlerin elektrokromatografik ayrımı görülmektedir.



Şekil 4.23. Nükleozidlerin [POSS-MAH-PBA] monolitik boronat afinite kolon ile ayrılması. Mobil faz: %50 ACN ve %50 PB (10 mM, pH 8.0); örnek alımı: 5 kV 30 s; analiz voltajı: 10 kV; dalga boyu: 260 nm. 1. Üridin, 2. Sitidin 3. Guanozin, 4. Adenozin.



Şekil 4.24. Nükleozidlerin [POSS-MAH] monolitik boronat afinite kolon ile ayrılması. Mobil faz: %50 ACN ve %50 PB (10 mM, pH 8.0); örnek alımı: 5 kV 30 s; analiz voltajı: 10 kV; dalga boyu: 260 nm. Nükleozidler: üridin, sitidin, guanozin ve adenozin karışımı.

Tüm ayrımlar için elde edilen kromatografik parametreler Çizelge.4.7' de görülmektedir. İki pik arasındaki Rs değerleri ikinci pikin taban genişliğinin birinciden büyük ($t_{R2} > t_{R1}$) olması durumunda hesaplanır. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun hesaplanan Rs değerleri şu şekildedir. Pik 1,2 için Rs: 1.57; pik 2,3 için Rs: 1.51; pik 3,4 Rs: 1.55. Görüldüğü üzere [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon nükleozidleri başarılı bir şekilde ayırmaktadır ($R_s > 1.5$).

Çizelge 4.7. [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun nükleozidler için kromatografik ayırma parametreleri.

[POSS-MAH-PBA] için kromatografik parametreler					
Pikler					

Parametreler	1	2	3	4	5
t_R (dk)	6.33	8.52	10.56	13.43	18.62
W	1.68	1.71	2.15	3.32	4.60
k	1.11	1.84	2.52	3.47	5.20
N	2.547.108	5.788.706	510.970	2.125.613	1.567.952
H	0.0000106	0.00000466	0.00000528	0.0000127	0.00000128
α	1.65	1.36	1.37	1.49	-

[POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolon nükleozidleri etkin bir şekilde ayırırken [POSS-MAH] boronat afinite kolonda herhangi bir ayırım görülmemiştir.

4.9. Literatür Çalışmaları

RNA oldukça fazla sayıda modifiye nükleozid içermektedir. RNA'nın metabolik tekrar değişiminde, modifiye RNA tekrar dönüşüme uğrayamaz ve hücrelerden biyolojik sıvılara atılır. Atılan bu vücut sıvılarındaki nükleozidlerin tayini kanser tayin metodları için oldukça önemlidir. Feng ve arkadaşları [108] boronat afinite

organik-silika hibrit kapiler monolitik kolonları (BOHCMC) hazırlamış cis-diol içeren nükleozidlerin seçici ayırımında katı faz mikroekstraksiyonunda (SPME) kullanmışlardır. Daha sonra SPME ile LC-MS/MS'i birleştirmiş ve idrardaki ribozillenmiş nükleozidleri tayin etmiştir. Tiyol-en yöntemi ile sentezlemiş oldukları afinite kolonun ekstraksiyon kapasitesi 500 $\mu\text{g/g}$ polimerdir.

Liu ve arkadaşları ise wulf tipi amin (3-dimetilaminometil) anilin-4-pinakol boronat temelli poli(GMA-co-PEGDA) monolitik kolon sentezlemiş ve cis-diol içeren nükleozidlerin adsorpsiyonunda kullanmışlardır. İdrarda bulunan nükleozidlerin adsorpsiyonunu zenginleştirme faktörü ile ifade etmişler ve en fazla 22 olarak tespit etmişlerdir [95].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, boronat afinitesini non-spesifik etkileşimlere yol açtığı için en çok etkileyen etkileşimlerden birisidir. Zou ve arkadaşları, hidrofilik boronat ligandlar ekleyerek bu zorluğun üstesinden gelmeyi başarmışlardır. Bu amaçla VPBA yerine hidrofilik AAPBA kullanmış ve poli(AAPBA-co-EDMA) monolit hazırlayarak cis-diol içeren bileşikleri 10.8 $\mu\text{mol/ml}$ maksimum seçicilik değeri ile ayırmışlardır [90,91].

