

**L-FENİLALANİN'İN TANINMASINA YÖNELİK AFİNİTE KARTUŞLARININ  
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF AFFINITY CARTRIDGES FOR RECOGNITION OF  
L-PHENYLALANINE**

SEMRA AKGÖNÜLLÜ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

**2013**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Adil Denizli

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Handan Yavuz Alagöz

Üye : Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye : Doç. Dr. Sinan Akgöl

Üye : Doç. Dr. Lokman Uzun

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ...../...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Sevin Düz

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# L-FENİLALANİN'İN TANINMASINA YÖNELİK AFİNİTE KARTUŞLARININ HAZIRLANMASI

**SEMRA AKGÖNÜLLÜ**

## **ÖZET**

Afinite kromatografisi, biyolojik karışımların ayırımında ve tanınmasında kullanılan yüksek seçicilikte kimyasal etkileşimlere dayanan kromatografik bir yöntemdir. Afinite kromatografisinin bir alt grubu olan hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK), proteinlerin ve aminoasitlerin yapısında bulunan polar olmayan bölgeler ile hidrofobik ligandlar arasında gerçekleşen, hidrofobik etkileşimleri temel alan kromatografik bir yöntemdir. Bu yöntem, proteinlerin ve aminoasitlerin hidrofobik bölgelerinden tanınmasını hedef alır. Hidrofobik bir amino asit olan L-fenilalanin (L-Phe), merkezi sinir sisteminin normal çalışması için gereklidir. L-Phe; sağlık, ilaç ve yiyecek endüstrisinde kullanılmaktadır. Enantiyomerler; aynı kimyasal veya fiziksel özelliklere sahip fakat biyolojik, farmakolojik ve toksikolojik etkileri gibi önemli farklılıklarından dolayı farklı biyolojik doğaya ve farmakolojik aktivitelere sahiptirler. Bundan dolayı, enantiyo-ayırım önemlidir ve farmakoloji, klinik ve ekoloji (çevresel) gibi çeşitli araştırma alanlarında vazgeçilmezdir. Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniği kullanılarak L-Phe tanınması için L-Phe baskılanmış membran formunda kriyojeller hazırlanmıştır. Fonksiyonel monomer olarak N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) ve kalıp molekül olarak L-Phe kullanılmıştır. Farklı oranlarda fonksiyonel monomer-kalıp molekülü içeren beş farklı çeşit kriyojel membran sentezlenerek polimerizasyon koşulları optimize edilmiştir. L-Phe MIP kriyojel membranlar; Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), yüzey alanı ölçümü (BET), taramalı elektron mikroskop (SEM) ve şişme testleri ile karakterize edilmiştir. L-Phe'ye özgü kaviteler içeren kriyojel membranların, kromatografik L-Phe tanıma performansları farklı koşullar altında yapılan (pH, akış hızı, sıcaklık, iyonik şiddet etkisi, farklı iyonların etkisi, L-Phe başlangıç derişimleri) adsorpsiyon çalışmaları yürütülerek belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında, yarışmacı amino asitler (D-Phe, L-Trp ve D-Trp) varlığında seçicilik çalışmaları ve kriyojel membranların tekrar kullanılabilirlik deneyleri yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Afinite kromatografisi, Hidrofobik etkileşim kromatografisi, L-fenilalanin, Kriyojel membran, Moleküler baskılama.

**Danışman:** Doç. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF AFFINITY CARTRIDGES FOR RECOGNITION OF L-PHENYLALANINE**

**SEMRA AKGÖNÜLLÜ**

Affinity chromatography is a chromatographic method of separating biological mixtures, based on highly specific biological interactions. Hydrophobic interaction chromatography, (HIC), which is a sub-group of affinity chromatography, takes advantage of the hydrophobicity of proteins promoting its separation on the basis of hydrophobic interactions between immobilized hydrophobic ligands and non-polar regions on the surface of the proteins. L-Phenylalanine (L-Phe) is a hydrophobic amino acid and the central nervous system requires it for normal operation. L-Phe is used in medicine, pharmaceutical and food industry. Enantiomers have the same chemical or physical properties, but different biological, pharmacological and toxicological effects due to differences such as the nature of different biological and pharmacological activity. Therefore, enantioseparation is important and essential in diverse pharmacological, clinical, and environmental research areas. In this study, L-Phe imprinted membranes in the cryogel form were prepared by using molecular imprinting technique for the recognition of L-Phe. N-Methacryloyl-(L)-Phenylalanine (MAPA) and L-Phe was used as functional monomer and template, respectively. Polymerization conditions were optimized by synthesizing five different cryogel membranes having different functional monomer-template molecule ratios. L-Phe imprinted cryogel membranes were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), surface area measurement (BET), scanning electron microscope (SEM) and swelling tests. Chromatographic L-Phe recognition performance of the L-Phe specific cryogel membranes was investigated under different adsorption conditions (pH, flow rate, temperature, ionic strength effects, the effect of different ions, initial concentrations of L-Phe). In the last step, selectivity studies were performed in the presence of competitor amino acids (D-Phe, L-Trp and D-Trp) and the reusability of the cryogel membranes was investigated.

**Keywords:** Affinity chromatography, Hydrophobic interaction chromatography, L-phenylalanine, Cryogel membrane, Molecular imprinting.

**Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Hacettepe University, Department of Chemistry, Biochemistry Division, Ankara.

## TEŞEKKÜR

*Hayal ettiğim yerde lisansüstü eğitimimi tamamlarken, bu yolda desteğini hiç bir zaman esirgemeyen; fikirlerine, zekâsına ve engin bilgisine daima hayran kaldığım; bilim adına açtığı ufukta hayata dair de kattığı öğütlerden dolayı; geldiğim bu noktada emin adımlarla ilerlememi sağlayan ve en başından beri doğru yerde olduğumu hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye*

*Çalışmalarımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; düşüncelerini, fikirlerini, bilgisini paylaşan ve yol gösteren; daima bana inanan ve güvenen değerli hocam tez danışmanım Doç. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e*

*Her başım sıkıştığında yanına koştüğüm; her zaman vermiş olduğu destek ve yardımların yanında katmış olduğu bilgi, fikir ve sevgisini daima hissettiren değerli hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a*

*Lisansüstü çalışmalarımdayanımdayan olan, yardımlarını esirgemeyen, fikir ve bilgisini her zaman paylaşan; vermiş olduğu emek ve göstermiş olduğu sevgisinden dolayı Arş. Gör. Gözde Baydemir Peşint'e*

*Onlardan çok şey öğrendim, en önemlisi çok güzel dostluklar edindim, tez çalışmalarım süresince daima yanımda olarak yorulduğum anlarda göstermiş oldukları destekleri, fikirleri ve en önemlisi dostlukları için sevgili arkadaşlarım Yeşeren Saylan, Ilgım Göktürk, Duygu Çimen ve Canan Armutcu'ya ve özellikle yardımları ve desteği için Yeşeren Saylan'a bir kez daha,*

*Tezimin elektronik sorunlarına bıkmadan yardım eden sevgili arkadaşlarım Recep Üzek ve Kemal Çetin'e,*

*Çalışma ortamıma güzellik katan sevgi ve enerji dolu sevgili BIOREG üyelerinin her birine,*

*Tez çalışmalarımın yoğun olduğu zamanlarda ben onları ihmal etsem de onlara beni hiçbir zaman yalnız bırakmadıkları için daima yanımda oldukları ve destek verdikleri için dostluklarından hiçbir zaman vazgeçmeyeceğim can dostlarım,*

*En başından başlayarak yaptığım işlerde, ilerlediğim yolda bana her zaman inanan ve güvenen; bir kez olsun beni yalnız bırakmayan manevi desteklerini sonsuz kez*

*hissettiğim; onlar olmadan asla düşünemediğim bir dünya da, bana şu hayatta bu yolda vermiş oldukları emeklerinden ve bitmeyen sevgilerinden dolayı canımdan çok sevdiğim anneciğime, babacığma, ablama, enişteme, kardeşlerime ve doğduğu günden beri hayatımıza neşe, huzur ve anlam katan dünyalar güzeli Melis'ime*

*Tüm kalbimle çok teşekkür ederim...*

*Semra Akgönüllü*

*Ankara, 2013*



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ .....	4
2.1. L-Fenilalanin.....	4
2.1.1. L-Fenilalaninin Tıp Uygulamaları .....	4
2.2. Enantiyomer Ayrımının Önemi .....	5
2.3. Biyoafinite Kromatografisi .....	7
2.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK).....	9
2.4.1. Hidrofobik Etkileşimler Kromatografisinin Temeli.....	10
2.4.1.1. Suyun Rolü .....	12
2.4.1.2. Amino Asit Hidrofobisite Derecesi .....	13
2.4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde Alıkonma Mekanizması .....	15
2.4.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisine Etki Eden Faktörler .....	16
2.4.3.1. Ligand Tipi ve Sübstitüsyon Derecesi.....	17
2.4.3.2. Temel Matriksin Tipi .....	17
2.4.3.3. İyonik Şiddet Değişimi ve Tipi.....	17
2.4.3.4. pH Etkisi .....	19
2.4.3.5. Sıcaklık Etkisi .....	19
2.4.3.6. Katkılar (Ek Kimyasallar) .....	19
2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	20
2.5.1. Kovalent Baskılama .....	24
2.5.2. Non-Kovalent Baskılama .....	24
2.6. Kriyojeller .....	25
2.6.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu .....	26

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Deneysel Malzemeler.....	28
3.2. Kriyojellerin Hazırlanması .....	28
3.2.1. MAPA Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	28
3.2.2. Poli(HEMA/MAPA) Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması ..	29
3.2.3. L-Fenilalanin Baskılanmış Poli(HEMA/MAPA) Süpermakro-gözenekli Kriyojellerin Hazırlanması .....	29
3.3. Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	31
3.3.1. FTIR Spektrofotometre Analizi .....	31
3.3.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) .....	31
3.3.3. Yüzey Morfolojisi.....	31
3.4. Kalıp Molekülün (L-Phe) Polimerden Uzaklaştırılması .....	32
3.5. L-Phe Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	32
3.5.1. pH Değişiminin Adsorpsiyona Etkisi.....	34
3.5.2. L-Phe Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi .....	34
3.5.3. Akış Hızının Adsorpsiyona Etkisi .....	34
3.5.4. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi .....	34
3.5.5. İyonik Şiddetin Adsorpsiyona Etkisi .....	35
3.5.6. Seçicilik Deneyleri.....	35
3.5.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik .....	36
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	37
4.1.1. FTIR ile Yapı Analizi .....	37
4.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) .....	38
4.1.3. Yüzey Morfolojisi (SEM).....	39
4.1.4. Şişme Deneyi.....	40
4.2. Kalıp Molekülün (L-Phe) Polimerden Uzaklaştırılması .....	41
4.3. L-Phe Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	41
4.3.1. pH Değişiminin Adsorpsiyona Etkisi.....	41
4.3.2. L-Phe Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi .....	42
4.3.3. Akış Hızının Adsorpsiyona Etkisi .....	43
4.3.4. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi .....	44
4.3.5. İyonik Şiddetin Adsorpsiyona Etkisi .....	45

4.3.6. Adsorpsiyon İzotermi	47
4.3.7. Adsorpsiyon Kinetiği	50
4.3.8. Seçicilik Deneyleri	53
4.3.9. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	54
5. SONUÇLAR	56
6. YORUM	59
7. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. L-Fenilalanin yapısı.....	4
Şekil 2.2. L-Tirozin yapısı .....	5
Şekil 2.3. Biyoafinite kromatografisinin temel adımlarının şematik sunumu .....	9
Şekil 2.4. Su çözücü özellikleri, dipollerle etkileşebilme ve HX (X= O; F; N ya da Cl) ihtiva eden moleküllerle hidrojen bağı yapabilme kabiliyetine bağlıdır.....	12
Şekil 2.5. HEK' de protein alıkonma mekanizması. (A) Bir HEK temel sabit faz yapısı gösterilmektedir ve protein yüzeyinde hidrofobik gruplar belirtilen bir protein şeması gösterilmektedir. (B) Hidrofobik ligand ile protein etkileşimi. Matriksin hidrofobik ligandları ile proteinin hidrofobik kutupları etkileşmektedir, ve böylece protein tersinir bir şekilde sabit faz ile etkileşmektedir (Mahn, 2012).....	16
Şekil 2.6. Moleküler baskılama işleminin şematik olarak gösterimi. ....	21
Şekil 2.7. Kriyojelasyon süreci: 1. çözeltideki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makro gözenekler; 8. çözücü (Lozinsky ve ark. 2003). ....	26
Şekil 2.8. Kartuş şeklinde hazırlanan Poli(HEMA/MAPA) süpermakrogözenekli membran kriyojel.....	27
Şekil 3.1. N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) monomerinin sentezi .....	29
Şekil 3.2. Membran kartuşlarının ve sürekli sistemin optik fotoğrafları. ....	33
Şekil 4.1. Poli(HEMA/MAPA) kriyojelin olası kimyasal yapısı .....	37
Şekil 4.2. MAPA monomeri, NIP ve MIP-A2 kriyojellerinin FTIR spektrumları.....	38
Şekil 4.3. Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin SEM fotoğrafları. (A) baskılanmış kriyojel ve (B) baskılanmamış kriyojel. ....	40
Şekil 4.4. pH değişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Polimer: MIP-A; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; adsorpsiyon zamanı: 2 saat; T: 25 °C. ....	42
Şekil 4.5. L-Phe derişiminin adsorpsiyona etkisi. Akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25°C.....	43
Şekil 4.6. Adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C. ....	44

Şekil 4.7. Sıcaklık değişiminin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat. ....	45
Şekil 4.8. İyonik şiddetin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C. ....	46
Şekil 4.8. Farklı tuz tiplerinin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH:5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C. ....	46
Şekil 4.9. L-Phe baskılanmış poli(PHEMA/MAPA) kriyojel sistemi için Langmuir adsorpsiyon izotermi. ....	48
Şekil 4.10. L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojel için Freundlich adsorpsiyon izotermi. ....	49
Şekil 4.11. Birinci dereceden adsorpsiyon kinetiği.....	51
Şekil 4.12. İkinci dereceden adsorpsiyon kinetiği .....	52
Tablo 4.4. Birinci ve ikinci dereceden adsorpsiyon kinetiği verileri. ....	52
Şekil 4.13. Kullanılan amino asitlerin moleküler yapıları.....	53
Şekil 4.14. NIP ve MIP-A2 kriyojelleri ile seçicilik deneyi. Amino asit derişimi: 1.0 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.5; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C. ....	54
Şekil 4.15. L-Phe baskılanmış MIP-A2 kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği. L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH:5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25°C. ....	55

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1 HEK’de kullanılan amino asitlerin hidrofobisite derecesi. ....	14
Tablo 2.2. Hoffmeister serisi ve bazı anyon ve katyonların etkisi .....	18
Tablo 3.1. Farklı oranlarda hazırlanan L-Phe/MAPA polimerlerinin gösterimi. ....	30
Tablo 4.1. PHEMA, NIP ve MIP-A2 kriyojellerin yüzey alanı. ....	39
Tablo 4.2. PHEMA, NIP ve MIP-A2 için denge şişme ve makrogözenek oranları. 40	
Tablo 4.3. MIP kriyojel için Langmuir ve Freundlich izoterm sabitleri. ....	50
Tablo 4.4. Birinci ve ikinci dereceden adsorpsiyon kinetiği verileri. ....	52
Tablo 4.5. L-Phe’ye göre D-Phe, L-Trp ve D-Trp için Kd ve k değerleri. ....	53

## 1. GİRİŞ

Proteinlerin çeşitli tiplerinin, peptitlerin ve spesifik moleküllerin ayrılması, tanınması ve saflaştırılması biyoteknoloji, biyoloji ve kimyanın hemen her alanında kullanılmaktadır. Biyomoleküllerin ayrımı; moleküler boyut, net yük, biyospesifik ve hidrofobik karakter gibi onların biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır (Queiroz ve ark., 1996). Biyokimyada ve biyoteknolojide proteinlerin ayrımı genellikle kromatografinin çeşitleri, ultrafiltrasyon, çöktürme ve diğer işlemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Afinite kromatografisi, biyolojik tanıma, yüksek seçicilik ve geri kazanımı ile çok etkili bir yöntemdir. Aynı zamanda afinite kromatografisi biyomoleküllerin tanınması, izolasyonu, ayrımı ve saflaştırılması için hali hazırda çok iyi kurulmuş bir yöntemdir ve çok yüksek spesifik moleküler tanıma dayanmaktadır (Scouten, 1981; Turkova, 1993). Bu yöntemde, spesifik tanıma kapasitesine sahip bir molekül uygun çözünmeyen katı desteğe (genellikle küre veya membran formunda polimerik bir malzeme olan) immobilize edilmektedir. Molekülü izole etmek için basitçe uygun koşullar altında kromatografik kolon içinden ya da kesikli sistem içinde hedef (kalıp) molekülü içeren çözelti geçerek matrikse immobilize edilen ligand tarafından yakalanmaktadır. Hedef molekülün saf bir formda elde edilmesi için, ligand ve hedef molekül arasındaki etkileşimin kırılması pH, iyonik şiddet veya sıcaklığı ayarlayarak gerçekleşmekte ve spesifik çözeltiler veya yarışmacı serbest ligandlar kullanarak da ayrıcalıklı desorpsiyon şartları altında uygun elüentlerle ayırmaktadır (Turkova, 1993).

Afinite kromatografisi ilk olarak 1968 yılında Anfinsen ve Wilchek tarafından tanımlanmıştır. Afinite kromatografisi spesifik immobilize ligand ve hedef protein arasındaki etkileşime dayanan etkili bir protein ayırma yöntemidir. Mevcut ligandların büyük bir oranı farklı protein sınıflarında bir kompleks biyolojik ekstraktı ayırma veya düşük verimli post-translasyonel modifiye proteinlerin izole etmesine izin verir. Bu yöntem karışık proteinlerin izolasyonunda ve protein-protein etkileşimi ağının tanımlanmasında temel rol oynar (Azarkan ve ark., 2007).

Afinite kromatografisinin bir alt grubu olan hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK), proteinlerin hidrofobisite özelliklerinden dolayı büyük avantaja sahiptir. Proteinlerin yüzeyindeki polar olmayan bölge ile hidrofobik ligand arasındaki

hidrofobik etkileşimin temelinde ayırımı sağlar. Hidrofobik adsorpsiyon hareketli fazda yüksek tuz derişimi ile arttırılmaktadır ve elüsyon, elüentin tuz derişimi düşürülerek başarılmaktadır (Malender ve Horvath, 1977; Fausnaugh ve Regnier, 1986; Roe, 1989).

Sentetik ve doğal bileşimlerin (ecza, pestisitler, biyolojik olarak aktif besin destekleri gibi) çoğunun biyolojik aktivitesi onların enantiyomerik bileşimlerine bağlıdır. Örneğin, D-amino asitler canlı organizmaların işleyişi boyunca toksik üretimi haricinde protein sentezinde yer almaz iken L-amino asit içeren proteinler ilaç ve gıda üretiminde geniş çapta uygulamaya sahiptir. Bu yüzden, kiral seçici analitik tekniklerin ve bir rasemik karışımda bir enantiyomerik izomerin miktarının geliştirilmesi in vivo/vitro klinik analizlerin yanında ilaç ve gıda endüstrisinde çok önemlidir. Enantiyo-seçici sentezlerin büyük gelişmelerine rağmen, enantiyo-seçici analiz için yöntemler çok az sayıdadır (Prasad ve ark., 2009).

Aromatik bir amino asit olan L-fenilalanin sağlık, ilaç ve yiyecek endüstrisinde kullanılmaktadır. Fenilalaninin ona eşlik eden amino asitlerden özgün ayırımı ve tanınması mikrobiyal ve substrattan enzimatik işlemlerde bir sonraki işlemler için gereklidir. Fenilalaninin diğer amino asitlerden analitik süreç için ayırımında çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Qiu ve ark., 2012). L-Phe, beyin ve sinir hücreleri arasındaki iletimi sağlayan dopamin ve nor-epinefrini üretmek için beyin tarafından bir öncül olarak kullanılmaktadır. L-Phe, L-tirozinin (L-Tyr) öncül amino asitidir ve birkaç protein sentezi ile ilgili aktivitelerde yer alır (Mahalakshmi ve ark., 2006).