Adsorpsiyon kapasitesine sinerjik etkinin önemi yine Liu ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [89]. Tek bir cis-diol grubu içeren adenosin gibi bir bileşiğin adsorpsiyon kapasitesini artırmak için dendrimerik boronik asit kullanmışlar ve PDMC ve EDMC bazlı monolitik kolonlar ile adsorpsiyon kapasitesini 102.10 ve 26.53 $\mu\text{mol/g}$ a kadar çıkarabilmişlerdir.

Organik monolitik kolonlar organik çözücüde şişme, düşük yüzey alanı, düşük geçirgenlik ve düşük mekanik kararlılık gibi dezavantajlarından dolayı çok fazla uygulama alanı bulamamıştır. Bu dezavantajlar inorganik materyaller ile giderilebilmesine rağmen hazırlama prosesleri komplike olup, göreceli mekanik kararsızlığa sahiptirler. Her iki durum göz önüne alınarak, son yıllarda boronat bazlı hibrit organik-inorganik monolitik afinite kolonlar geliştirilmiştir. Liu ve arkadaşları [96] boronat-silika hibrit monolitik kolonu 3-akrilamidofenilboronik asit (AAPA) ligandını kullanarak tek işlemde sentezlemiş ve nükleozidleri seçici bir

şekilde ayırmıştır. Hazırlanan monolitik kolon yüksek yüzey alanı sebebi ile 49.5 µmol/mL gibi oldukça yüksek bir adsorplama kapasitesi göstermiştir.

Akgöl ve arkadaşları (7) nükleozidlere seçici afinite gösteren yüzey alanı oldukça yüksek poli(HEMA) nanopartiküleri emülsiyon yöntemi ile sentezlemiş, APTES ile aktiveleştirdikten sonra PBA ligandı ile modifiye etmişlerdir. Ortalama 200 nm boyutundaki nanopartiküller ile nükleozidleri 35.6 mg/g olacak şekilde adsorplayarak etkin ve başarılı bir afinite adsorbenti üretmişlerdir.

Bu çalışmada cis-diol grubu içeren nükleozidler için grup spesifik afinite gösteren, 507.60 m²/g gibi oldukça yüksek yüzey alanına sahip inorganik-organik hibrit monolitik afinite [POSS-MAH-PBA] kolonu hazırlanarak, nükleozidlerin seçici ayırımı gerçekleştirildi. Elde edilen 13.38 mg/g adenozin adsorpsiyonu değeri ile yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip monolitik kolon başarılı bir şekilde hazırlanmış oldu.

5. YORUM

- 1) Bu çalışmada literatürde ilk defa hibrit organik-inorganik [POSS-MAH] monolitik polimer sentezlenmiş olup sentezlenen polimer PBA ile modifiye edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolon ile nükleozid tayini gerçekleştirilmiştir.
- 2) Boronat afinite malzemeleri geniş spektrumlu seçicilikleri, tersinir kovalent bağlanmaları, pH kontrollü bağlanma/ayrılma eğilimleri, hızlı bağlanma/ayrılma kinetiği, kütle spektrometresi ile iyi uyumluluğu gibi oldukça önemli avantajlara sahiptir. Boronik asitler ile cis-diol içeren bileşikler arasındaki etkileşim bazik/asidik koşullardaki pH kontrollü tersinir kompleks oluşum/ayrılma prensibine dayanır. Boronat afinite kromatografisi glikoproteinler, nükleozidler ve sakkaritler gibi cis-diol gruplarını içeren bileşiklerin spesifik izolasyonu ve ayrılması için kullanılan eşsiz bir kromatografi çeşididir. Bu amaçla [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolon sentezlenmiş olup nükleozidlerin ayırımı için kullanılmıştır.
- 3) [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonu öncelikle [POSS-MAH] monolitik kolonların sentezlenmesi ve PBA ile modifiye edilmesi ile elde edildi. MAH monomeri, PBA'nın bağlanması için oldukça fazla sayıda bağlanma bölgeleri sağladığından [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonun adsorpsiyon kapasitesinin benzer monolitik kolonlara göre arttığı görülmüştür.
- 4) [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonları sentezlenirken ortama eklenen MAH monomeri hidrofilitiyi artırarak spesifik tanımayaya yol açmış ve mobil fazda organik çözücü kullanılmasını engellemiştir.
- 5) Sentezlenen [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonlar, şişme testi, FTIR, elemental analiz, SEM, Mikro-CT ve BET ile karakterize edilmiştir.

- 6) [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonların şişme testi analizi sonucu [POSS-MAH] monolitik kolon % 1036.36 şişme oranına sahipken; [POSS-MAH-PBA] monolitik kolon yapıda hidrofobik grup bulundurduğu için % 836.32 şişme oranı göstermiştir.
- 7) [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite polimerlere ait FTIR spektrumları incelendiğinde MAH monomerine ait karakteristik amid I ve amid II absorpsiyon bandlarının 1633 cm^{-1} ve 1453 cm^{-1} de görülmesi MAH monomerinin POSS yapısına katıldığını ve [POSS-MAH] polimerinin oluştuğunu göstermektedir. Aynı şekilde MAH monomerine ait 1584 cm^{-1} deki C=C simetrik gerilme bandlarının kaybolması MAH monomerinin POSS yapısına katıldığını göstermektedir. 844 cm^{-1} düzlem dışına C-N eğilme bandının kaybolması ve 850 cm^{-1} fenil boronik asitteki –B-O simetrik gerilme bandının ortaya çıkması ise PBA'nın [POSS-MAH] yapısına katıldığını ve [POSS-MAH-PBA] monolitik polimerinin oluştuğunu göstermektedir.
- 8) Sentezlenen afinite kolonların yapısına katılan elementlerin analizi elemental analiz yöntemi ile C, H, N ve B yüzdesinin tespit edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elemental analiz değerlerine bakıldığında POSS-MAH polimerin %N içeriğinin 2.5 olması, [POSS-MAH-PBA] polimerinin %B içeriğinin 5.4 olması MAH monomerinin ve PBA fonksiyonel grubunun yapıya başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir.
- 9) Nükleozid ayırımında kullanılacak olan [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik polimerlerin SEM görüntüleri farklı büyültme oranlarında (x5000, x10000, x20000) alınmıştır. [POSS-MAH] yapısını oluşturan küresel partiküller mikron altı boyutta olup büyüklüğü yaklaşık 500-600 nm düzeyindedir. PBA ile modifiye edildikten sonra elde edilen [POSS-MAH-PBA] yapısındaki küresel partiküllerin büyüklüğü artmış olup 600-700 nm boyutuna ulaştığı gözlemlenmiştir. Kapiler kolonların SEM görüntüleri incelendiğinde [POSS-MAH] yapısını oluşturan küresel partiküllerin büyüklüğünün yaklaşık 500-600 nm düzeyinde olduğu gözlemlenmiştir. PBA

ile modifiye edildikten sonra elde edilen [POSS-MAH-PBA] yapısındaki küresel partiküllerin büyüklüğü artmış olup 600-700 nm boyutuna ulaştığı tespit edilmiştir.

- 10) Micro-CT sonuçları incelendiğinde [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] polimerinin yapısına bakıldığında gözenekli yapının oluştuğu görülmekte olup PBA ile modifikasyondan sonra gözenek boyutunun küçüldüğü görülmektedir.
- 11) [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonların BET analizi tespit edilen yüzey alanları sırası ile 110.79 ve 507.60 m²/g olarak ölçülmüştür. BET sonuçlarından görüldüğü üzere PBA ile fonksiyonlandırıldıktan sonra elde edilen [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun yüzey alanı artmıştır.
- 12) Sentezlenmiş olan [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun, adenozin nükleozid molekülünün adsorplama kapasitesine pH, derişim, sıcaklık, iyonik şiddet, akış hızı ve etkileşim süresi gibi farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. pH 8.0, 0.1 mg/ml adenozin derişimi, 0.01 mg/ml NaCl tuz derişimi, 0.5 ml/dak akış hızı ve 60 dakika etkileşim süresi optimum değerler olarak tespit edilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi olarak 25 mM formik asit ve metanol çözeltisi karışımı (1:1, v/v) kullanılmıştır.
- 13) [POSS-MAH-PBA] monolitik kolon, adenozin nükleozid için yüksek bir bağlanma kapasitesi (13.38 mg/g) göstermiştir. [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren moleküllere afinitesinin PBA fonksiyonel grubundan kaynaklandığını göstermek için, PBA içermeyen [POSS-MAH] monolitik kolonu sentezlenerek adenozin molekülünü bağlama kapasitesi incelenmiş ve 1.89 mg/g olarak bulunmuştur.
- 14) [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adenozin nükleozit adsorpsiyon davranışı Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanarak incelenmiş, elde edilen deneysel sonuçlar (R² ve Q_{max} değeri) adenozin molekülünün PBA bağlanma bölgelerine tek tabakalı ve eşit bir şekilde