Moleküler baskılama; bir biyomolekül ya da sentetik bir bileşikten oluşan bir kalıp moleküle tamamlayıcı olan spesifik tanıma ve bağlanma bölgeleri içeren polimerik sistem oluşturma teknolojisidir (Komiya ve ark., 2003; Haupt, 2003). Geçen yıllarda şekerler, steroidler, pestisitler, çeşitli ilaçlar ve amino asit türevleri gibi küçük moleküllerin baskılanmasına yönelik birçok yayın yapılmıştır. Bu da moleküler baskılanmış polimerlerin kalıp moleküle özgü yüksek oranda spesifik tanıma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Yan ve Ramström, 2005; Mahony ve ark., 2005; Hall ve ark., 2005; Piletsky ve Turner, 2006). Bunun aksine büyük moleküllerin baskılanması, özellikle makromoleküler baskılama, az gelişmiş, geri kalmış bir teknolojidir. Özellikle biyomedikal ve biyotanasal uygulamalarda biyolojik yapı ve fonksiyonun kontrolünde doğal sistemlerden yararlanmak ve bu sistemleri



kullanabilmek için moleküler tanıma teknolojisine gösterilen ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Klasik bir moleküler baskılanmış polimerde küçük kalıp molekül, polimer matriksindeki tamamlayıcı bağlanma bölgelerine doğru özgür bir şekilde hareket edebilir. Fakat makromoleküler bir kalıp molekülün bağlanma bölgelerine erişebilmesi daha zordur. Ayrıca bir makromolekülün daha karmaşık olan yapısı ve büyük boyutu, daha heterojen ve özgül olmayan bağlanmalara neden olur ve bunun sonucu olarak da baskılanmış polimer zayıf tanıma davranışı sergiler (Turner ve ark., 2006).

Makrogözenekli polimerik malzemeler biyoteknolojide, biyotıpta ve eczacılık biliminde büyük ilgi görmektedir (Chen ve ark., 1995; Hentze ve ark., 2002). Biyoteknolojide oldukça büyük potansiyeli ile polimer jellerin yeni oluşumlarından biri 'kriyojeller'dir (Lozinsky, 2002). Kriyojeller kriyojenik işlemin bir sonucu olarak oluşmaktadır (Lozinsky ve ark., 2003). Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların kısmi olarak donmuş çözeltilerinden hazırlanan jel matrikslerdir. Kriyojeller tipik olarak, birbiri ile bağlantılı makro gözeneklere (veya süper makro gözeneklere) sahiptirler.

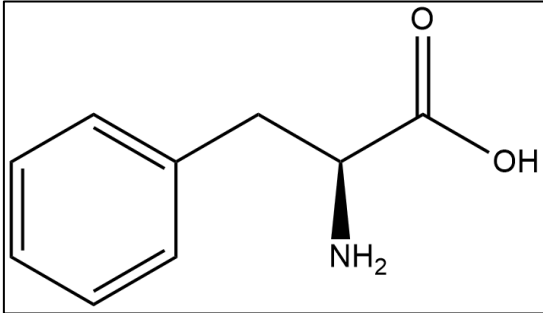
Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniği kullanılarak L-Phe tanınması için L-Phe baskılanmış membran formunda kriyojeller hazırlanmıştır. Fonksiyonel monomer olarak N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) ve kalıp molekül olarak L-Phe kullanılmıştır. Farklı oranlarda fonksiyonel monomer-kalıp molekülü içeren kriyojel sentezlenmiştir. Adsorpsiyon koşullarının optimize edilmesi amacıyla ortam pH'sı, sıcaklık, L-Phe derişimi, iyonik şiddet ve iyon türü gibi parametrelerin etkileri incelenerek hazırlanan L-Phe baskılanmış kriyojel membranların en yüksek etkinlik gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Belirlenen bu koşullarda farklı yarışmacı amino asitler kullanarak baskılamanın etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar hazırlanan moleküler baskılanmış kriyojel membranların, bu çalışmada hedeflendiği şekilde, fenilalaninin D ve L enantiyomerlerini yeterli seçicilikte ayırabildiğini göstermektedir. Çalışma sonucunda L-Phe'ye seçici, tekrar kullanılabilir bir adsorbent elde edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. L-Fenilalanin

L-Fenilalanin (L-Phe), aromatik ve hidrofobik bir amino asittir. Kan beyin bariyerini geçebildiği için özellikle beyin hastalıklarının tedavisinde etkilidir. Beyin kişiyi bilinçli ve dikkatli tutar, açlık ağrısını (hissini) azaltır, bir antidepresan olarak görev yapar ve hafızayı geliştirmeye yardımcı olur. L-Phe, beyin ve sinir hücreleri arasındaki iletimi sağlayan dopamin ve nor-epinefrini üretmek için beyin tarafından bir öncül olarak kullanılmaktadır. L-Phe, L-tirozinin (L-Tyr) öncül amino asitidir ve birkaç protein sentezi ile ilgili aktivitelerde yer alır. Beyinde biyokimyasal eksiklikler ve dengesizlikler, yiyecek, uyuşturucu, alkol bağımlılığı gibi zorunlu bozukluklarda faktörleri sebebiyle ortaya çıkar. Beynin beslenmesi geliştirilerek, bu dengesizlikler (bozukluklar) düzeltilmesine yardımcı olunur. Beyin beslenmesinde yeterli gelişme L-Phe içeren diyet ile meydana gelebilir (Mahalakshmi ve ark., 2006).

Fenilalanin, D-fenilalanin (D-Phe) ve L-fenilalanin (L-Phe) iki izomerik formda bulunan bir alfa-amino asitidir. Her iki enantiyomerin farmakolojik aktiviteler ve biyolojik doğasının farklılıklarından dolayı, spesifik tedavi kullanımları için onların saf formlarının kullanımı önemlidir. Genelde, saf enantiyomerlerin sentezi zordur. Genellikle bir rasemik karışım olan son üründe (tamamlanmış ürün) sonuçlanır ve bir ilaç olarak kullanılmadan önce ayrılmalıdır (Khan ve ark., 2008).



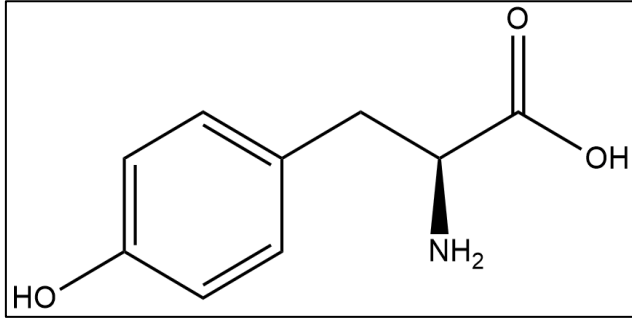
Şekil 2.1. L-Fenilalanin yapısı

#### 2.1.1. L-Fenilalaninin Tıp Uygulamaları

Fenilketonüri (PKU), fenilalanin hidroksilaz enziminin eksikliğinden kaynaklanan doğuştan gelen bir metabolizma hatasıdır. Bu fenilalaninin tirozine dönüşümünde bir eksiklikle ve diğer metabolitler ve fenilalanin seviyesinin artırılması ile sonuçlanır. Kanda ve idrarda fenilalaninin (Phe) derişiminin ölçümü genetik

çalışmalarda ve PKU'nin tedavisinde önemlidir. 1938' de fenilketonürik çocukların biyokimyasal karakteristik özelliklerinden biri olarak idrarda fenilalanin salınımı arttırılarak kaydedilmiştir.

Kanda fenilalanin miktarı için Guthrie testi, fluorimetrik, kromatografi ve kütle spektrometri içeren farklı yöntemler rapor edilmiştir (Ateş ve Doğan, 2010).



Şekil 2.2. L-Tirozin yapısı

Fenilketonuri (PKU), fenilalanin hidroksilaz enziminin kodladığı PAH genini etkileyen amino asit metabolizmasının en yaygın hastalığıdır. Bu hata, Phe katabolik metabolizmanın ilk adımında Phe'nin tirozine hidroksilazyonunda oluşan hatadan toksik hiperfenilalaninemi de sonuçlanır. Bu hata, aşırı zeka geriliğine ve merkezi sinir sistem metabolizmasında kötü dengesizlikleri doğuran PKU semptomlarına sebep olur. PKU tespiti ve teşhisi çoğunlukla doğumda yüksek Phe kan plazma seviyesi yoluyla meydana gelir (Madden, 2007).

## 2.2. Enantiyomer Ayırımının Önemi

Enantiyomerlerin ayrımı için yeni yöntemlerin geliştirilmesi yüksek maliyeti, zorluğu ve öneminden dolayı büyük bir ilgiye sahiptir. Bu özellikle enantiyo-safılık içeren ilaç endüstrisinde, ilaç üretimi sonunda yüksek saflık gerektirdiğinden dolayı temeldir. Son zamanlarda, Lakshmi ve Martin enantiyo-seçici taşıyıcı olarak immobilize olan apoenzimleri kullanarak D- ve L-amino asitlerin ayrımını içeren yeni bir yöntem rapor etmişlerdir. Bu yöntem kullanılarak, D- ve L-amino asitleri arasında taşıma oranları arasında beş kat fark elde edilmiştir. Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniği kullanılarak enantiyo-seçici polimerik taşıyıcılar geliştirmişlerdir.

Moleküler baskılama, ilk defa Dickey tarafından tanımlanmıştır. Hedef “baskılanan” moleküller için biyomimetik polimerik reseptörler yapılan bir tekniktir. Yöntem, (1) fonksiyonel grupların yer aldığı monomerler ile “baskılama” hedef molekülün bir araya geldiği karışım, (2) düşük sıcaklıkta polimerizasyon, ve (3) baskılanmış molekülün fonksiyonel grup ile uyumu, şekil ve boyut içinde tamamlayan polimer içinde kaviteleden ayrılan “baskılanan” molekülün polimerden uzaklaştırılmasıdır. Bu teknik moleküllerin geniş çeşit aralığı için seçici tanıma bölgeleri hazırlanması için kullanılmaktadır. Daha yüksek enantiyo-seçiciliklerden biri baskılanmış polimerler hazırlamak için kullanılarak amit fonksiyonel gruplar ile gerçekleştirilmiştir. Mosbach ve ark., seçici tanımanın bir ölçüm olarak HPLC kapasite faktörünü kullanarak enantiyoseçici faktöre sahip olan amit baskılanmış polimerler geliştirdiler. Ayrıca Mosbach ve ark. tarafından kalıp molekül olarak peptitlerin kullanıldığı LL ve DD formları tanıyan polimerik reseptörlerde geliştirilmiştir (Liao ve ark., 1998).

Enantiyomerler aynı kimyasal veya fiziksel özelliklere sahip fakat onların biyolojik, farmakolojik ve toksikolojik etkileri gibi önemli farklılıklarından dolayı farklı biyolojik doğaya ve farmakolojik aktivitelere sahiptirler. Bundan dolayı, enantiyoayırım önemlidir ve farmakolojik, klinik ve ekolojik (çevresel) gibi çeşitli araştırma alanlarında vazgeçilmezdir. Fakat, enantiyomerik saf bileşimi elde etmek çok zordur. Ayrıca enantiyoayırım için; sıvı kromatografisi (LC), kapiler elektroforez (CE) ve kapiler elektrokromatografi (CEC), sıvı ve katı (polimerik) membranlar ve kiral sıvı-sıvı ekstraksiyon gibi birkaç yöntem rapor edilmiştir. Günümüzde, moleküler baskılama tekniği tarafından hazırlanan kiral-ayırma polimerler büyük önem ve gelişmeye sahiptir. Moleküler baskılama, kalıp molekül için yüksek afinite ve seçicilik ile moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) hazırlandığı; üç-boyutlu çapraz-bağlı polimer matrikste kalıp molekülün etkileştiği çok yönlü bir işlemdir. Kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra, MIP orijinal kalıp molekül için bir değişmez (kalıcı) baskılanan kaviteye sahiptir. MIP kiral ayrımlar elde edildiği zaman, enantiyomerler için önceden belirlenmiş bir elüsyon düzeni elde edilir (Zhang ve ark., 2011).

Sentetik ve doğal bileşimlerin (ecza, pestisitler, biyolojik olarak aktif besin destekleri gibi) çoğunun biyolojik aktivitesi onların enantiyomerik bileşimlerine

bağlıdır. Örneğin, D-amino asitler canlı organizmaların işleyişi boyunca toksik üretimi haricinde protein sentezinde yer almaz iken L-amino asit içeren proteinler ilaç ve gıda üretiminde geniş çapta uygulamaya sahiptir. Bu yüzden, kiral seçici analitik tekniklerin ve bir rasemik karışımda bir enantiyomerik izomerin miktarının geliştirilmesi in vivo/vitro klinik analizlerin yanında ilaç ve gıda endüstrisinde çok önemlidir. Enantiyo-seçici sentezlerin büyük gelişmelerine rağmen, enantiyo-seçici analiz için yöntemler çok az sayıdadır. Geleneksel kromatografi ve kapiler elektroforez enantiyomer saflığın tanımlanması için kullanışlı olarak rapor edilse de, yüksek verimli görüntüleme için uygun değildir ve uygun kiral seçiciler ise zaman alıcıdır. Son on yılda, zaman alıcı ayırma yöntemlere alternatif ucuz bazı enantiyo-seçici algılayan araçlar rapor edilmiştir (Prasad ve ark., 2009).

Aydoğan ve ark., L-glutamik asit ayrımı için moleküler baskılanmış kriyojeller hazırlamışlardır. Bu çalışmada kromatografik uygulama ile L-glutamik asit ayrımı için L-glutamik asit moleküler tanıma bölgelerine sahip baskılanmış kriyojeller hazırlamışlardır (Aydoğan ve ark., 2011).

Say ve araştırma grubu tarafından yapılan çalışmada L-Histidin baskılı polimerik mikrokürelerin D ve L-Histidin içeren enantiyomerik bir karışımın kromatografik ayırımında kullanılabilirliği FPLC sistemi ile denenmiştir. Bu çalışmada yüzey baskılama yöntemiyle metal-şelat etkileşiminden yararlanılarak N-metakroil-L-histidin-Cu<sup>2+</sup> monomeri sentezlenmiş daha sonra bu monomerle histidin baskılanmış polimer sentezlenmiştir. Hazırlanan bu polimer hızlı protein sıvı kromatografisinde (FPLC) kolon dolgu malzemesi olarak kullanılmış ve D,L-Histidin enantiyomerik ayrımı başarıyla gerçekleştirilmiştir (Özcan ve ark., 2006).

### **2.3. Biyoafinite Kromatografisi**

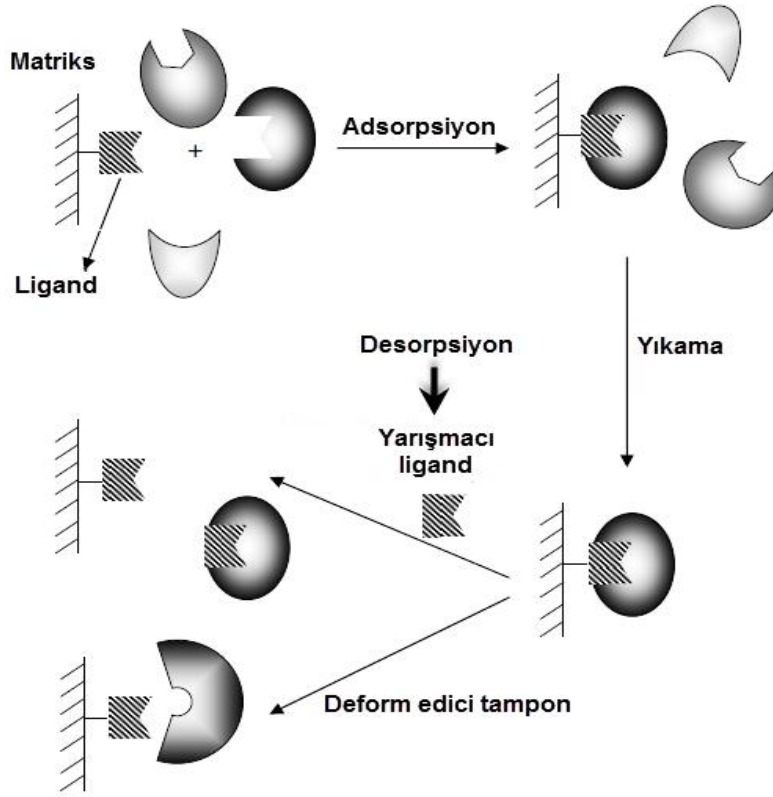
Biyokromatografi, etkili bir biyomolekül/protein saflaştırma yöntemidir. Biyoayırma, (1) Biyomoleküllerin moleküler özelliklerinin bilinmesine (örneğin protein), (2) kromatografik yöntemler de moleküler etkileşimlerin termodinamik ve fizikokimyasal özelliklerinin bilinmesine dayanmaktadır. Proteinler hakkında bilgi birikimi arttıkça kromatografik yöntemlerde gelişmiştir. Biyoafinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin tamamlayıcı bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir (Vijayalakshmi, 2002).

Afinite kromatografisi, moleküller ve onların ligandları arasındaki spesifik etkileşimlerin kullanımına dayanmaktadır. “Afinite” terimi latince bir kelime olan “yakın ilişkili” anlamına gelen “afinitas” kelimesinden türetilmiştir. Biyokimyada, afinite ifadesi biyomoleküllerin (proteinler, karbohidratlar, polinükleotitler ve onların ligandları) etkileşimlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Proteinler ile onların bağlandığı bölgelerin etkileşimleri transdüksiyon ve hücre çoğalması gibi çeşitli hücresele olaylarda önemli rol oynar. Biyomoleküller yalnızca diğer biyomoleküller ile etkileşim yapmaz, aynı zamanda metal iyonların ve küçük-molekül ilaç gibi yapay ligandlara spesifik bir şekilde bağlanırlar (Sproß ve Sinz, 2011).

Afinite kromatografisinde, afinite çiftinin bir eşi katı sabit faza immobilize edilmektedir. Bu bağlanma sabit fazdan ligandın sızmasından kaçınmak için kovalent bağ olmalıdır. Ayrıca kompleks oluşumu için gerekli olan bağlanma bölgelerinden etkilenmemelidir. Bu kapsamda durgun fazda oluşan kavitelele için spesifik etkileşimlerin bulunduğu bir teknik olan moleküler baskılamadan bahsedilmelidir. Bu sabit faza sadece non-kovalent etkileşimler ile etkileşen bir kalıp molekülün varlığında monolit-oluşumu monomerlerin polimerizasyonu ile başarılmaktadır. Non-spesifik bağlanma, afinite desteklele hazırlanması için çoğu zaman moleküllerin, sabit faz veya immobilize ligand ile örnek matrikste diğer analitten kaynaklanan non-spesifik etkileşimlelerinden sonuçlanan büyük bir engel sunar. Non-spesifik bağlanma genellikle birkaç yıkama adımından sonra uzaklaştırılmaktadır. Analitin elüsyon işlemi polariteyi değiştirerek, pH değeri, tamponun (non-spesifik elüsyon) iyonik şiddetini veya yürütülen tampona (biyospesifik elüsyon) analitin yarışmacısını ekleyerek çoğunlukla başarılmaktadır. Kullanılan elüsyon yöntemi her bir duruma spesifik olarak uyarlanmak zorundadır. Biyomoleküller ve onların ligandları arasındaki etkileşime bağlı olan yöntem sık sık “biyoafinite” yöntemi olarak özetlenmektedir (Sproß ve Sinz, 2011).

Aşağıdaki şekilde afinite kromatografisinin prensipleri gösterilmektedir. İlk basamakta taşıyıcı matriks seçilir ve aktive edilir. Eğer gerekiyorsa, taşıyıcının aktif bölgelerinden kovalent olarak uzatıcı kol takılır. Ligand adsorban ile uzatıcı kol üzerinden tepkimeye girer. Bazı durumlarda ligand-uzatıcı kol kombinasyonu ilk basamakta sentezlenir ve daha sonra taşıyıcıya tek basamakta immobilize

edilir. Şekil 2.3' de afinite kromatografisindeki temel basamakların sematik gösterimi yer almaktadır (Öncel, 2004).



Şekil 2.3. Biyoafinite kromatografisinin temel adımlarının şematik sunumu

#### 2.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK)

Protein saflaştırma tekniklerinin geniş çapta çeşitliliği günümüzde mevcuttur, ancak bununla birlikte, kromatografinin farklı tipleri onların yüksek çözünme gücünden dolayı etken olmuştur. Jel-filtrasyon kromatografisi, iyon-değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) de, protein ayrımı onların sırasıyla biyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri olan: moleküler boyut, net yük, biyospesifik ve hidrofobik karakterlerine bağlıdır (Queiroz ve ark., 2001). Biyomoleküller, onların spesifik özelliklerindeki farklılıklara göre ayrımını sağlayan kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılmaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK), biyomolekülleri onların hidrofobisite özelliğindeki farklarına göre ayırır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, immobilize hidrofobik ligandlarla protein yüzeyindeki non-polar bölgeler arasındaki hidrofobik ilişkiye dayalı bir saflaştırma yöntemidir. Adsorpsiyon hareketli fazdaki yüksek tuz

derişimleriyle artar ve elüsyon, elüentin tuz derişimini azaltmakla gerçekleştirilebilir (Melander ve Horvath, 1977; Fausnaugh ve Regnier, 1986; Roe, 1989). Bu yüzden, 'salt-promoted adsorpsiyon' terimi bu tip kromatografi için kullanılabilir (Porath, 1986). Diğer kromatografik tekniklerle saflaştırılması güç olan protein karışımlarını ayırmak için farklı elüsyon koşulları kullanılabilir. HEK, kompleks mekanizmasına rağmen hidrofobik etkileşimlerde baskın olan van der Waals bağları (yüzeysel etkileşimler) sayesinde diğer kromatografik tekniklere oranla saflaştırmada daha başarılıdır (Janson ve Ryden, 1993). Böylece afinitede iyon değişim ve ters faz kromatografisine kıyasla biyomoleküllerin yapısal olarak zarar görmeleri azalır ve biyolojik aktiviteleri korunur (Fausnaugh ve ark., 1984; Regnier, 1987).

HEK, biyomoleküllerin ayrımı ve saflaştırılması için kullanılan güçlü bir tekniktir. Hidrofobik etkileşim biyolojik sistemde makromoleküler etkileşimde çok yaygındır (Mahn, 2012). HEK ilk kez Shepared ve Tiselius tarafından 1949 yılında "salting-out kromatografi" terimi kullanılarak tanımlandı. Later, Shaltiel ve Er-el (1973) "hidrofobik kromatografi" terimini getirdiler. Sonunda, Hjerten (1973) tuz varlığında zayıf etkileşimli hidrofobik matriks de proteinlerin alıkonmasına dayanarak bu tekniği "hidrofobik etkileşim kromatografisi" olarak tanımlamıştır (Mahn, 2012). HEK, bir katı desteğin yüzeyindeki hidrofobik bölgelerle protein moleküllerinin ayrımını içerir. Ayırma sürecinde, hidrofobik bölgesi olan protein hidrofilik katı destek (agaroz gibi) yüzeyine immobilize edilen hidrofobik moleküller (örneğin; alkil zincirler) ile etkileşir (Jennissen, 2002).

#### **2.4.1. Hidrofobik Etkileşimler Kromatografisinin Temeli**

HEK proteinleri, yüzey hidrofobisitelerindeki farklılıklara göre, bir ortamda hidrofobik bir yüzey ve bu proteinler arasındaki tersinir ilişkiden yararlanarak ayırır. Standart proteinler yüzey hidrofobisitelerinin farklılıkları ile ayrılabilirler. Bir HEK ortamı ve hidrofobik proteinler arasındaki etkileşim yürütücü tamponda belli tuzun varlığında önemli bir şekilde etkilenmektedir. Bir yüksek tuz derişiminde etkileşim artarken tamponun iyonik şiddetinin azaldığı düşük tuz derişiminde de etkileşim zayıflamakta; etkileşim terse döner ve protein ile düşük derecedeki hidrofobik etkileşim ilk elüsyon gerçekleşir. Hidrofobik özelliği en yüksek olan protein en son ayrılır, etkileşimi terse çevirmek için yüksek tuz derişimini azaltmak gerekir



(Handbooks from GE Healthcare). HEK süreci, proteinler (çözünebilen) gibi makromoleküller ile hidrofobik etkileşimin gerçekleştiği spesifik olarak tasarlanan bir sabit faz ile kolona bir makromolekül çözeltinin enjekte edilmesiyle meydana gelir. Genellikle alıkonma yüksek tuz derişimi şartları altında gerçekleşmektedir. Elüsyon hareketli fazda azalan bir tuz gradiyenti yapılarak iyonik şiddeti azaltarak başarılmaktadır. Analit moleküller, sabit fazın gözenekli yüzeyindeki hidrofobik ligandlar ile etkileşime girer. Sabit fazın hidrofobik ligandları çözeltide (genellikle sulu çözelti), mevcut olan makromolekülün hidrofobik kutupları ile etkileşir ve böylece protein reçineye tersinir bir şekilde etkileşmiş olur (Mahn, 2012).

Hidrofobisite su gibi polar bir çevre ve non-polar bileşik arasındaki itmedir (Querioz ve ark., 2001). Termodinamik açıdan, hidrofobik moleküller arasındaki etkileşim bir entropi-dayalı süreç olup ve bu durumda iki biyolojik molekül arasındaki hidrofobik etkileşim bu süreç boyunca sıcaklık (T) ve basınç (P) sabit kaldığı göz önüne alınan termodinamiğin ikinci kanuna dayanmaktadır. Eşitliği düşünürsek, non-polar moleküller polar bir çözücü (genellikle su) ile etkileşime girer, hidrofobik molekülü çevreleyen çözücü moleküllerin yüzey gerilimi artışı entropide azalışa neden olur ( $\Delta S < 0$ ). Entalpi de ( $\Delta H$ ) önemli bir artış olmadığında Gibbs enerjisinde ( $\Delta G > 0$ ) pozitif bir değişme meydana gelir. Dolayısıyla, non-polar bir molekül, polar çözücüde kendiliğinden çözünme meydana gelmemesi, termodinamik açıdan elverişsizdir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

Termodinamik durum bir polar çevrede iki veya daha fazla non-polar molekül yerleştiği zaman değişir. Bu durumda, hidrofobik moleküller hidrofobik etkileşimden dolayı birbirleri ile birleşirler ve bu yolda makromoleküllerin hidrofobik yüzeyi polar çevreden saklanırlar. Entropi ( $\Delta S > 0$ ), daha az yapısal moleküller içeren yığın çözücüye doğru hidrofobik moleküllerin yüzeyini çevreleyen daha yüksek yapısal çözücü moleküllerin yer değiştirmesinden dolayı artar. Bunun bir sonucu olarak, Gibbs enerjisi azalır ( $\Delta G < 0$ ). Bu nedenle, hidrofobik etkileşim termodinamik olarak uygun hale gelir. Sonuç olarak, bir polar çözücü çözeltisinde iki veya daha fazla non-polar molekül arasındaki hidrofobik etkileşim entropi de bir değişim tarafından yönetilen kendiliğinden oluşan bir süreçtir. Buna göre,

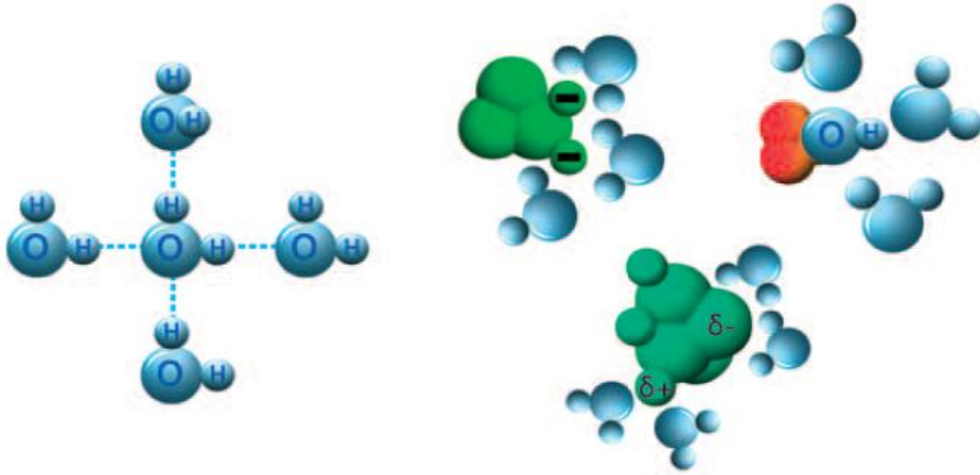
hidrofobik etkileşimler diğer çözücüler eklenerek çözücü polaritesinin değişmesiyle zayıflatılabilir (Querioz ve ark., 2001).

Hidrofobik etkileşimler biyolojik sistemde büyük bir öneme sahiptirler. Protein katlanması ve yapı stabilizasyonunda etken güçlerdir (Querioz ve ark., 2001).

#### 2.4.1.1. Suyun Rolü

Su; polar maddeler için iyi bir çözücü iken, non-polar maddeler için zayıf bir çözücüdür. Sıvı suda su moleküllerinin çoğunluğu moleküller arasındaki hidrojen bağlarından dolayı kümeler oluşturur (Şekil 2.5.). Örneğin, yüksek bir kaynama noktasına kadar oluşan su kümelerinin yarı ömrü çok kısa olsa da, su molekülleri arasındaki net etki çok güçlüdür (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

Hava-su ara yüzeyinde, su molekülleri kendilerini düzenli bir kabuk yapıya ayarlarlar. Burada, dengede hidrojen bağları oluşturmak artık mümkün değildir. Fakat ara yüzey sıvı tarafında daha baskındır. Bu güçlü bir yüzey gerilimi gösteren düzenli yapıya kararlılık kazandırır. Su kabuğunun dengesini etkileyen herhangi birşey yüzey gerilimini de etkilemektedir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008)



Şekil 2.4. Su çözücü özellikleri, dipollerle etkileşebilme ve HX (X= O; F; N ya da Cl) ihtiva eden moleküllerle hidrojen bağı yapabilme kabiliyetine bağlıdır.

Suya protein veya hidrofobik ligand gibi hidrofobik bir madde daldırıldığında yüzey gerilimine benzer olaylar meydana gelir. Su molekülü hidrofobik maddenin yüzeyini ıslatmaz. Tüm yönlerde hidrojen bağı oluşturma yeteneği olmamasından

dolayı, bunun yerine hidrofobik madde etrafında düzenli kabuk oluştururlar. Bu kabuk boyutu küçüldüğü zaman termodinamik olarak entropi artışında ( $\Delta S$ ) istenilen bir durumu temsil eden düzenli su moleküllerinin sayısının azalmasına yol açar. Entropi elde etmek için, hidrofobik maddeler bunu başarmak için bir araya gelirler. Bu durumda hidrofobik etkileşim, hidrofobik moleküller arasındaki doğrudan etkileşiminden ziyade su moleküllerinin davranışına bağlıdır (Şekil 2.5.) (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

#### **2.4.1.2. Amino Asit Hidrofobisite Derecesi**

Protein hidrofobisitesi onları oluşturan amino asitlerin hidrofobisitesi tarafından tanımlanmaktadır. Bu yüzden herhangi bir amino asitin katkıda bulunduğu hidrofobik yolunun miktarının belirlenmesi gereklidir. Bu amaç için, standart amino asitlerin herhangi birinin hidrofobisite değerlerini belirlemek için farklı yaklaşımlar amaçlanmıştır (Biswas ve ark., 2003; Kovacs ve ark., 2006). Bu yöntem teorik hesaplamalara veya deneysel tanımlamalara dayanmaktadır. Ayrıca, her biri tarafından işgal edilen göreceli pozisyonu yanında herhangi bir amino asitin belirlenen hidrofobisite skala derecesi farklıdır. Bu derece farklı yazarlar (Lienqueo ve ark., 2002; Mahn ve ark., 2009) tarafından onların prensipleri altında birkaç şekilde sınıflandırılmaktadır. Farklı dereceler tarafından her birinin belirlenen hidrofobisite arasındaki farklılıklara rağmen, dünya çapında açık bir şekilde öngörülmüştür.

İzolösin çoğu derecede en yüksek hidrofobisiteyi gösterir, bunu triptofan takip etmektedir. Glisin genellikle bir orta düzey hidrofobisite seviyesine sahiptir, ve en düşük seviye olarak aspartik asit belirlenmiştir (Lienqueo ve ark., 2007), yani bu en iyi hidrofilik amino asit olduğunu gösterir. Hidrofobisite derecesinin kullanışlılığı bu özelliklerinin tahminin yolunun yanında, protein veya peptit hidrofobisitesinin tahminini vereceğine dayanmaktadır. Miyazawa ve Jernigan (1996) ve Cowan ve Whittaker (1990) tarafından önerilen ölçek, HEK'de davranışlarına ilişkin proteinin üç-boyutlu yapısına (Lienqueo ve ark., 2007) bağlı olarak protein hidrofobisite tahmini etmek için en uygun olarak öngörülmüştür. Buna ek olarak, Salgado ve ark. (2005), Wertz ve Scheraga (1978) tarafından geliştirilen ölçek proteinlerin amino asit bileşimine dayanarak protein hidrofobisitesini tahmin etmede en uygun olduğunu ileri sürmüştür.

Tablo 2.1 HEK'te kullanılan amino asitlerin hidrofobisite derecesi.

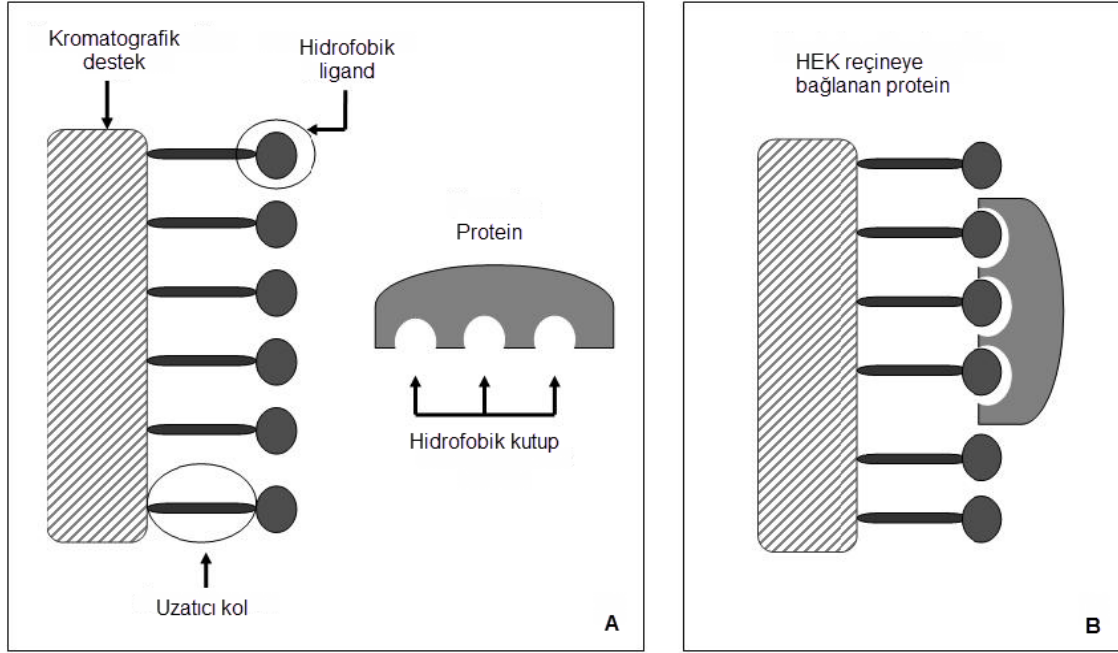
	Cowan ve Whittaker(1990)		Miyazawa ve Jernigan(1996)		Wertz ve Scheraga(1978)	
	Orijinal	Standart	Orijinal	Standart	Orijinal	Standart
ALA	0.420	0.660	5.330	0.391	0.520	0.375
ARG	-1.560	0.176	4.180	0.202	0.490	0.321
ASN	-1.030	0.306	3.710	0.125	0.420	0.196
ASP	-0.510	0.433	3.590	0.105	0.370	0.107
CYS	0.840	0.763	7.930	0.819	0.830	0.929
GLN	-0.960	0.323	3.870	0.151	0.350	0.071
GLU	-0.370	0.467	3.650	0.115	0.380	0.125
GLY	-0.000	0.557	4.480	0.252	0.410	0.179
HIS	-2.280	0.000	5.100	0.354	0.700	0.696
ILE	1.810	1.000	8.830	0.967	0.790	0.857
LEU	1.800	0.998	8.470	0.908	0.770	0.821
LYS	-2.030	0.061	2.950	0.000	0.310	0.000
MET	1.180	0.846	8.950	0.987	0.760	0.804
PHE	1.740	0.983	9.030	1.000	0.870	1.000
PRO	0.860	0.768	3.870	1.151	0.350	0.071
SER	-0.640	0.401	4.090	1.188	0.490	0.321
THR	-0.260	0.494	4.490	0.253	0.380	0.125
TRP	1.460	0.914	7.660	0.775	0.860	0.982
TRY	0.510	0.682	5.890	0.484	0.640	0.589
VAL	1.340	0.885	7.630	0.770	0.720	0.732

Miyazawa ve Jernigan (1996) ölçeği proteinlerin üç-boyutlu yapısına dayanmaktadır ve katlanmış proteinde bitişik amino asitler arasında enerji temasını temsil etmektedir. Wertz ve Scheraga (1978) ölçeği ise katlanmış protein bilgisine dayanmaktadır. Bu ölçek standart amino asitin herhangi biri için çözücüye maruz kalan veya gömülü kalanların sayısı arasındaki oran olarak amino asit hidrofobisitesi tahmin edilmektedir. Her iki ölçek deneysel yöntemler ile aydınlatılan proteinlerin üç-boyutlu yapılarının önemli sayısı tarafından oluşan kümelere dayanmaktadır. Her iki ölçek doğrudan olmayan ölçek olarak sınıflandırılmaktadır (Mahn ve ark., 2009). Diğer taraftan, doğrudan bir ölçek olarak kabul edilen Cowan ve Whittaker (1990) ölçeği, HPLC de her bir amino asit z-türevlerinin alıkonma süresi esas alarak her bir amino asit için standart bir hidrofobik değeri belirlenmiştir. Tablo 2.1. 'de yukarıda verilen ölçekler sunulmaktadır (Mahn, 2012).

#### **2.4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisinde Alıkonma Mekanizması**

Tiselius (1948) ilk kez 'tuz-dışlama kromatografisi' terimini kullanmıştır. Alkalın fosfatların yüksek derişiminde, proteinlerin ve amino asitlerin nötr katı desteğe bağlandığını tanımlamıştır. Bu tarihten itibaren, bu tekniğin gelişiminde büyük gelişmeler yapılmaktadır. Shaltiel ve Er-el (1973) yöntemi hidrofobik kromatografisi veya hidrofobik etkileşim kromatografisi olarak tanımlamıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ismi Hjerten (1973) tarafından geliştirilmiş ve zayıf hidrofobik karbohidrat jel matrikste tuz aracılığı ile proteinlerin ayrımını tanımlamıştır. Porath ve ark. (1973) tampon çözeltiye sodyum klorür veya sodyum fosfat ekleyerek kuvvetlendirdiği hidrofobik adsorpsiyonu bulmuşlardır.