bağlandığını göstermiştir. Sonuç olarak [POSS-MAH-PBA] monolitik kolon Langmuir izotermine uyumlu olarak adsorpsiyon göstermektedir.

- 15) [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolonun tekrar kullanılabilirlik testlerinde 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra [POSS-MAH-PBA] boronat afinite kolonun adsorplama kapasitesinde kayda değer azalma olmadığı tespit edilmiş ve kapasite oranı %98.40 olarak belirlenmiştir. Tekrar kullanılabilirlik testlerinde, adsorpsiyon kapasitesindeki azalış, arka arkaya 5 tekrarlı adsorpsiyondan sonra sadece %1.6 olarak tespit edilmiştir.
- 16) [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun cis-diol içeren nükleozidlere seçici afinitesi, cis-diol grubu içermeyen deoksiadenozin trifosfat (dATP)trifosfat molekülünü içeren örneğin incelenmesiyle kanıtlandı. Seçicilik katsayısı (K değeri) adenozin molekülünün cis-diol aktif bağlanma bölgelerinin cis diol içermeyen dATP molekülüne göre seçici bağlanma değerini ifade etmektedir. Bu değere göre, PBA bağlı monolitik kolonun adenozin seçiciliği dATP moleküllerine göre 4 kat fazla olduğu görülmüştür. Bağlı seçicilik katsayıları kıyaslandığında [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun adenozin için [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona göre 4.25 kat daha seçici olduğu görülmüştür.
- 17) İdrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi adenozin ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona uygulanarak adsorbe olması sağlandı. [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kolon tarafından adsorbe olan adenozin miktarı UV-VIS spektroskopi ile tespit edilerek, bağlanan adenozin molekülü HPLC yöntemi ile doğrulandı. Adenozin spike edilmiş idrar çözeltisinin içerdiği adenozin miktarı 10.05 mg/g olarak tespit edilmiştir. Gözlenen göreceli düşük adsorpsiyon değeri ortamdaki hem sterik etki yaratabilecek hemde yarışmacı molekül olabilecek grupların fazlalığından kaynaklanabilir.
- 18) İdrar çözeltisine geçmiş olan nükleozid metabolitlerini incelemek için, yapay idrar çözeltisi nükleozidler (adenozin, sitidin, guanozin, üridin) ile spike edilerek [POSS-MAH-PBA] monolitik kolona adsorbe edildi ve desorbe edilen

nükleozidler HPLC yöntemi ile tayin edildi ve [POSS-MAH-PBA] monolitik kolonun grup spesifik seçici özelliği nükleozidleri adsorplama özelliği ile doğrulanmış oldu.