HEK' de makromolekül alıkonması, bir sabit fazda immobilize edilmiş hidrofobik ligand ve makromolekül yüzeyinde bulunan hidrofobik kısım arasındaki hidrofobik etkileşimden dolayı meydana gelir (Queiroz ve ark., 2001). HEK' de kullanılan organik, polimer veya silikaya karşılık gelen çeşitli sabit fazlar vardır. Onların temel özellikleri kimyasal olarak, yüksek gözenekli ve yüksek nem gücünün olmasıdır. Bu destek maddeler, bir çözeltiden hidrofobik etkileşim ile makromoleküllerin ayrımına izin veren kısa "aktif grupları" olan hidrofobik ligandlara bağlanarak oldukça iyi bir şekilde modifiye edilmişlerdir (Şekil 2.6). Bir HEK sabit faza protein alıkonma gösterimidir (Mahn, 2012).



Şekil 2.5. HEK' de protein alıkonma mekanizması. (A) Bir HEK temel sabit faz yapısı gösterilmektedir ve protein yüzeyinde hidrofobik gruplar belirtilen bir protein şeması gösterilmektedir. (B) Hidrofobik ligand ile protein etkileşimi. Matriksin hidrofobik ligandları ile proteinin hidrofobik kutupları etkileşmektedir, ve böylece protein tersinir bir şekilde sabit faz ile etkileşmektedir (Mahn, 2012).

Dahası, bir HEK reçine ile bu gibi bir çözelti etkileşime girerse, reçine yüzeyindeki hidrofobik ligand ile makromolekül arasındaki etkileşim, durgun faz HEK'de makromolekülün adsorpsiyonu ile sonuçlanır (Mahn, 2012).

### 2.4.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisine Etki Eden Faktörler

HEK ortamında protein, peptit ve amino asitlerin davranışını etkileyen, ayrımı sırasında ortam şartlarının optimizasyonunda dikkate alınması gereken pek çok faktör vardır. Bunlar:

- Ligandın tipi ve süstitüsyon derecesi
- Ana matriksin özelliği
- İyonik şiddet derişimi ve tipi
- pH etkisi
- Sıcaklık etkisi
- Katkılar (eklenen kimyasal maddeler)

### 2.4.3.1. Ligand Tipi ve Sübstitüsyon Derecesi

Farklı hidrofobisite özelliğine sahip olan ligandlar arasında seçim yapma imkânı çok önemlidir. Bu önemle oldukça hidrofobik proteinler, yüksek hidrofobisiteye sahip olan ligandlar ile kuvvetli bir şekilde bağlanabilirler ki bu durumda desorpsiyon sırasında sert ve potansiyeli yüksek olan denatüre edici elüentlere ihtiyaç duyulur. HEK'de sabit faza immobilize edilen ligandın tipi, protein seçiciliğini belirler. En yaygın kullanılan hidrofobik ligandlar 4 ile 10 karbonlu alkil veya aril gruplarıdır (Jennissen, 2000). HEK'de en fazla kullanılan ligand uç amino grubuna sahip olan veya olmayan doğrusal zincirli alkanlardır. Hidrofobik ve aromatik ( $\pi - \pi$ ) etkileşimlerden dolayı fenil (ve diğer aromatik gruplar) ligand olarak kullanılabilir. Matriks üzerindeki sabit yer değiştirme derecesinde n-alkan ligandları hidrofobik ölçekte homolog seriler oluştururlar (Tanford, 1972):

metil < etil < propil < butil < pentil < heksil < heptil < oktil

Hidrofobisite ve etkileşim gücü n-alkil zinciri uzunluğu arttıkça artar ama adsorpsiyon seçiciliği düşebilir.

### 2.4.3.2. Temel Matriksin Tipi

Yaygın olarak kullanılan matriks tipleri kuvvetli hidrofilik karbohidratlar (örneğin; çapraz bağlı agaroz) veya sentetik kopolimerlerdir. Hidrofilik matriksler istenmeyen non-spesifik adsorpsiyonu minimize ettikleri için tercih edilirler. Ana matriks yine de protein ile etkileşime girebilir, seçiciliği ve protein geri kazanımını etkileyebilir. Kopolimer desteğin seçiciliğinin, aynı tip ligand immobilize agaroz temelli matriksle kıyaslandığında, tamamen aynı olmadığı görülür. Agaroz temelli matrikste, kopolimer matriksteki gibi aynı sonuçları elde etmek için adsorpsiyon ve desorpsiyon şartlarını değiştirmek gerekir. Temel olarak HEK ortamları yüksek oranda çapraz bağlı agaroz matrikslere dayanmaktadır. Çapraz bağlayıcı oran kuvvetlendirilerek mükemmel akış özellikleri ile fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahip olduğu görülmektedir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

### 2.4.3.3. İyonik Şiddet Değişimi ve Tipi

HEK ortamda kullanılan tuz partiküllerinin yeteneği, onların iyonik özelliklerinin ve derişimlerine bağlı olarak hidrofobik etkileşime teşvik eder. Protein çöktürme bir hidrofobik ortam ile hidrofobik protein etkileştiğinde aynı itici güce sahip olduğu

görülmektedir ve yürütülen tamponun iyonik şiddet derişimi artırılarak yükselmektedir (Handbooks from GE Healthcare).

HEK sürecinde, alıkonma bir nötr tuzun öncülüğü tarafından desteklenmektedir. Polar çözücü içeren (su) bir çözeltiye nötr bir tuz eklendiği zaman non-polar bir makromolekül (bir protein gibi) tuz daha uygun olduğunda, hidrate olan su molekülleri için rekabet eden makromoleküller gözlenmektedir. Bir sonuç olarak, yüksek tuz derişimi makromolekülleri çevreleyen çözünen molekül sayısı azalacak, böylece onların arasındaki hidrofobik etkileşim desteklenecektir. Dahası, eğer böyle bir çözelti HEK sabit faz ile etkileşime girerse, makromolekül ile sabit faz yüzeyindeki hidrofobik ligand arasındaki HEK sabit faza makromolekülün adsorpsiyonunu teşviği ile sonuçlanan etkileşim başlayacaktır. Bu sürece bakış açısı, yüksek tuz derişimi varlığında ("salting-out") çözünlük azalacağından dolayı makromolekül çökmesini azaltmak için doğru tuz tipini ve derişimini seçimi temeldir (Mahn, 2012). HEK' de makromolekül alıkonmasında tuz tipinin farklılığının etkisi suyun molal gerilme yüzeyi artışında onların pozitif etkilerine göre Hoffmeister (veya İyotropik) serisini izler (Melander ve Horfvath, 1977). Bunun yanı sıra, anyonlar ve katyonlar kozmotropik ve kaotropik özellikler sergiler. Kozmotropik tuzlar hidrofobik etkileşimi başlatırken, kaotropik tuzlar hidrofobik etkileşimi azaltır. HEK de amonyum sülfat ve sodyum klorür tuzları çok fazla tercih edilmektedir (Mahn, 2012).

Tablo 2.2. Hoffmeister serisi ve bazı anyon ve katyonların etkisi

Hoffmeister Serisi
$\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{K}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{HPO}_4 > \text{NaCl} > \text{LiCl} > \text{KSCN}$
<b>Kozmotropik etki artışı</b> ←
Anyonlar: $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{ClO}_4^-$ , $\text{I}^-$ , $\text{SCN}^-$
<b>Kaotropik etki artışı</b> →
Katyonlar: $\text{NH}_4^+$ , $\text{Rb}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Cs}^+$ , $\text{Li}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$



#### **2.4.3.4. pH Etkisi**

HEK'nin optimum şartlarının belirlenmesinde pH önemli bir ayırma parametresidir. pH değerinde artma, hidrofobik etkileşmeyi zayıflatır. Bu nedenden dolayı proteinlerin hidrofilitesinde bir artış meydana gelir. pH değerinde azalma ise, hidrofobik etkileşmede belirgin bir artış ile sonuçlanır. Dolayısıyla nötr pH'da bağlanmayan proteinler asidik pH'da bağlanabilir. Proteinlerin alıkonması pH 8.5 üzerinde ve/veya pH 5'in altında belirgin bir şekilde değiştiği bulunmuştur ( Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

#### **2.4.3.5. Sıcaklık Etkisi**

HEK' de, sıcaklık artışı protein alıkonmasını artmasını sağlar ve sıcaklık azalması genellikle protein elüsyonunu sağlar. Aslında, HEK entropi-kontrollü bir işlemdir.  $\Delta H$  pozitif veya negatif bir değerde olabileceği için,  $\Delta G$  bir pozitif entropi değişimi tarafından kontrol edilmektedir ve böylece sıcaklık ile artar (Quierioz ve ark., 2001). Eşitlik 2.1.' e ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) göre, HEK adsorbentlerine bağlanan proteinler bir entropi dayalı süreçtir. Sıcaklık proteinlerin konformasyon durumlarını ve onların sulu çözeltideki çözünürlüğünü etkileyebilir. Bu protein alıkonmasında karşıt duruma neden olabilir. HEK' de sıcaklığın rolü çok basit olmasa da, bu parametre etkileşimi zayıflamasını başarmak için ve ılımlı şartlar altında proteinlerin denatüre olmadan ayırmasını sağlamak için kullanılabilir (El Rassi, 1996).

#### **2.4.3.6. Katkılar (Ek Kimyasallar)**

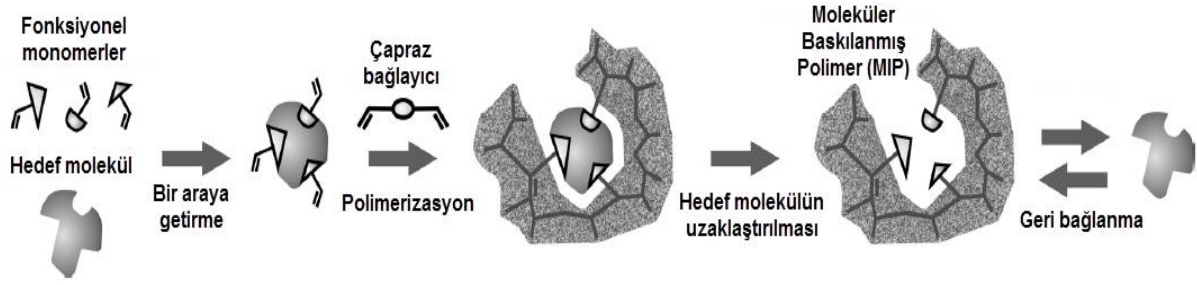
Düşük derişimlerde su ile karışabilir alkoller (etanol veya etilen glikol gibi), deterjanlar ve kaotropik (salting-in) tuzların sulu çözeltileri, protein-ligand arasındaki hidrofobik etkileşimleri zayıflatır ve bağlı proteininin desorpsiyonuna öncülük eder. Alkollerin non-polar kısımlarının ve deterjanların HEK ortamının adsorpsiyon bölgeleri için bağlı proteinlerle yarışması, bağlı proteinlerin yerinden ayrılması ile sonuçlanır. Kaotropik tuzlar suyun ve/veya bağlı proteinlerin dizili yapısını etkiler. Katkılar, suyun yüzey gerilimini azaltarak, hidrofobik etkileşimin zayıflamasına ve ligand-protein kompleksinin ayrılmasına neden olur.

Desorpsiyon sırasında seçiciliği artırmak için katkı içeren desorpsiyon tamponları kullanılmasına rağmen, proteinlerin denatüre olma veya bu kimyasallara yüksek

derişimlerde maruz kalarak inaktive olma riski göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte jel ortamına bağı kuvvetli hidrofobik proteinleri olan HEK kolonlarının temizlenmesinde katkılar çok etkili olabilir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

## **2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi**

Moleküler baskılama, istenilen moleküler hedef ile yüksek afinite ve seçicilik, bağlanma ve tanıma yeteneğı olan polimerik malzemelerin hazırlandığı bir tekniktir. Günümüzde amino asitler, pestisitler, steroidler gibi küçük organik moleküllerin baskılanması rutin hale gelmiştir. Özellikle son yıllarda kimya, biyokimya ve biyoteknolojinin birçok alanında moleküler baskılama dikkat çekici hale gelmiştir (Jiang ve ark., 2007). Bir araştırmacı tarafından tanımladığı gibi: “Sentetik polimerlerde seçilen ligandın tanımlama bölgelerinin yapısı atom, iyon, molekül, kompleks veya mikroorganizmalar gibi hedef molekülün tanınmasını kolaylaştırır. Bu işlem yığın fazın polimerizasyonu veya polikondenzasyon süresince kalıp molekülün bir kısmının veya tamamının tanıma bölgelerinden uzaklaştırılmasıyla ile gerçekleşir” (Cameron ve ark., 2006). Kimya alanında, özellikle analiz ve ayırma biliminde, moleküler baskılanmış malzemeler hedef moleküller için yüksek seçici ve afiniteye sahip olduklarından dolayı ilgi giderek artmaktadır. Genellikle moleküler baskılanmış polimerler (MIPIer) olarak adlandırılan moleküler baskılanmış malzemeler, spesifik moleküler tanımlama kabiliyeti ve yapının yeniden düzenlenmesiyle yapay olarak sentezlenirler (LQ ve ark., 2006). MIPIer non-kovalent, kovalent ve yarı-kovalent olmak üzere üç farklı baskılama yöntemi ile sentezlenebilir. Bu protokollerin tümünde, kalıp molekül uygun monomer fonksiyonel ile spesifik olarak etkileşir (Caro ve ark., 2006). Baskılama tekniğinde, uygun boyut, şekil ve kimyasal çevre ile baskılanmış kavite içerir bir malzeme hedef molekülün seçici olarak geri bağlandığı kalıp molekülün uzaklaştırılması ile sonuçlanır (Alfonso ve ark., 2006). MIPIer’in sentezi ve tanımlanma işlemi Şekil 2.7.’ de gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Moleküler baskılama işleminin şematik olarak gösterimi.

Moleküler baskılama yöntemi ile fonksiyonel tanıma bölgeleri kalıp moleküle oldukça yüksek seçicilik göstermektedir. Moleküler baskılama yöntemi, ilk defa 1972'de Gunter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanmış ve sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Wulff ve ark., 1987).

Moleküler baskılanmış polimerler; moleküler tanımaya elverişli, ucuz ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi zorlu şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilirler (Rao ve ark., 2004; Ensing ve ark., 2001; Piletsky ve ark., 2004).

Moleküler baskılama yöntemi temelde üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.7.):

1) *Ön-kompleksleşme*: Uygun fonksiyonel gruba sahip ve polimerleşebilen monomer, ilgilenilen analitle (hedef molekül/kalıp) kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle kompleks oluşturur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.

2) *Polimerizasyon*: Monomer-analit kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

3) *Analit molekülünün uzaklaştırılması*: Analit molekülünün uzaklaştırılmasına uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan analit molekülü

uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik (büyüklük, şekil ve üç boyutlu yapı) olarak seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.

Moleküler baskılama işleminde; fonksiyonel monomer, analit (baskılanacak molekül veya iyon), çapraz bağlayıcı, polimerizasyon için çözücü ve başlatıcı kullanılır. Etkili bir baskılama elde edebilmek için bu parametrelerin seçimi önemlidir.

*Fonksiyonel Monomerler:* Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Kovalent olmayan moleküler baskılamada baskılamanın gerçekleşmesi için genellikle daha fazla miktarda baskılanacak molekül kullanılır. Kompleks oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerin fonksiyonelliği ile baskılanacak molekülün veya iyonun fonksiyonelliğinin uyuşması çok önemlidir. Kovalent baskılamada, kalıp molekül vinil gruplarına kovalent olarak bağlanır. Akrilik amino asitleri ve esterleri veya metakrilik asit en sık kullanılan monomerlerdir. Kovalent olmayan baskılamada, uygun fonksiyonel gruplara bağlı vinil monomerleri kullanır (Komiya ve ark., 2003).

*Çapraz Bağlayıcılar:* Baskılanmış polimerlerde çapraz bağlayıcılar öncelikle polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinin de mekanik kararlılığının olmasını sağlar. Kalıcı gözenekli (makrogözenekli) polimer elde edebilmek ve polimerin yeteri kadar mekanik kararlılığının olması için genellikle yüksek çapraz bağlama oranı tercih edilir. Polimerlerde çapraz bağlama oranı % 80'i aşmaktadır. Yüksek oranda çapraz bağlama, aynı zamanda baskılanmış polimerin çözücüde çözünmesini önler ve baskılanmış polimerlerin kullanımını kolaylaştırır. Etkili bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktifliği uygun olmalıdır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı ajan baskın olduğunda kopolimerizasyon etkili bir şekilde gerçekleşmez (Cormack ve Elorza, 2004). Fonksiyonel monomerden oluşan fonksiyonel artıklar polimer ağında düzgün bir şekilde dağılır. Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere

olan mol oranı önemlidir. Eğer bu oran çok düşük ise, konuk bağlanma bölümleri birbirine çok yakın kurulursa bunlar bağımsız olarak çalışamazlar. Bir taraftaki konuk bağlanma komşusundaki konuk bağlanmayı engeller. Son derece yüksek mol oranlarında ise özellikle çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomer ve/veya baskılanan molekül ile kovalent olmayan etkileşimde baskılama etkisi zarar görür. Fazla miktarda çapraz bağlayıcı olduğunda polimerizasyon baskılanacak molekül etrafında gerçekleşir (Chapuis ve ark., 2004).

*Analitin Özellikleri:* Baskılanan molekül için önemli olan parametreler; baskılanan molekülün polimerleşebilecek grup içerip içermediği, serbest radikal polimerizasyonunu engelleyecek veya yavaşlatacak grubun olup olmadığı (tiyol grubu ya da hidrokinon grubu), yüksek sıcaklıklarda baskılanan molekülün kararlı olup olmadığıdır (başlatıcı olarak AIBN kullanılmışsa sıcaklık 60 °C dolaylarında olmalıdır). Özellikle eser miktarda etkili ayırma ve zenginleştirme için baskılanacak molekülün kantitatif olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir. Baskılanan molekül olarak iyon kullanıldığında polimerik adsorbentin seçiciliği, baskılanmış iyonun yüküne, boyutuna, koordinasyon sayısına ve geometrisine bağlıdır (Cormack ve Mosbach, 1999).

*Çözücüler:* Çözücü, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını; gözenekli polimerde ise gözeneklerin oluşmasını sağlar. Bu nedenle çözücüye genellikle “gözenek oluşturucu” (porojen) denir. Makro gözenekli polimerin hazırlanma aşamasında, çözücü gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmede önemli bir unsurdur. Çözücünün bu iki görevi yanında kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu arttırma gibi bir görevi de vardır. Gözeneklilik polimerden konuk bağının bırakılmasını kolaylaştırır. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerlerin içine dahil edilir ve son işlemlerle uzaklaştırılır. Bu işlemler süresince, boşluk çözücü molekülleri tarafından polimerde gözenek olarak bulunur (Cormack ve Elorza, 2004). Çözücü bakımından az olarak hazırlanan polimer çok sert-yoğun olur ve güçlükle

baskılanacak molekülü bağlar. Çözücünün diğer bir rolü ise polimerizasyon reaksiyonu oluşurken sıcaklığı dağıtmasıdır. Aksi takdirde, reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak çok yüksek olur ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşur. Çözücünün seçimi baskılamamanın türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada tüm bileşenleri iyi bir şekilde çözdüğü müddetçe birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada ise, fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşiminin oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için çözücü seçimi daha önemlidir (Komiya ve ark., 2003).

*Başlatıcılar:* Kompleksleşmenin hidrojen bağı ile gerçekleştiği durumlarda düşük polimerizasyon sıcaklığı tercih edilir ve bu şartlarda düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal olarak aktif olan başlatıcılar tercih edilir. Azobisisobutyronitril (AIBN), benzoilperoksit (BPO), azobisdimetilvaleronitril (ABDV), 4,4'-azo-(4-siyanoverik asit) yaygın olarak kullanılan başlatıcılardır (Cormack ve Elorza, 2004).

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağına göre ikiye ayrılır: Kovalent baskılama ve non-kovalent baskılama.

### **2.5.1. Kovalent Baskılama**

Polimerizasyon işleminden önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent etkileşim gerçekleşir (Kriz ve ark., 1997). Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp kısmı oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur.