- 19) Sentezlenen [POSS-MAH] ve [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kapiler kolonların geçirgenlik ve geribasınç değerleri incelendiğinde akış hızının artması ile [POSS-MAH-PBA]'daki geribasınç değerinin yükseldiği ve geçirgenliğin azaldığı görülmüştür.
- 20) Nükleozidlerin ayırımına yönelik sentezlenen [POSS-MAH-PBA] monolitik afinite kapiler kolonun performansı alkil benzenlerin (ABs) elektrokromatografik ayırımı ile gerçekleştirildi. Kolon performansı alkil benzenler ve tiyoüre ile incelenmiş olup ABs'lerin alıkonma zamanlarının %RSD değerleri incelendiğinde %RSD<1.5 olması kolon üretiminin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.
- 21) [POSS-MAH-PBA] boronat afinite monolitik kapiler kolon nükleozidleri başarılı bir şekilde ayırırken ($R_s > 1.5$), POSS-MAH afinite monolitik kapiler kolon ayıramamaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] B. Bullinger, D., Fux, R., Nicholson, G., Plontke, S., Belka, C., Laufer, S., Gleiter, C.H., Kammerer, Am Soc Mass Spectrom, 19 **(2008)** 1500–1513.
- [2] H.M. Liebich, C. Di Stefano, A. Wixforth, H.R. Schmid, J., Chromatogr. A, 763 **(1997)** 193.
- [3] H.M Liebich, G xua, C Di Stefano, R Lehmann, Journal of Chromatography A, **(1998)** 341–347.
- [4] E. Dudley, F. Lemiere, W. Van Dongen, J. I. Langridge, S. El-Sharkawi, D. E. Games, E. L. Esmans, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15 **(2001)** 1701–1707.
- [5] E. Dudley, S. El Sharkawi, D.E. Games, R.P. Newton, Rapid Commun Mass Spectrom, 14 **(2000)** 1200–1207.
- [6] E.L. Esmans, D. Broes, I. Hoes, F. Lemiere, K. Vanhoutte, J Chromatogr A, 794 **(1998)** 109–127.
- [7] Y.W. Xu, Z.X. Wu, L.J. Zhang, H.J. Lu, P.Y. Yang, P.A. Webley, D.Y. Zhao, Anal. Chem, 81 **(2009)** 503-508.
- [8] J. Tang, Y.C. Liu, D.W. Qi, G.P. Yao, C.H. Deng, X.M. Zhang, Proteomics, 9 **(2009)** 5046-5055.
- [9] L.J. Zhang, Y.W. Xu, H.L. Yao, L.Q. Xie, J. Yao, H.J. Lu, P.Y. Yang, Chem. Eur. J., 15 **(2009)** 10158-10166.
- [10] L.B. Ren, Y.C. Liu, M.M. Dong, Z. Liu, J. Chromatogr. A, 47 **(2009)** 8421-8425.
- [11] Z.A. Lin, J.L. Pang, Y. Lin, H. Huang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, Analyst, 136 **(2011)** 3281-3288.
- [12] Y. Lu, Z.J. Bie, Y.C. Liu, Z. Liu, Analyst, 138 **(2013)** 290-298.
- [13] Z.A. Lin, J.L. Pang, H.H. Yang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, Chem. Commun., 47 **(2011)** 9675- 9677.
- [14] F. Svec, J.M.J. Frechet, Science, 273 **(1996)** 205-211.
- [15] H.Y. Li, Z. Liu, Trends Anal. Chem., 37 **(2012)** 148-161.
- [16] X.B. Li, J. Pennington, J.F. Stobaugh, C. Schoneich, Anal. Biochem., 372 **(2008)** 227-236.
- [17] A. Matsumoto, R. Yoshida, K. Kataoka, Biomacromolecules, 5 **(2004)** 1038-

- 1045.
- [18] A. Matsumoto, K. Yamamoto, R. Yoshida, K. Kataoka, T. Aoyagi, Y. Miyahara, *Chem. Commun.*, 13 **(2010)** 2203-2205.
- [19] Y.C. Liu, L.B. Ren, Z. Liu, *Chem. Commun.*, 47 **(2011)** 5067-5069.
- [20] Q.J. Li, C.C. Lü, H.Y. Li, Y.C. Liu, H.Y. Wang, X. Wang, Z. Liu, *J. Chromatogr. A*, 1256 **(2012)** 114-120.
- [21] G Wulff, *Pure Appl. Chem.*, 54 **(1982)** 2093-2102.
- [22] H.Y. Li, Y.C. Liu, J. Liu, Z. Liu, *Chem. Commun.*, 47 **(2011)** 8169-8172.
- [23]. M. Dowlut, D.G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 **(2006)** 4226-4227.
- [24] M. Berube, M. Dowlut, D.G. Hall, *J. Org. Chem.*, 73 **(2008)** 6471-6479.
- [25] A. Pal, M. Berube, D.G. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 49 **(2010)** 1492-1495.
- [26] S. Schumacher, M. Katterle, C. Hettrich, B.R. Paulke, D.G. Hall, F.W. Scheller, N. Gajovic-Eichelmann, *J. Mol. Recogn.*, 24 **(2011)** 953-959.
- [27] H.Y. Li, H.Y. Wang, Y.C. Liu, Z. Liu, *Chem. Commun.*, 48 **(2012)** 4115-4117.
- [28] L. Liang, Z. Liu, *Chem. Commun.*, 47 **(2011)** 2255-2257.
- [29] C.C. Lü, H.Y. Li, H.Y. Wang, Z. Liu, *Anal. Chem.*, 85 **(2013)** 2361-2369.
- [30] V.L. Alexeev, S. Das, D.N. Finegold, S.A. Asher, *Clin. Chem.*, 50 **(2004)** 2353-2356.
- [31] K.S. Boos, B. Wilmers, E., Schlimme, and R. Sauerbrey, *J. Chromatogr.*, 456 **(1988)** 93-104.
- [32] J. A. McCloskey, P. F. Crain, *Nucleic Acids Res.*, 26 **(1998)** 196-197.
- [33] M. H. Wu, R. A. Wu, Z. B. Zhang, H. F. Zou, *Electrophoresis*, 32 **(2011)** 105-115.
- [34] Z.A. Lin, J.L. Pang, Y. Lin, H. Huang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, *Analyst*, 136 **(2011)** 3281-3288.
- [35] R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, P.E. Butler, A.M. Seifalian, *Accounts Chem Res.*, 38 **(2005)** 879-884.
- [36] A. Malik, *Electrophoresis* 23 **(2002)** 3973-3992.
- [37] J.D. Alvarez, M. Bustamante-rangel, D. García-g, 92 **(2017)** 13-31.
- [38] G. Hu, F.Q. Yang, *Chem. Rapid Comm*, 2 **(2014)** 22-28.
- [39] S. Yamamoto, M.F. Wang, A.A. Adjei, C.K. Ameho, *Nutrition* 13 **(1997)** 372-374.

- [40] S. Studzinska, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 **(2013)** 1663–1672.
- [41] F. Panfe, M. Intriери, G. Calcagno, E. Izzo, A. Liberti, F. Salvatore, L. Sacchetti, *Journal of Liquid Chromatography*, **(1993)** 1229–1248.
- [42] K.F. Childs, X.H. Ning, S.F. Bolling, *Chromatogr. B*, 678 **(1996)** 181-186.
- [43] W. Furst, S. Hallstrom, *Chromatogr.*, 578 **(1992)** 39-44.
- [44] M.A. Morikawa, M. Yoshihara, T. Endo ve N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 **(2005)** 1358–1359.
- [45] S. Sivakova ve S. J. Rowan, *Chem. Soc. Rev.*, 34 **(2005)** 9–21.
- [46] C. Y. Chiu, L. Ruan ve Y. Huang, *Chem. Soc. Rev.*, 7 **(2013)** 2512–2527.
- [47] A. Kumar ve V. Kumar, *Chem. Soc. Rev.*, 14 **(2014)** 7044–7078.
- [48] J. Huang, L. Lin, D. Sun, H. Chen, D. Yang and Q. Li, *Chem. Soc. Rev.*, 42 **(2015)** 6330–6374.
- [49] F. Pu, X. Liu, B. Xu, J. Ren ve X. Qu, *Chem. Eur. J.*, 18 **(2012)** 4332–4328.
- [50] F. Pu ve J. Ren, *Nanotechnology*, 24 **(2013)** 375603-375613.
- [51] M. B. Avinash ve T. Govindaraju, *Nanoscale*, 6 **(2014)** 13348–13369.
- [52] I. Imaz, M. Rubio-Martinez, J. An, I. Sole-Font, N. L. Rosi and D. MasPOCH, *Chem. Commun.*, 47 **(2011)** 7287–7302.
- [53] N. Ma, G. Tikhomirov and S. O. Kelley, *Acc. Chem. Res.*, 43 **(2010)** 173–180.
- [54] Qurishi, R.; Kaulich, M.; M/iller, C.E., *J. Chromatogr. A*, 952 **(2002)** 275–281.
- [55] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, ANKARA, 2005.
- [56] Tsukasa M , Yuuki T, Sachiko A, Takahiko I, Akie H, Keiko E., *Polymer*, 23 **(2010)** 5539–5549.
- [57] A. J. Cybulski, J.A. Moulijn, *Catal. Rev.*, 36 **(1994)** 179–270.
- [58] T.A. Nijhuis, A.E.W. Beers, T. Vergunst, I. Hoek, F. Kapteijn, J.A. Moulijn, *Catal. Rev. Sci. Eng.*, 43 **(2001)** 345–380.
- [59] V. Tomasic, F. Jovic, *Appl. Catal. A*, 311 **(2006)** 112–121.
- [60] Groppi, G.; Tronconi, E.; Forzatti, P, 17 **(1993)** 237–249.
- [61] G. Groppi, E. Tronconi, *Chem. Eng. Sci.*, 52 **(1997)** 3521–3526.
- [62] F. Kapteijn, T.A. Nijhuis, J.J. Heiszwolf, J.A. Moulijn, *Catal. Today*, 66 **(2001)** 133–144.
- [63] D. W. Scott, *Journal of the American Chemical Society*, 68 **(1946)** 356–358.
- [64] R. H. Baney, M. Itoh, A. Sakakibara ve S. Toshio, *Chem. Rev.* 95 **(1995)**