### **2.5.2. Non-Kovalent Baskılama**

Non-kovalent yaklaşım Arshady ve Mosbach tarafından tanımlanmıştır. Polimerizasyon işleminden önce hedef molekül ve seçilen monomerler arasında kısmen zayıf non-kovalent etkileşimlere dayanmaktadır (Arshady ve Mosbach 1981). Non-kovalent baskılamada çözeltideki kalıp molekül ile fonksiyonel monomerleri bir araya getirmek için hidrojen bağları, iyon çiftleri, dipol-dipol etkileşimleri ve van der Waals kuvvetleri gibi tipik moleküler arası kuvvetler kullanılır (Mayes ve Whitcombe, 2005). Günümüzde non-kovalent yaklaşım kalıp molekülün uzaklaştırılması ve çok sayıda yüksek afinite bölgesi içermesinden

dolayı en geniş çapta kullanılan temel bir işlemdir (Jiang ve ark., 2007). Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır.

## **2.6. Kriyojeller**

Makrogözenekli polimerik malzemeler biyoteknolojide, biyotıpta ve eczacılık biliminde büyük ilgi görmektedir (Hentze ve Antonietti, 2002). Modern teknolojiye farklı polimer ve polimerik malzemelerin geniş çapta kullanıldığı çok iyi bir şekilde bilinmektedir. Bunlar; plastik kaplar, parçalar, çeşitli kromatografik matrisler, elektroforetik işlemler için farklı jeller, immüno test için jeller, çeşitli çözülebilir polimerler gibi bu örnekler çoğaltılabilir. Genele bakıldığında şu söylenebilir, polimerik malzemeler olmaksızın biyoteknolojinin çalışma ve süreçlerinin tamamlanması mümkün değildir (Lozinsky, 2004). Biyoteknolojide oldukça büyük potansiyeli ile polimer jellerin yeni oluşumlarından biri 'kriyojeller'dir (Yunanca'da donma veya buz anlamına gelen krios (kryos) kelimesinden gelmektedir) (Lozinsky, 2002). Kriyojeller kriyojenik işlemin bir sonucu olarak oluşmaktadır (Lozinsky ve ark., 2003).

Kriyojeller, monomerik veya polimerik başlatıcıların kısmi olarak donmuş çözeltilerinden hazırlanan jel matrislerdir. Kriyojeller tipik olarak, birbiri ile bağlantılı makrogözeneklere (veya süper makrogözeneklere) sahiptirler. Yapıdaki birbiri ile bağlantılı makrogözenekler difüzyon engellemesini ortadan kaldırarak değişen büyüklükteki moleküllerin akışına olanak tanır ve nano veya mikro boyuttaki partiküllerin kütle transferine izin verir. Kriyojellerin bu eşsiz özellikleri, ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları ile de bir araya gelince, onları biyolojik uygulamalar için iyi bir destek malzemesi haline getirmiştir (Lozinsky ve ark., 2003).

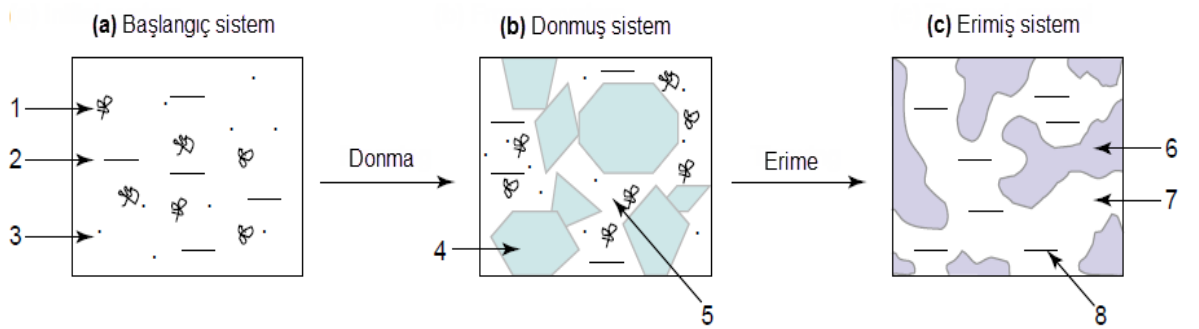
Günümüzde, polimerik jeller kromatografik malzemelerin kullanıldığı biyoteknolojinin farklı alanlarında uygulanmaktadır (Lozinsky ve ark., 2003).

Kriyojeller ilk olarak yaklaşık 40 yıl önce rapor edilmiştir ve geleneksel polimerlerden daha üstün kılan özellikleri sayesinde çok fazla ilgi görmüştür.

Günümüzde oluşum mekanizması ve yapısı büyük oranda aydınlatılmıştır (Lozinsky ve ark., 2003).

### 2.6.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Kriyotropik jelleşme sırasında, jel oluşturucu ajanları içeren reaksiyon karışımı çözücünün donma noktasının birkaç derece altındaki sıcaklıklarda dondurulur. Donmuş sistem, tek bir katı blok halinde görünmesine rağmen, aslında heterojendir. Donmuş çözücü (genellikle su) kristalleri boyunca donmamış sıvı mikro fazı (monomer/polimer ve başlatıcılar) içerir. Jel oluşturucu ajanlar donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşmış hale gelerek, burada kriyoderişme oluşur. Donmamış sıvı mikro faz toplam başlangıç hacminin çok küçük bir kısmını oluşturur, jel oluşturucu ajanların derişiminin hızla artması, jel oluşumunu tetikleyerek jelleşme hızını artırır. Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev görür. Bu kristaller eriyerek geride çözücü ile dolu boşluklar, makro gözenekler bırakır. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey gerilimi gözeneklerin şeklini yuvarlar ve gözenek yüzeyini pürüzsüz hale getirir. Donma sırasında, çözücü kristalleri, diğer kristaller ile birleşinceye kadar büyüdüğünden, erimedenden sonra jel içinde birbiri ile bağlantılı gözenekler oluşur. Gözeneklerin boyutları ve şekilleri birçok etkene bağlıdır. Bunlardan en önemlileri başlatıcıların derişimi ve kriyojenik muamele rejimidir. Kriyojelin polimer fazı ayrıca, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikrogözeneklere sahiptir. Böylece kriyojeller hem heterofaz, hem de hetero gözenek yapısına sahiptir (Lozinsky ve ark., 2003).



Şekil 2.7. Kriyojellasyon süreci: 1. çözücüdeki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makro gözenekler; 8. çözücü (Lozinsky ve ark. 2003).



Kriyojellerin eşsiz olmalarının nedeni çok basit bir yöntemle hazırlanmaları, polimerin çeşidine bağlı olarak çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek birbiriyle bağlantılı büyük ve açık gözenek ağına sahip yapıların elde edilmesine olanak vermesidir. Polimer matrisin gözenek boyutu 10 µm ile 200 µm arasında değişebilir.

Polimerik kriyojellerin biyoayırma bakımından en dikkat çekici noktaları, donmuş çözücü sistemine ait makrogözeneklerle, makrogözenekleri oluşturan polimerler arasındaki mikrogözeneklerin birleşmesidir. Bu yapısal özellik, donan çözücü sistemine ait kristallerin diğer kristal parçacıklarının sınırlarına ulaşana kadar genişleme eğilimlerinin bir sonucudur. Sonuç olarak, donmuş örnekteki polikristalin faz sürekli bir yapıdır ve bu yapının çözülmesi birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir sistem meydana getirir.



Şekil 2.8. Kartuş şeklinde hazırlanan Poli(HEMA/MAPA) süpermakrogözenekli membran kriyojel.

### **3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

#### **3.1. Deneysel Malzemeler**

Kriyojellerin hazırlanmasında temel bileşen olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N-metilen bisakrilamid (MBAAm) Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/N,N,N',N'-tetra-metiletildiamin (TEMED) ve amonyumpersülfat (APS) Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Kalıp molekül L-Phe, Kyowa Hakko Kogyo Co, Ltd (Japonya) firmasından analitik saflıkta temin edilmiştir. MAPA monomerinin sentezi laboratuvarında yapılmıştır ve metakroil klorür Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır. Seçicilik deneyleri için kullanılan D-Phe, L-Trp, D-Trp amino asitleri Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından analitik saflıkta temin edilmiştir.

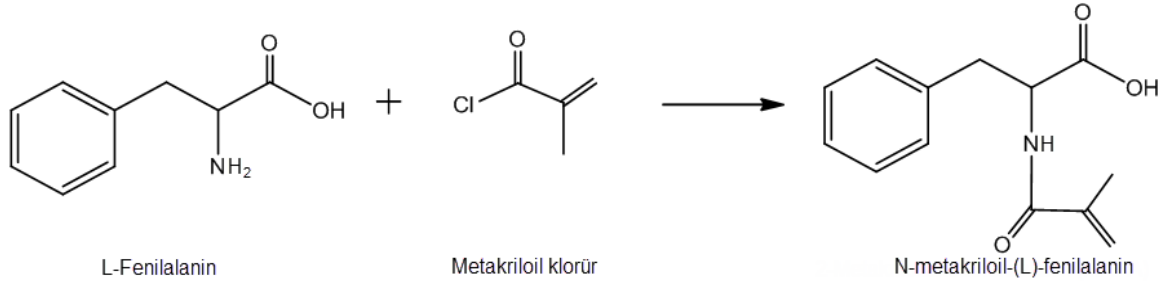
Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters osmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

#### **3.2. Kriyojellerin Hazırlanması**

L-Phe baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin sentezinden önce fonksiyonel monomer olan MAPA monomerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra süpermakrogözenekli poli(HEMA/MAPA) kriyojelleri sentezlenmiştir.

##### **3.2.1. MAPA Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu**

N-Metakriloil-(L)-Fenilalanin (MAPA) monomerinin sentezi için uygulanan deneysel süreç şu şekildedir: Fenilalanin (5.0 g) ve NaNO<sub>2</sub> (0.2 g), 30 mL K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sulu çözeltisinde (5%, w/v) çözülmüştür. Bu çözelti 0°C nin altında soğutulmuştur. Metakriloil klorür (4.0 mL), azot atmosferi altında hazırlanan çözeltiliye yavaş bir şekilde eklenmiş ve daha sonra çözelti oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır. Bu kimyasal reaksiyon periyodu sonunda, çözeltinin pH'sı 7.0'ye ayarlanarak çözelti etil asetat ile ayrılmıştır. Sulu faz buharlaştırılmıştır. Artık (yani MAPA) eter ve sikloheksanda kristallendirilmiştir.



Şekil 3.1. N-metakriiloil-(L)-fenilalanin (MAPA) monomerinin sentezi

### 3.2.2. Poli(HEMA/MAPA) Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması

Baskılanmamış poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin (NIP); hazırlanmasında izlenen yöntem şu şekildedir: 0.273 g N,N-metilen bisakrilamid (MBAAm), 10 mL suda çözülmüştür. 1.30 mL HEMA çözünen MBAAm içerisine eklenerek karıştırılmıştır. 51 µL MAPA, 5 mL suda çözülmüş ve monomer karışımına eklenmiştir. Karışımın manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmasına devam edilmiştir. Daha sonra içerisine 20 mg amonyum persülfat (APS) ve 25 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) eklenmiş ve iki cam arasına hızlı ve dikkatli bir şekilde aktarılmıştır. Polimerizasyon -12°C'de 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu süre tamamlandıktan sonra iki cam arasında oluşan kriyojel oda sıcaklığına getirildikten sonra cam yüzeyinden ayrımı sağlanarak kartuş boyutuna uygun bir şekilde kesilmiştir. Reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer artıkların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller sürekli olarak su ile yıkanmıştır.

Buna ek olarak kontrol PHEMA kriyojeller de ortama fonksiyonel monomer MAPA eklenmeden aynı yöntemle sentezlenmiştir.

### 3.2.3. L-Fenilalanin Baskılanmış Poli(HEMA/MAPA) Süpermakro-gözenekli Kriyojellerin Hazırlanması

L-Fenilalanin baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojeller (MIP), MAPA monomerinin oranları değiştirilerek üç farklı şekilde sentezlenmiştir. Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin hazırlanmasında izlenen yöntem şu şekildedir: 0.273 g N,N-metilen bisakrilamid (MBAAm), 10 mL suda çözülmüştür. 1.30 mL HEMA, çözünen MBAAm içerisine eklenerek karıştırılmıştır. L-Phe (14 mg) 5 mL suda çözülerek üç farklı oranda (51, 102 ve 153 µL) MAPA içerisine eklenmiştir. Kompleks karışımı monomer karışımına içerisine eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırmaya devam

edilmiştir. Daha sonra içerisine 150 µL (0.1 mg/mL) APS ve 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin (TEMED) eklenmiş ve iki cam arasına hızlı ve dikkatli bir şekilde aktarılmıştır. Polimerizasyon -12 °C de 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu süre tamamlandıktan sonra iki cam arasında oluşan kriyojel oda sıcaklığına getirildikten sonra cam yüzeyinden ayrımı sağlanarak kartuş boyutuna uygun bir şekilde kesilmiştir. Reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer artıkların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller sürekli olarak su ile yıkanarak L-Phe baskılanmış (MIP) poli(HEMA/MAPA) süpermakrogözenekli kriyojeller sentezlenmiştir.

Tablo 3.1. Farklı oranlarda hazırlanan L-Phe/MAPA polimerlerinin gösterimi.

Polimer kodu	L-Phe : MAPA	
	Oranı (mol:mol)	Miktarı
MIP-A	1:1	14 mg/51 µL
MIP-B	1:2	14 mg/102 µL
MIP-C	1:3	14 mg/153 µL
MIP-A2	1:1	2.5x
MIP-A3	1:1	5x
MIP-A4	1:1	10x

Kalıp molekül miktarı optimizasyon çalışmaları için aşağıdaki yöntem izlenmiştir; öncelikle MIP-A, MIP-B ve MIP-C kriyojellerinin kalıp molekülün uzaklaştırılması ve sulu çözeltiden L-Phe adsorpsiyon kapasiteleri belirlendikten sonra en verimli çalışan kriyojel MIP-A olarak belirlenmiştir. Daha sonra 1:1 mol oranındaki MIP-A kriyojelinin içindeki kalıp molekül miktarı 2.5, 5 ve 10 kat arttırılarak üç farklı kriyojel daha yukarıda belirtilen yöntemle hazırlanmıştır. Sentezlenmesi planlanan kriyojellerden 5 kat ve 10 kat fazla kalıp molekül içeren kriyojeller kalıp molekül

miktarının fazla gelmesi sonucu uygun yapıda sentezlenememiştir. 2.5 kat kalıp molekül içeren kriyojel MIP-A2 olarak adlandırılmıştır.

### **3.3. Kriyojellerin Karakterizasyonu**

Sentezlenen süpermakrogözenekli kriyojellerin karakterizasyonu FTIR, BET, SEM ve şişme deneyleri ile yapılmıştır.

#### **3.3.1. FTIR Spektrofotometre Analizi**

FTIR ile yapı analizi yapılmıştır. NIP ve MIP kriyojellerin yapısı FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) ile incelenmiştir. Analiz yapılmadan önce kriyojeller etüvde kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının elde edilmesi için 2 mg kurutulmuş kriyojel örneği alınıp 98 mg FTIR saflığında KBr ile karıştırılarak havanda dövülerek öğütülmüş ve hidrolik kalıpta  $600 \text{ kg/cm}^2$  basınçta ince pelet haline getirilmiştir. Hazırlanan peletin  $4600\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında spektrumları alınmıştır.

#### **3.3.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET)**

Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı, yüzey alanı ölçüm cihazı (Quantachrome NOVA 2000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümlerde adsorplanan gaz azottur (Saflık % 99.99). Sıvı azot sıcaklığı 77 K'dir. Örnekten gaz uzaklaştırma işlemi vakumda  $154^\circ\text{C}$  sıcaklıkta 5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.3. Yüzey Morfolojisi**

L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA); MIP kriyojellerinin yüzey ve yığın yapılarının belirlenmesi için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. Şişen kriyojeller  $-50^\circ\text{C}$ ' de dondurularak liyofilizatör (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) de kurutulmuştur. Daha sonra örnekler altın-paladyum (40:60) ile kaplandıktan sonra SEM fotoğrafları JEOL, JEM 1200EX, (Tokyo, Japonya) kullanılarak alınmıştır.

#### **3.3.4. Şişme Deneyi**

Poli(HEMA/MAPA) kriyojel sistemin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru kriyojeller  $\pm 0.0001$  duyarlılıkla tartılarak 50

mL saf su içeren bir behere konulmuştur. Sabit sıcaklıkta  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'da 2 saat bekletildikten sonra ortamdaki ve alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak tartımı yapılmıştır. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik yardımı ile poli(PHEMA/MAPA) kriyojel membranın su içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

$W_0$  ve  $W_s$  sırası ile kriyojelin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin makrogözenek miktarının belirlenmesi için ise aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır. İlk olarak denge şişme oranına ulaşılmış olan kriyojel örnekleri tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel örneği hassas bir şekilde sıkılarak kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan su uzaklaştırılmış ve tartılmıştır. Kriyojellerin sahip olduğu makrogözenek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte  $W_1$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin ağırlığını (g) ifade ederken,  $W_2$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

### **3.4. Kalıp Molekülün (L-Phe) Polimerden Uzaklaştırılması**

Farklı monomer oranları kullanılarak L-Phe baskılanmış polimerlerden, L-Phe; %50 (v/v) etilenglikol/ $\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla 10 mL hacimde desorpsiyon ajanı sürekli sistemde kolondan geçirilmiştir. Optimum desorpsiyon süresinin belirlenmesi için belirli aralıklarda örnekler alınarak maksimum desorpsiyon oranı incelenmiştir. L-Phe'nin polimerden uzaklaştırılması için gerekli desorpsiyon süresi iki saat olarak belirlenmiştir.

### **3.5. L-Phe Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları**

L-fenilalaninin tanınması için hazırlanan kartuş membranlar ile tüm adsorpsiyon çalışmaları sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.). L-fenilalaninin en uygun ve maksimum adsorpsiyon göstereceği çalışma şartları pH, sıcaklık, akış

hızı, iyonik şiddet etkisi, iyon türü etkisi ve L-Fenilalanin derişim etkisi çalışmaları MIP-A polimeri kullanılarak belirlenmiştir. L-Phe derişim tayini UV spektrofotometre cihazı kullanılarak uygun dalga boyunda (548 nm) absorbands değerlerine ulaşarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Membran kartuşlarının ve sürekli sistemin optik fotoğrafları.

### 3.5.1. pH Değişiminin Adsorpsiyona Etkisi

Kalıp molekül L-Phe'nin en uygun adsorpsiyon gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 4.0; 5.0; 5.48; 6.0; 7.0) adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH 4.0-6.0 için 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa-CH<sub>3</sub>COOH tamponu; pH 7.0 için 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu kullanılmıştır. L-Phe'in belirlenen pH tamponlarında 5 mL hacimde sulu çözeltileri hazırlanmıştır (1.5 mg/mL). Daha sonra MIP-A polimeri kullanılarak adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.2. L-Phe Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

L-Phe' nin en uygun adsorpsiyon gösterdiği derişim değerinin belirlenmesi için farklı derişimlerde (0.1-3.0 mg/mL) sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları her derişimdeki çözelti için iki saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıç ve sonuç örnekleri alınarak uygun adsorpsiyonun gözlemlendiği derişim değeri belirlenmiştir. Amino asit adsorpsiyon miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q = [(C_i - C_f)V]/m \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte;

Q: adsorpsiyon kapasitesi, C<sub>i</sub> ve C<sub>f</sub>: başlangıç ve son Phe' in derişimleri (mg/mL), V: çözelti hacmi (mL), m: kriyojel kütlesi (g)' dir.

### 3.5.3. Akış Hızının Adsorpsiyona Etkisi

Sürekli sistemde akış hızı, 0.5 – 3.0 mL/dk arasında değiştirilerek akış hızının adsorpsiyon miktarına etkisi incelenmiştir. Ortam pH'sı 5.48 ve L-Phe derişimi 1.5 mg/mL olarak seçilmiştir. Adsorpsiyon süresi 2 saat olarak uygulanmıştır.