- 1409–1430.
- [65] G. LiLichang W.H. Ni, C. U. Pittman, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, 11 **(2001)** 123–154.
- [66] J. Wu, P. T. Mather, *Polymer Reviews*, 49 **(2009)** 25–63.
- [67] C. B. Hurd, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 **(1946)** 364–370.
- [68] R. R. Walters, *Anal. Chem.*, 57 **(1985)** 1099A–1114A.
- [69] Taylor & Francis, *Handbook of Affinity Chromatography*, 2nd editio, Hage, D. S. (Ed.), New York, 2006.
- [70] D.C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li ve O. Hindsgaul, *Anal. Chem.*, 76 **(2004)** 440A–448A.
- [71] D. S Hage, J. A. Anguizola, A. J. Jackson, R. Matsuda, E.Papastavros, E. Pfaunmiller, Z. Tong, J. Vargas-Badilla, M. J. Yoo, X. Zheng, *Anal. Methods*, 3 **(2011)** 1449–1460.
- [72] E.L. Pfaunmiller, M.L. Paulemond, C.M. Dupper, D.S. Hage, *Anal Bioanal Chem*, 405 **(2013)** 2133–2145.
- [73] R. Mallik, D. S. Hage, *J. Sep. Sci.*, 29 **(2006)** 1686–1704.
- [74] K. K Tetala, T. A. van Beek, *J. Sep. Sci.*, 33 **(2010)** 422–438.
- [75] S.Ohlon, A. Lundblad, D. Zopf, *Anal. Biochem*, 15 **(1988)** 204–208.
- [76] Z. Yang, W.S. Hancock, *J Chromatogr A.*, 1053 **(2004)** 79–88.
- [77] L.M. Wang Y, *Anal Chem*. 86 **(2014)** 2057–2064.
- [78] B.K. Antje, C. H. Frickenschmidt, G.Stefan, L.H.Liebich, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16 **(2005)** 940–947.
- [79] A. K. P M. Mann, S. E. Skrabalak, M. V. Novotny, *Analytical Chemistry*, 85 **(2013)** 1905–1912.
- [80] B.C. Kim, M.K. Ju, A. Dan-Chin-Yu, P. Sommer, *Analytical Chemistry*, 81 **(2009)** 2388–2393.
- [81] L.M. Siu SO, E. Lau, X. Mao, H.Z. Sun, P.C. Chiu, W.S. Yeung, D.M. Cox, IK Chu, *Anal Bioanal Chem* 298 **(2010)** 791–804.
- [82] Y. T.J. Liu, P. Yin, G. Yao, G. Yan, C. Deng, X. Zhang, *Proteomics*, 10 **(2010)** 2000–2014.
- [83] Z.L. Liang, *Chem. Commun*, 47 **(2011)** 2255–2257.
- [84] Q. Zhang, N. Tang, J. W. C. Brock, H. M. Mottaz, J. M. Ames, J. W. Baynes, R. D. Smith and T. O. Metz, *J. Proteome Res.*, 6 **(2007)** 2323–2330.