### 3.5.4. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi

Sıcaklığın adsorpsiyon miktarına etkisini incelemek üzere adsorpsiyon deneyleri 4-40 °C arasında çalışılmıştır. Bu grup deneylerde L-Phe derişimi 1.5 mg/mL, pH 5.48'dir. Adsorpsiyon süresi 2 saat olarak uygulanmıştır.



### 3.5.5. İyonik Şiddetin Adsorpsiyona Etkisi

İyonik şiddetin adsorpsiyon miktarına etkisi NaCl derişimi 0.001-0.1 M arasında değiştirilerek incelenmiştir. İyon türünün etkisi ise 0.1 M derişimde NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak incelenmiştir. L-Phe derişimi 1.5 mg/mL mg/mL, pH 5.48 ve adsorpsiyon süresi 2 saat olarak uygulanmıştır.

### 3.5.6. Seçicilik Deneylei

Seçicilik çalışmaları hidrofobik özellik taşıyan L-triptofan (L-Trp), D-triptofan (D-Trp) amino asitleri ve L-Phe'nin enantiyomeri D-fenilalanin (D-Phe) kullanılarak belirlenmiştir. Seçicilik için seçilen amino asitlerin sulu çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış ve sürekli sistemde iki saat boyunca membranlardan geçirilmiştir. Adsorplanan amino asit miktarları UV spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır. Dalgaboyu taraması sonucunda kullanılan dalgaboyları D/L-Phe için 258 nm; D/L-Trp için 280 nm olarak belirlenmiştir.

L-Trp, D-Trp ve D-Phe için L-Phe'ye göre dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (3.4)$$

Eşitlikte K<sub>d</sub> dağılıma katsayısını (mL/g); C<sub>i</sub> ve C<sub>f</sub>, moleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/mL); V, kullanılan çözeltili hacmini (mL) ve m, kullanılan kriyojel membranın kütlesini (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı türler varlığında bir amino asit molekülünün bağlanması için seçicilik katsayısı Eşitlik 3.4'e göre denge bağlanma verilerinden elde edilebilir.

$$K = K_{d,kalıp}/K_{d,girişimci} \quad (3.5)$$

Baskılanmış adsorbentle diğer amino asitlerin k değerleri, baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak verir. Bağlı seçicilik katsayısı aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

$$k' = k_{mıp}/k_{nıp} \quad (3.6)$$

### 3.5.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerden L-Phe desorpsiyonu, %50 (v/v) etilen glikol/su çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L-Phe adsorplanmış kriyojellerden 1.0 mL/dak akış hızında, oda sıcaklığında 2 saat süre ile desorpsiyon ajanı kolondan geçirilmiş, amino asit derişimi 258 nm'de UV dedektör ile belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı adsorplanan ve desorbe olan L-Phe miktarından aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

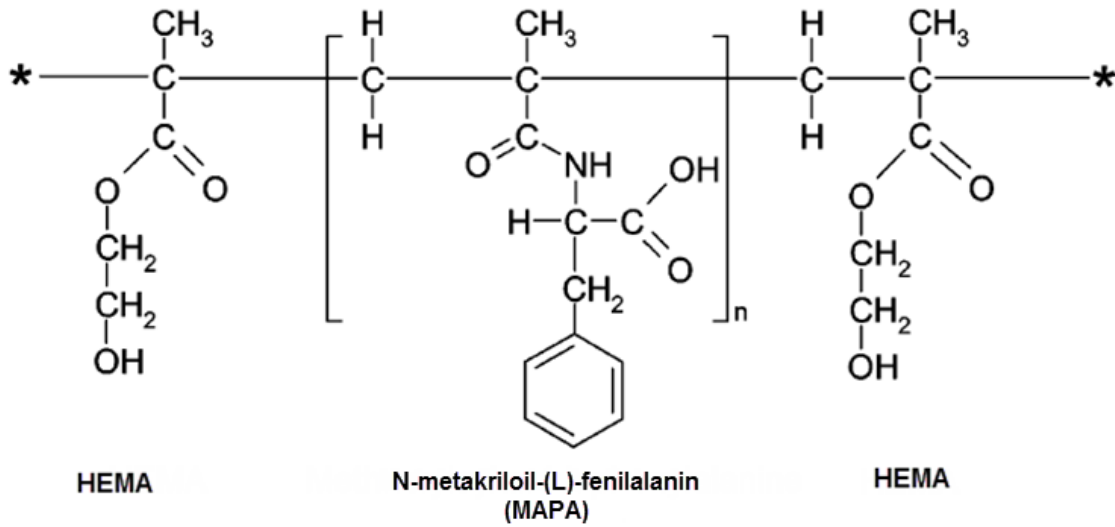
$$\text{Desorpsiyon \%} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan L-Phe}}{\text{Adsorplanan L-Phe miktarı}} \times 100\% \quad (3.7)$$

Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla aynı kriyojel 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Deneysel yöntem yukarıda verildiği gibi uygulanmıştır.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

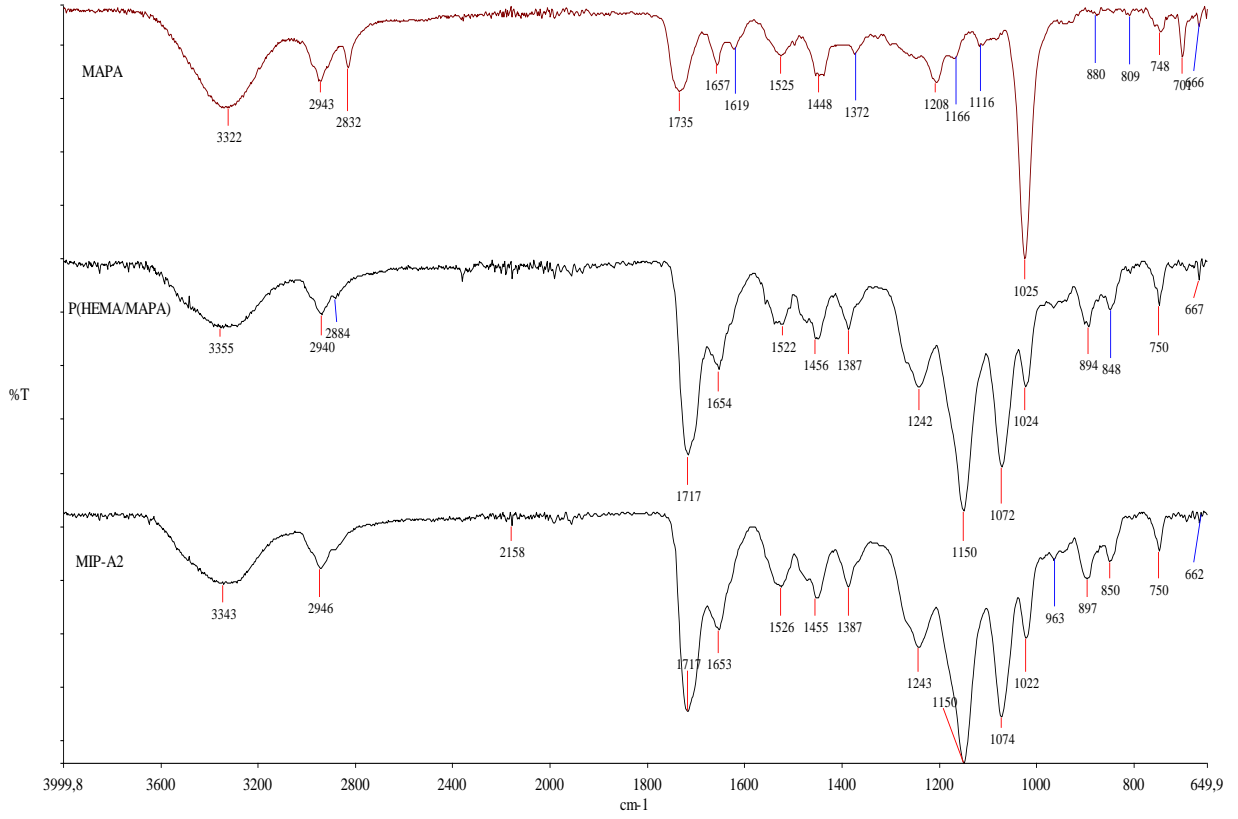
L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin sentezinden önce, hidrofobik amino asit içeren MAPA monomeri L-Phe ve metakrilol klorür kullanılarak sentezlenmiştir. Daha sonra MAPA ve HEMA kullanılarak poli(HEMA/MAPA) kriyojeller sentezlenmiştir. Poli(HEMA/MAPA)'nın kimyasal yapısı Şekil 4.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Poli(HEMA/MAPA) kriyojelin olası kimyasal yapısı

#### 4.1.1. FTIR ile Yapı Analizi

Kriyojellerin kimyasal yapılarının analizleri için FTIR spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlara, otomatik zemin düzeltmesi ve spektrum düzgünleştirilmesi işlemleri uygulanmıştır. MAPA monomerinin yapıya girip girmediğinin belirlenmesi amacıyla MAPA monomerinin, NIP kriyojellerin ve MIP-A2 kriyojellerin FTIR spektrumları alınmış ve Şekil 4.2'de verilmiştir. HEMA monomerinin yapısında bulunan; -OH ve -C=O gruplarının gerilme bantları sırasıyla 3400 cm<sup>-1</sup> ve 1700 cm<sup>-1</sup> civarlarında görülmektedir. MAPA monomerinin yapısında bulunan aromatik halkadan kaynaklı 1600 cm<sup>-1</sup> civarındaki C=C gerilmeleri bantları ve 1500 cm<sup>-1</sup> civarında aromatik C-H halka bükülmesi piki spektrumlar arasındaki farklı fonksiyonel grupları göstermektedir.



Şekil 4.2. MAPA monomeri, NIP ve MIP-A2 kriyojellerinin FTIR spektrumları.

#### 4.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET)

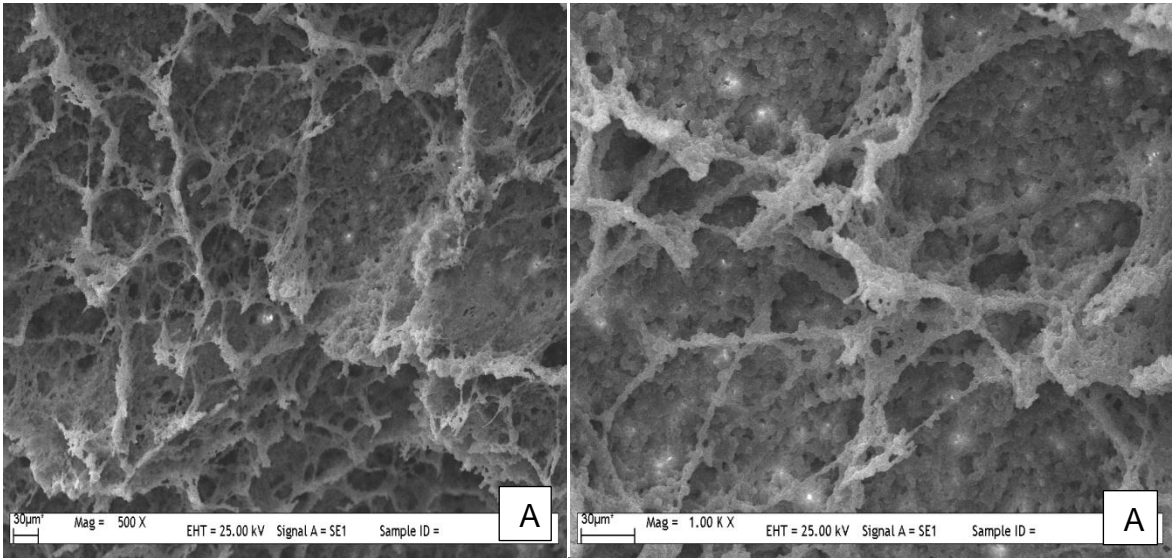
Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı moleküler baskılanmış polimerlerde önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.005-1.0 arası bağıl basınçları ( $P/P_0$ ) ile ölçülmüştür. PHEMA, NIP ve MIP kriyojellerin spesifik yüzey alanları  $34.0 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $37.1 \text{ m}^2/\text{g}$  ve  $36.2 \text{ m}^2/\text{g}$  olarak bulunmuştur. Baskılanma işlemi, spesifik yüzey alanının artmasına sebep olmuştur. Bu durumun temel sebebi; kriyopolimerizasyon sırasında hidrofobik L-Phe amino asitinin varlığıdır. Baskılanmış kriyojellerde L-Phe'ye spesifik kavite oluşumu gözenek alanının artmasına neden olmuştur. Ayrıca süpermakrogözenekli kriyojeller L-Phe'nin kolayca difüze olabileceği gözeneklere sahiptir.

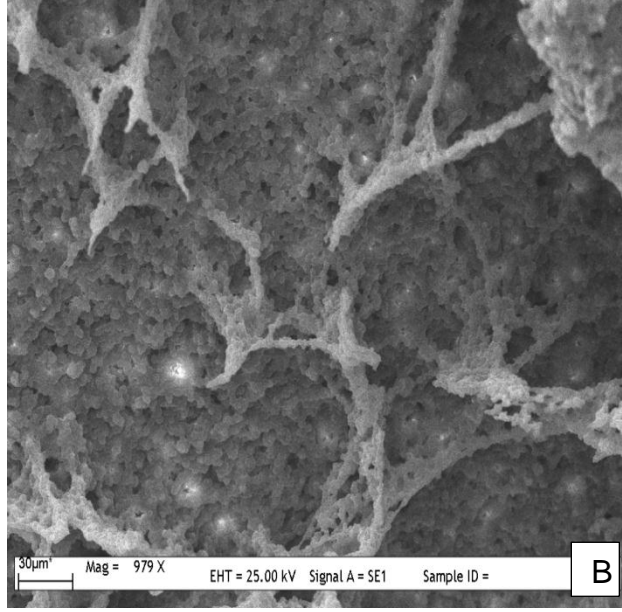
Tablo 4.1. PHEMA, NIP ve MIP-A2 kriyojellerin yüzey alanı.

Polimer kodu	Yüzey Alanı, m <sup>2</sup> /g
MIP-A2	36.2
NIP	37.1
PHEMA	34.3

#### 4.1.3. Yüzey Morfolojisi (SEM)

L-Phe baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin yüzey morfolojisi ve içyapısı optik ve elektron mikroskop fotoğrafları ile incelenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin SEM fotoğrafları Şekil 4.6' da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, kriyojeller birbiriyle bağlantılı süpermakrogözenekli akış kanallarına sahiptir. Gözeneklerin boyutu 150-200 µm'ye kadar ulaşmaktadır. Bu gözenekli yapı, kalıp molekül L-Phe ve diğer amino asitlerin kriyojel içerisine kolayca difüze olmasına olanak sağlamaktadır.





Şekil 4.3. Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin SEM fotoğrafları. (A) baskılanmış kriyojel ve (B) baskılanmamış kriyojel.

#### 4.1.4. Şişme Deneyi

L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojeller, çapraz bağlı hidrofilik yapıdadır. Bu çalışmada hazırlanan PHEMA, NIP ve MIPA2 kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 88.0, % 82.6 ve % 78.2' dir (Tablo 4.3.). Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 76.2, % 74.0 ve % 74.0'tür. Yapıya MAPA girmesi ile denge şişme oranının her iki durumda da azaldığı gözlenmektedir. Bu sonuç polimerik yapıdaki hidrofobik MAPA monomerinin varlığından kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.2. PHEMA, NIP ve MIP-A2 için denge şişme ve makrogözenek oranları.

Polimer kodu	Şişme oranı %	Makrogözenek oranı %
MIP-A2	78.2	74.0
NIP	82.6	74.0
PHEMA	88.0	76.2

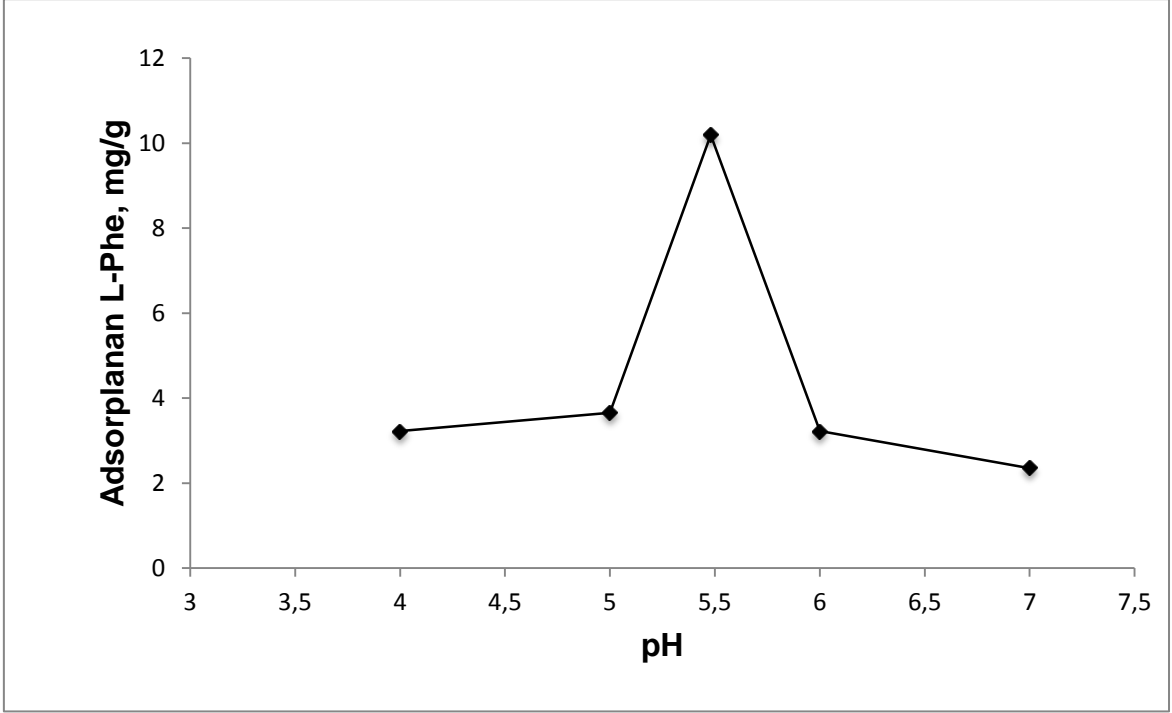
## **4.2. Kalıp Molekülün (L-Phe) Polimerden Uzaklaştırılması**

Kalıp molekül L-Phe'nin desorpsiyonu %50 (v/v) etilen glikol sulu çözeltisi ile yapılmıştır. Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül oranı 1:1 oranında hazırlanan MIP-A ve MIP-A2 (% 91) kriyojellerinde MIP-B (% 47.2) ve MIP-C (%43.0) kriyojellerine göre daha iyi desorpsiyon sonucu elde edilmiştir. Ortamdaki fonksiyonel monomer oranının artmasıyla kalıp molekülle etkileşim derecesinin artması sonucunda hedef molekül kalıptan daha düşük oranlarda uzaklaştırılmıştır (Uzun ve ark., 2009). Bunun sonucu olarak düşük mol oranına (1:1) sahip MIP-A ve MIP-A2 kriyojelinden yüksek oranda kalıp molekül uzaklaştırılmıştır.

## **4.3. L-Phe Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları**

### **4.3.1. pH Değişiminin Adsorpsiyona Etkisi**

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ortam pH'sı önemli bir ayırma parametresidir. pH değerindeki artış hidrofobik etkileşimlerin azalmasına neden olur. Diğer taraftan pH değerinde azalma hidrofobik etkileşimde belirgin bir artışla sonuçlanır (Özkara, 2009). L-Phe'nin en yüksek adsorpsiyon gösterdiği pH değerini belirlemek üzere adsorpsiyon çalışmaları pH 4-7 aralığında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4.'da görüldüğü üzere en yüksek adsorpsiyon fenilalaninin izoelektrik noktası olan 5.48 değerinde gözlenmiştir. Amino asitlerin izoelektrik noktalarında net yükleri sıfırdır. Bu nedenle fonksiyonel monomer ve adsorplanan L-Phe moleküllerinin net yüklerinin sıfır olduğu noktada adsorpsiyonun en yüksek gözlenmesi benzer yüklerin itme etkisinin izoelektrik pH'da en aza indirgenmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu pH değerinin altındaki ve üzerindeki pH değerlerinde L-Phe adsorpsiyonu önemli oranda düşmektedir.

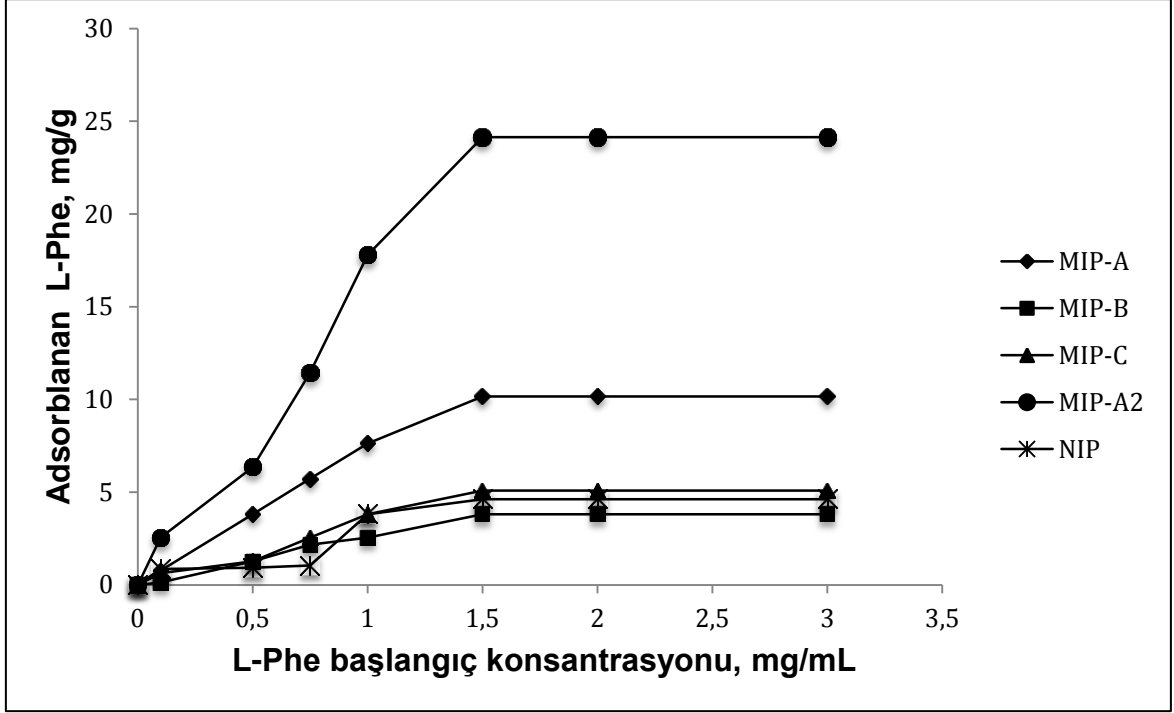


Şekil 4.4. pH değişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi. Polimer: MIP-A; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; adsorpsiyon zamanı: 2 saat; T: 25 °C.

#### 4.3.2. L-Phe Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

Farklı derişimlerde hazırlanan L-Phe çözeltilerinin sürekli sistemde L-Phe baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellere (NIP, MIP-A, MIP-B, MIP-C ve MIP-A2) adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorpsiyon kapasitesindeki değişim Şekil 4.5.' de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi çözeltideki L-Phe miktarı artması ile birim (gram) kriyojel başına adsoplanan L-Phe miktarı tüm kriyojeller için başlangıçta hızla artmakta ve yaklaşık 1.5 mg/mL L-Phe derişiminde platoya ulaşmaktadır. Bu derişimden sonra L-Phe adsorpsiyonunda önemli bir artış gözlenmemiştir. Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı ( $\Delta C$ ) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir. Özellikle L-Phe baskılanmış kriyojellerin adsopsiyon izotermlerinde başlangıçtaki keskin eğim, moleküler baskılama tekniği ile MIP kriyojellik yapıda L-Phe'ye özgü oluşan kaviterler ile açıklanabilir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller için maksimum adsorpsiyon miktarı sırasıyla NIP için 4.62; MIP-A için 10.16; MIP-B için 3.81; MIP-C için 5.08 ve MIP-A2 için 24.13 mg/g'dır.

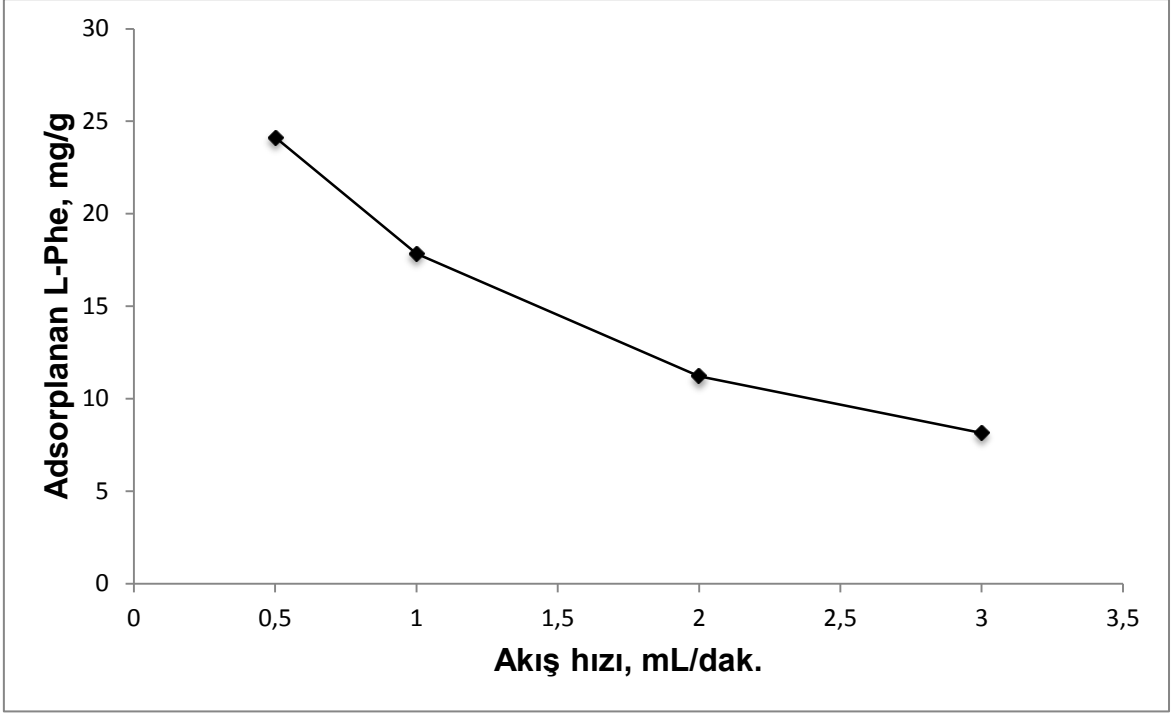




Şekil 4.5. L-Phe derişiminin adsorpsiyona etkisi. Akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25°C.

#### 4.3.3. Akış Hızının Adsorpsiyona Etkisi

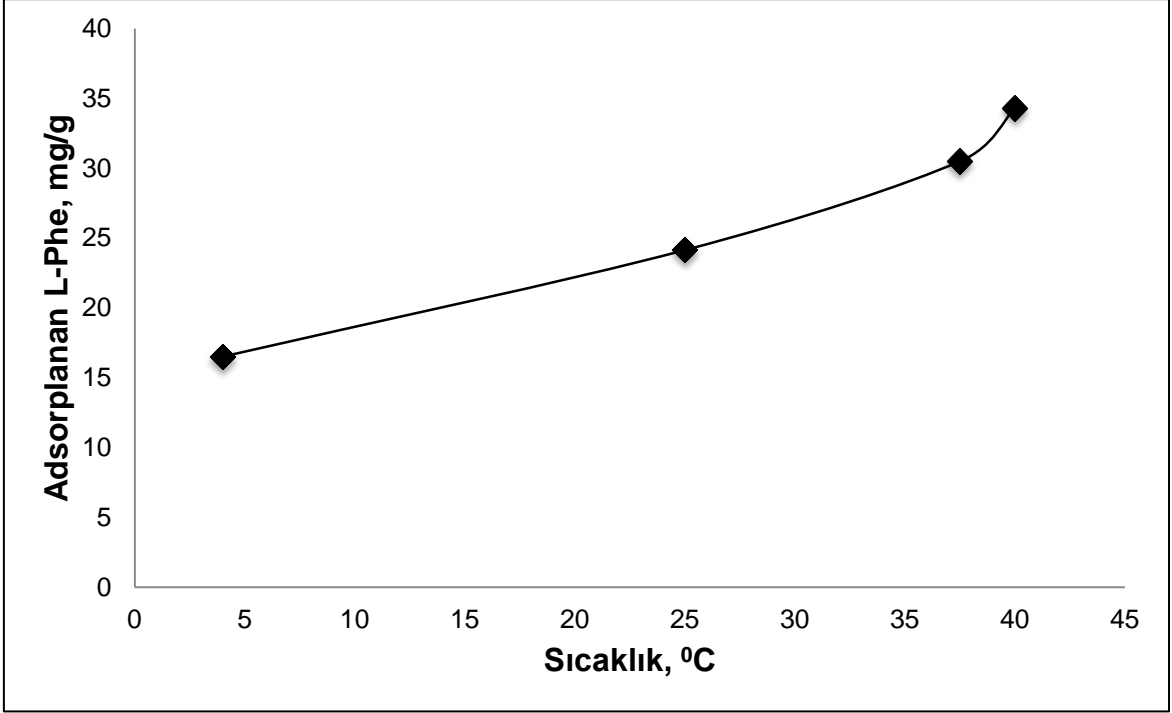
Akış hızının adsorpsiyon miktarına etkisi 0.5-3.0 mL/dk aralığında incelenmiştir. MIP-A2 kriyojeli ile L-Phe çözeltisi belirlenen akış hızlarında sürekli sistemde geçirilmiştir. Akış hızının adsorpsiyon kapasitesine etkisi Şekil 4.6' da gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi akış hızının artması ile adsorplanan L-Phe miktarı büyük ölçüde azalmaktadır. Çalışılan en düşük akış hızı olan 0.5 mL/dk'da 24.13 mg/g L-Phe adsorpsiyonu gözlenirken, en yüksek akış hızı seviyesi olan 3.0 mL/dk'da adsorpsiyon miktarı %33.8 azalarak 8.15 mg/g L-Phe olarak gözlenmektedir. Akış hızı değişiminin adsorpsiyon miktarına etkisi şu şekilde açıklanabilir; akış hızının artması ile L-Phe'nin kolanda alıkonma zamanı kısalmaktadır. Sonuçta L-Phe amino asitinin MIP kriyojel ile etkileşim süresi ve olasılığı azalacağı için adsorpsiyon kapasitesinde önemli ölçüde düşme gözlenir (Özkara ve ark., 2008).



Şekil 4.6. Adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C.

#### 4.3.4. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi

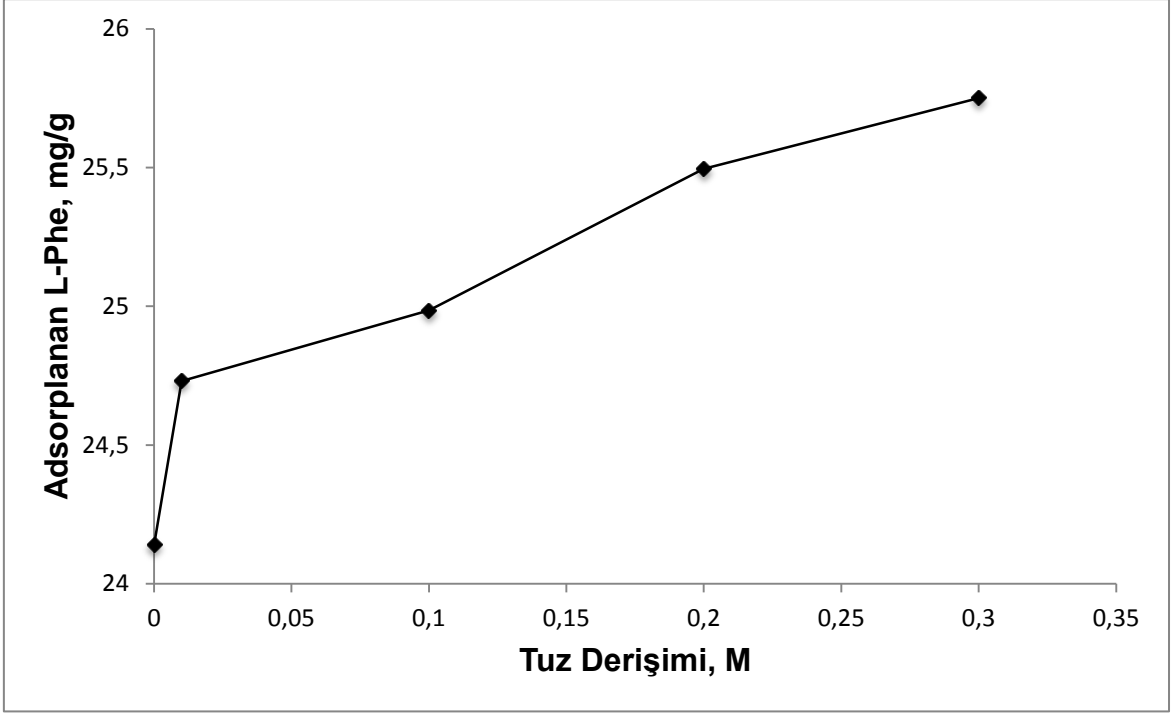
Sıcaklığın artması daha kuvvetli hidrofobik etkileşimlere neden olur ve proteinlerin adsorbente bağlanması artar (Saylan ve ark., 2012). Sıcaklığın artması, dengeli düzenli su formundan serbest su formuna kaydırır, böylece suya maruz kalan hidrofobik yüzeyler azaltılır. Sudaki hidrofobik çözünenlerin etkileşimi için geliştirilen teorilere dayanarak, Hjerten proteinlerin hidrofobik adsorbentlere bağlanmalarının entropi ile yürütüldüğünü belirtmiştir ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Bu da etkileşimin sıcaklık artışı ile arttığını göstermektedir (Özkara, 2009). Şekil 4.7.' de MIP-A2 kriyojele L-Phe adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi MIP-A2 kriyojele L-Phe adsorpsiyonu, çalışılan sıcaklık değerlerinde sıcaklığın artması ile önemli oranda artmıştır. Düşük sıcaklıkta (4°C) gözlenen L-Phe adsorpsiyonu 16.5 mg/g iken 40°C'da bu değer 34.3 mg/g olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artmasıyla, sentezlenen L-Phe baskılanmış MIP-A2 kriyojelleri üzerine L-Phe adsorpsiyon kapasitesindeki bu artış, hidrofobik ligand fenilalanin ile L-Phe arasındaki bağlanmanın hidrofobik doğasını göstermektedir.



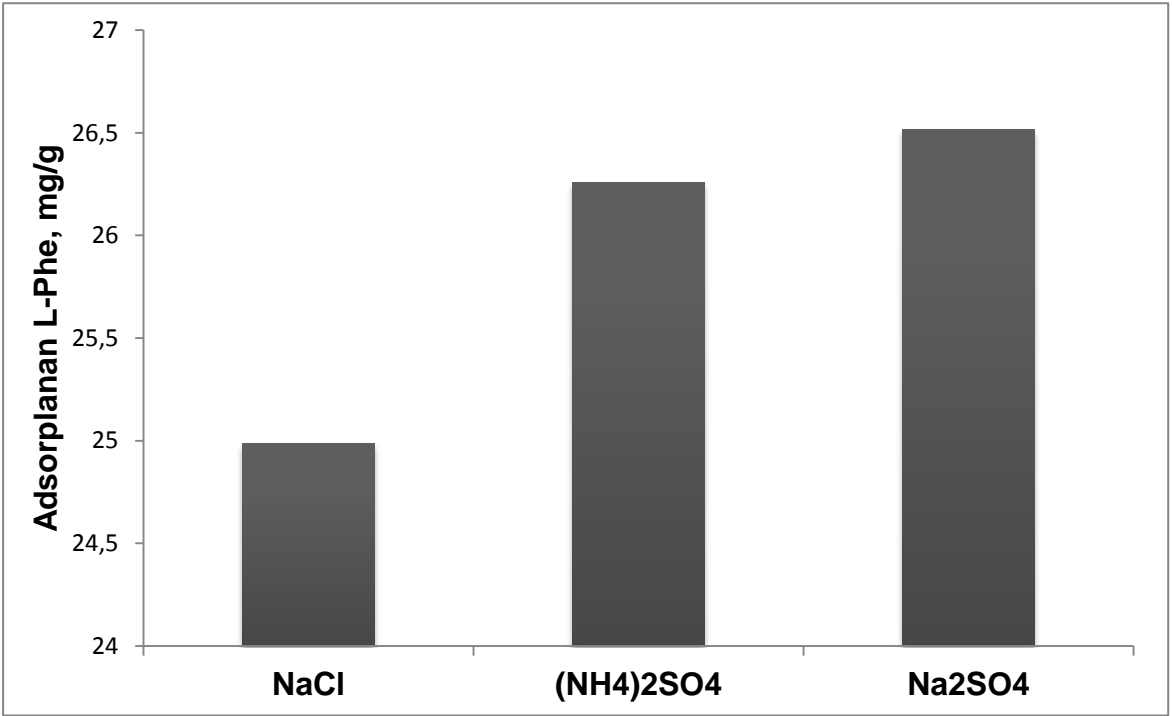
Şekil 4.7. Sıcaklık değişiminin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat.

#### 4.3.5. İyonik Şiddetin Adsorpsiyona Etkisi

Tuz derişiminin L-Phe'in adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.8' de görülmektedir. Sulu çözeltide NaCl derişiminin 0.001'den 0.1 M'ye artışı ile L-Phe adsorpsiyon miktarı 24.15 mg/g'dan 25.75 mg/g polimere artmaktadır. Hidrofobik etkileşimde dengeleme tamponu ve örnek çözeltisine yüksek derişimde çeşitli tuzların eklenmesi ligand ve adsorplanan molekül etkileşmesini başlatır. Tuzların etkileri, proteinlerin çöktürülmesi veya bunların suyun molal yüzey gerilimini artırıcı olumlu etkileri Hofmeister serileri ile açıklanabilir (Pahlman ve ark., 1977; Roe, 1989). Bu etkiler, hidrofobik etkileşimi başlatan kozmotropik tuzlara (amonyum sülfat gibi) ve hidrofobik etkileşimi azaltan kaotropik tuzlara bağlıdır. Şekil 4.9' da farklı tuzların [0.1 M NaCl, Na<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>) ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], L-Phe adsorpsiyonuna etkisi gösterilmektedir. Tuzların suyun molal yüzey gerilimine bağlı etkilerine bağlı olarak L-Phe adsorpsiyonu NaCl, Na<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>) ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> için sırasıyla 24.98; 26.26; 26.51 mg/g olarak artış göstermektedir. Bu sonuçlar ligand MAPA ve L-Phe arasındaki etkileşimlerin hidrofobik etkileşim olduğunu doğrulanmaktadır.



Şekil 4.8. İyonik şiddetin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C.



Şekil 4.8. Farklı tuz tiplerinin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi. Polimer: MIP-A2; L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH:5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C.