- [85] O. Çetinkaya, H. Çiçek, Ş. Kıvrak, G. Tel Çayan, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 909 **(2012)** 51–60.
- [86] H. Li, Q. Qin, L. Qiao, X. Shi*a and G. Xu, *Chem. Commun.*, 85 **(2013)** 11585–11592.
- [87] O. G. Potter, M. C. Breadmore and E. F. Hilder, *Analyst*, 131 **(2006)** 1094–1096.
- [88] L.Z. H. Huang, Z. A. Lin, Y. Lin, X. B. Sun, Y. Y. Xie, and G.N. Chen, *J Chromatogr A.*, 1251 **(2012)** 82–90.
- [89] N.S. and M. Glad, O. Norrflow, B. Sellergren, K. Mosbach, *J Chromatogr A*, 347 **(1985)** 11–23.
- [90] Q.Z.W. and J.F.H. W. L. Yang, S. M. Huang, *J. Polym. Res.*, 21 **(2014)** 383–389.
- [91] H.W. and B.T. W. Zhang, W. Liu, P. Li, H. B. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 53 **(2014)** 12489–12493.
- [92] S.S. and A.T. B. Elmas, M. A. Onur, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232 **(2004)** 253–259.
- [93] S.N. and I.I. G. Carre´ de Lusançay, *Eur. Polym. J.*, 46 **(2010)** 1367–1373.
- [94] K.M.A.U. and L.Y. Z. F. Xu, *Macromolecules*, 45 **(2012)** 6464–6470.
- [95] X.D.B. and Z. Liu, *Anal Chem.*, 86 **(2014)** 959–966.
- [96] L.B.R. and Z.L. Y. C. Liu, *Chem. Commun.*, 47 **(2011)** 5067–5069.
- [97] F.S. Z. Deyl, *Capillary Electrochromatography*, 1st ed., Amsterdam, 2001.
- [98] M.S. I.S. Krull, R.L. Stevenson, K. Mistry, *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography: An Introduction*, HNB Publishing, New York, **2000**.
- [99] J. van der G. E.R. Verheij, U.R. Tjaden, W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A*, 554 **(1991)** 339–349.
- [100] H. Fu, X. Huang, W. Jin, H. Zou, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 **(2003)** 96–100.
- [101] A.S. Rathore, *Electrophoresis*, 23 **(2002)** 3827–3846.
- [102] L.C.J. Pursch, M.; Sander, *Chromatogr., A*, 887 **(2000)** 313–326.
- [103] A.K. Nomura, J. Yamada, Tsunoda, *Anal. Chem.*, 60 **(1988)** 2509–2512.
- [104] R.A. Yu, L. W. Hartwick, *J. Chromatogr. Sci.*, 27 **(1989)** 176–185.
- [105] S.G. Tramposch, W. G. Weber, *Anal. Chem.* 58 **(1986)** 3006–3010.

- [106] K. Hu, W. Z. Haddad, P. R. Hasebe, K. Tanaka, *Anal. Commun.* 36 **(1999)** 97–10.
- [107] H. Fu, C. Xie, J. Dong, X. Huang, H. Zou, *Analytical Chemistry*, 76 **(2004)** 4866–4874.
- [108] C. Haginaka, J. Kagawa, *Ansl. Bioanal. Chem* 378 **(2004)** 1907–1912.
- [109] Repo E., *EDTA- and DTPA- Functionalized Silica Gel and Chitosan Adsorbents for the Removal of Heavy Metals From Aqueous Solutions*, Lappeenranta University of Technology, 2011.
- [110] A. Fomkin, *Russian Academy of Sciences*, 45 **(2009)** 133–149.
- [111] A. Dabrowski, *Advances in Colloid and Interface Science*, 93 **(2001)** 135–224.

EKLER

1) 19. Kromatografi Kongresi, Sisem Ektirici, Ilgım Göktürk, Ali Derazshamshir, Fatma Yılmaz, Adil DENİZLİ, Nükleozidlerin Zwitteriyonik Monolitik Kolonlar ile Kapiler Elektrokromatografi Sisteminde Ayrımı, 12-14 Haziran 2019, ANKARA.



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: Nükleozidlerin Zwitteriyonik Monolitik Kolonlar ile Kapiler Elektrokromatografi Sisteminde Ayrımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 81 sayfalık kısmına ilişkin, 18/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:


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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Sisem Ektirici
Öğrenci No: N16225081
Anabilim Dalı: Kimya
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.


18.06.2019

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Prof. Dr. Adil Denizli

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sisem EKTİRİCİ
Doğum yeri : Diyarbakır
Doğum tarihi : 30.06.1993
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05306553314
Elektronik posta adresi : sisemektirici265@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Anabilimdalı