#### 4.3.6. Adsorpsiyon İzotermi

Moleküllerin bir yüzeye bağlanması işlemi adsorpsiyon olarak adlandırılır. Desorpsiyon adsorbe olan molekülün yüzeyden uzaklaştırılmasıdır. Fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki tip adsorpsiyon vardır. Genellikle, bir molekül eğer 10 kcal/mol' den daha az enerji ile bağlanırsa fiziksel olarak adsorplanır ve 10 kcal/mol' den daha fazla enerji ile bağlanırsa kimyasal olarak adsorbe edilir. Kemisorpsiyonda, van der Waals gücü fiziksel bağlanmadan (yüzeye spesifik değil) sorumlu iken, doğrudan kimyasal bağ (spesifik yüzey) ile ilişkilidir. Bu çalışmada, L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojele L-Phe adsorpsiyonu çalışılmıştır. Bu olay bir katı-sıvı adsorpsiyon işlemidir. Adsorpsiyon izotermi her bir molekülün adsorbent ile etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Adsorpsiyon izotermi iki faz dengede olduğu zaman katı fazda adsorplanan amino asitin miktarı ve çözeltide amino asit derişimi arasında bir ilişkili sağlar. Deneysel izotermi verilen bir uygulama için sürecin adsorpsiyon kapasitesini, en uygun adsorbent seçimi ve gerekli olan adsorban miktarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Adsorpsiyon izotermi ek olarak adsorpsiyon ısı gibi termodinamik parametrelerin teorik olarak değerlendirilmesi için kullanılabilir. Çeşitli denge modelleri adsorpsiyon izotermi ilişkisini açıklamak için geliştirilir.

Adsorpsiyon ısı yüzey içeriğinden bağımsızdır. Adsorbe moleküller arasında yan (lateral) etkileşim yoktur. Tüm adsorpsiyon bölgeleri aminoasit molekülü için aynı afiniteye (ilgiye) sahiptir.

Langmuir adsorpsiyon izotermi için aşağıdaki varsayımlar türetilmiştir; enerji bakımından sabit sayıda eş değer iyi tanımlanmış bölgelerde sadece tek tabaka adsorpsiyonu gerçekleşir, adsorpsiyon komşu bölgelerdeki adsorbe moleküller arasında etkileşim olmayacak şekilde yerleşir.

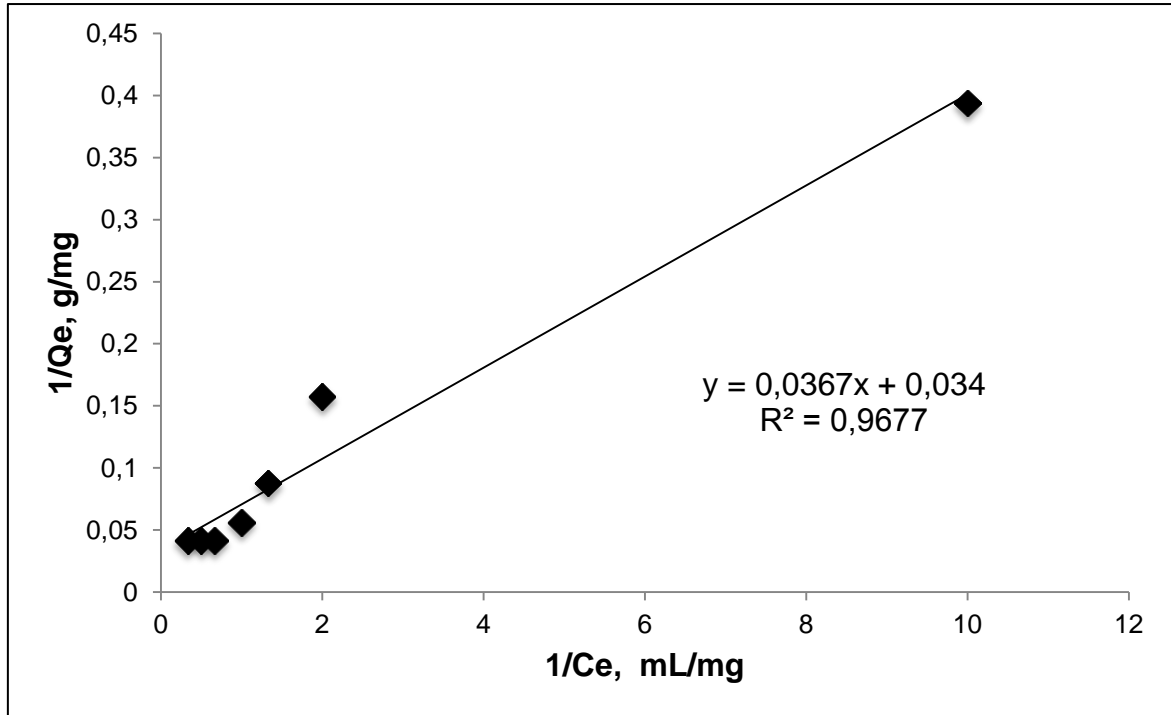
Sürekli sistem deneyleri boyunca, adsorpsiyon izotermi L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojellere L-Phe adsorpsiyon özelliklerinin değerlendirilmesi için kullanılır. Langmuir adsorpsiyon izotermi, Eşitlik 4.1 ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

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

Bu eşitlikte Q adsorbente bağlanan L-Phe miktarı (mg/g),  $C_{\text{eq}}$  çözeltideki denge L-Phe derişimi (mg/mL), b Langmuir sabiti (mL/mg) ve  $Q_{\text{max}}$  adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Bu denklem 4.2 eşitliğindeki gibi türetilir.

$$1/Q_{\text{eq}} = 1/(Q_{\max} \cdot b)(1/C_{\text{eq}}) + 1/Q_{\max} \quad (4.2)$$

Maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{\text{max}}$ ) deneysel verilerden L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojel sistemi için 24.14 mg/g olarak bulunmuştur. Teorik adsorpsiyon kapasitesi L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojel sistem için 29.4mg/g; Langmuir sabiti 0.923 ml/mg, korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ise 0.923'dür (Tablo 4.3.). Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. L-Phe baskılanmış poli(PHEMA/MAPA) kriyojel sistemi için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

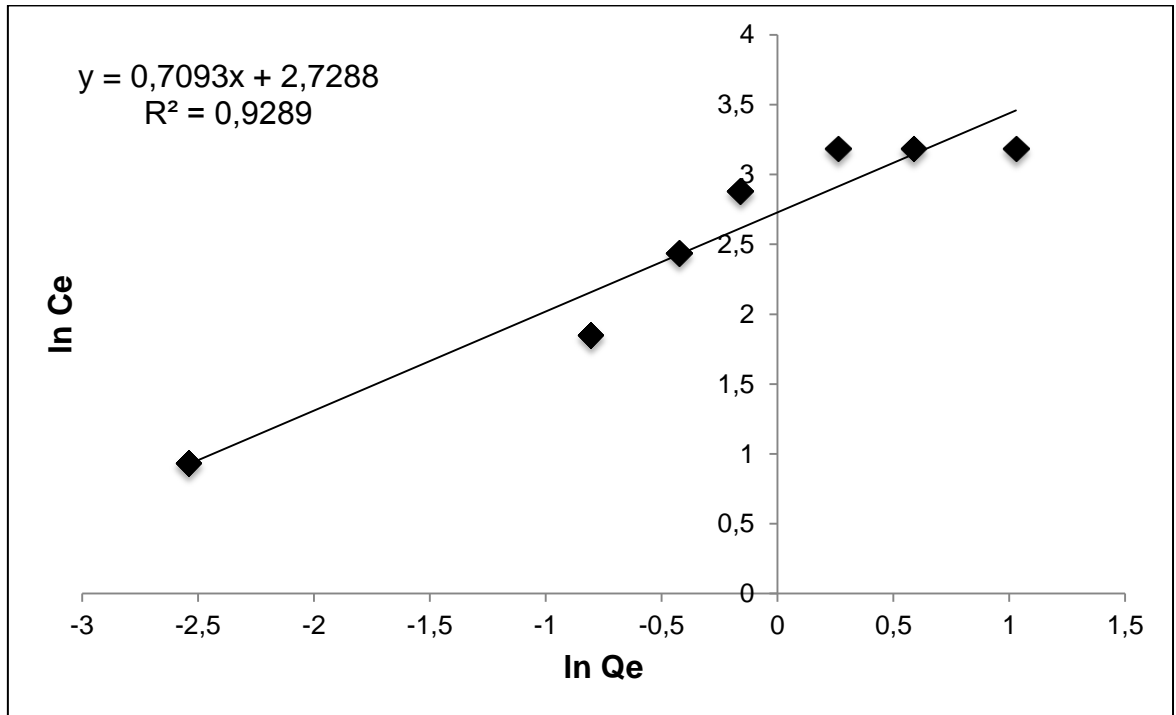
Freundlich izotermi de adsorpsiyon dengesini tanımlayan en eski eşitliklerdendir (Casey ve ark., 1997). Freundlich eşitliği, adsorbente adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar. Deneysel eşitlik aşağıdaki şekildedir;

$$Q_{eq} = Q_f C_{eq}^{1/n} \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte  $Q_q$  adsorpsiyon miktarı (mg/g),  $C_q$  çözeltildeki analit derişimi (mg/mL) dir.  $Q_f$  ve  $1/n$  sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

$$\ln Q_{eq} = \ln Q_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.4)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da incelenmiştir. Bu amaçla  $\ln C_{eq}$ 'nin  $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.10). Grafiğın doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir.  $Q_f$  ve  $n$  çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak değişen deneysel sabitlerdir ve  $n$  birden büyüktür.



Şekil 4.10. L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojel için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler Çizelge 4.3'te verilmiştir. Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon işleminin Langmuir modeli ile tanımlanabileceği görülmektedir. Langmuir sabiti değeri ( $Q_{max}$ ) deneysel verilerle uyuşmaktadır. Diğer taraftan  $Q_f$  ve  $n$  değerleri sulu ortamdan L-Phe'in kolayca ayrılabilirdiğini ve dolayısıyla tercihi adsorpsiyonu gösterir.  $Q_f$  değeri adsorbent adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; eğim,  $1/n$ , adsorpsiyon kapasitesine derişimin etkisini göstermektedir ve adsorpsiyon şiddetini ifade eder. Çizelgeden görüldüğü üzere  $n$  değerleri adsorpsiyon işlemi için yeterince yüksektir.

Tablo 4.3. MIP kriyojel için Langmuir ve Freundlich izoterm sabitleri.

Polimer kodu	Deneysel	Langmuir			Freundlich		
		$Q_{den}$ (mg/g)	$Q_{max}$ (mg/g)	$b$ (mL/mg)	$R^2$	$Q_f$	$1/n$
MIP-A2	24.14	29.4	0.923	0.967	15.31	0.709	0.9289

#### 4.3.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbent-adsorban temas süresi yani alıkonma süresi bulunur. Adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır (Ho ve ark.,1999). Kinetik model kimyasal reaksiyon ve kütle transferi gibi adsorpsiyon sürecinin kontrol mekanizmasını tanımlamak için kullanılır. Kinetik model deneysel verileri test etmek için de kullanılmaktadır. Pseudo-birinci ve ikinci-dereceden eşitlikler kinetik modellerdir ve ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimine eşit olduğunu belirlemek için kullanılabilir. Lagergren birinci derece eşitlik bir sıvı çözülden çözünenin adsorpsiyonu için geniş çapta kullanılır (Cheung ve ark., 2001). Eşitlik aşağıdaki şekilde sunulabilir;

$$d_{qt}/d_t = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (4.5)$$



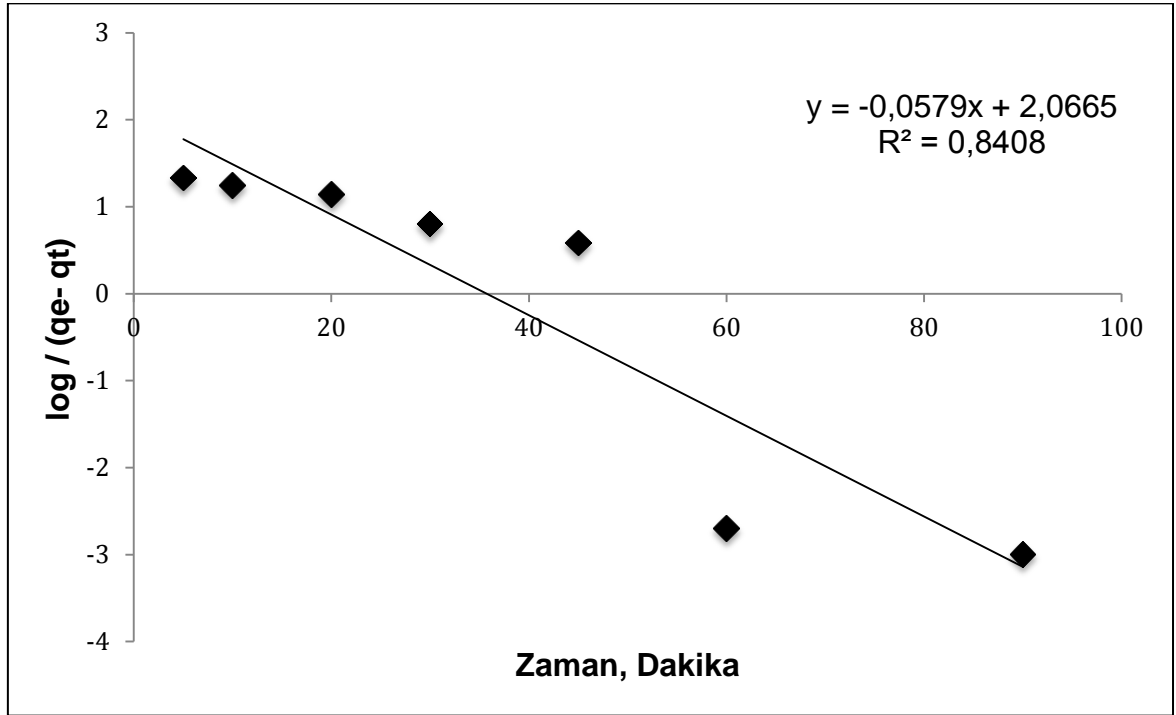
Eşitlikte  $k_1$  pseudo-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti ( $dk^{-1}$ ),  $q_{eq}$  ve  $q_t$  sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir  $t$  anında adsorplanan miktarı (mg/g) göstermektedir.  $t = 0$ 'da  $q_t = 0$  ve  $t = t$  anında  $q_t = q_t$  sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.6)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.6 tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılabilir:

$$\log(q_{eq}-q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.7)$$

$\log(q_{eq})$ 'e karşı  $t$  grafiğinin doğrusallığı kinetik modelin uygulanabilirliğini göstermektedir. Gerçek birinci-derece işlemde  $\log(q_{eq})$ ,  $t$ 'ye karşı  $\log(q_{eq}-q_t)$  grafiğinin kesim noktasına eşit olmalıdır.



Şekil 4.11. Birinci dereceden adsorpsiyon kinetiği

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı pseudo-ikinci derece eşitlik aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.8)$$

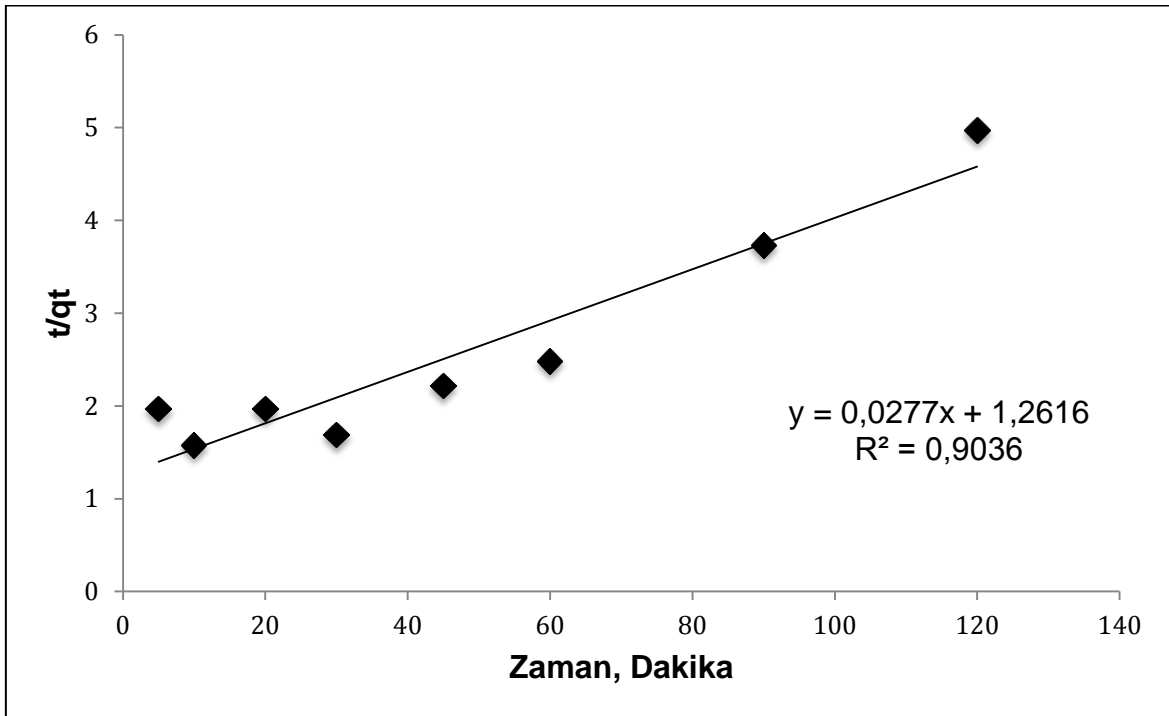
Eşitlikte  $k_2$  pseudo-ikinci derece hız sabitidir ( $g.mg^{-1}.dk^{-1}$ ). Eşitlik 4.6 ya  $t = 0$  da  $q_t=0$  ve  $t = t$ 'de  $q_t = q_t$  sınır koşullarının uygulanması ile;

$$1/(q_{eq}-q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2t \quad (4.9)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali:

$$(t/q_t)=(1/k_2q_{eq}^2)+(1/q_{eq})t \quad (4.10)$$

İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için  $t/q_t$  ye karşı  $t$  grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti ( $k_2$ ) ve denge adsorpsiyonu ( $q_{eq}$ ) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir.



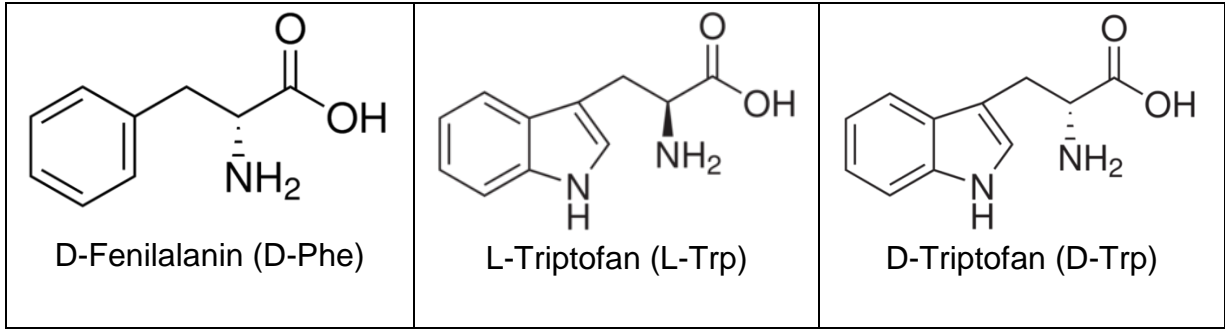
Şekil 4.12. İkinci dereceden adsorpsiyon kinetiği

Polimer kodu	Başlangıç Derişimi (mg/mL)	Deneysel	Birinci Derece Kinetik			İkinci Derece Kinetik		
		$q_{eq}$ (mg/g)	$k_1$ (1/dk)	$q_{eq}$ (mg/g)	$R^2$	$k_2$ (g/mg.dk)	$q_{eq}$ (mg/g)	$R^2$
MIP-A2	1.5	24.14	0.133	166.4	0.8	$6.08 \cdot 10^{-4}$	36.1	0.9036

Tablo 4.4. Birinci ve ikinci dereceden adsorpsiyon kinetiği verileri.

#### 4.3.8. Seçicilik Deneyleri

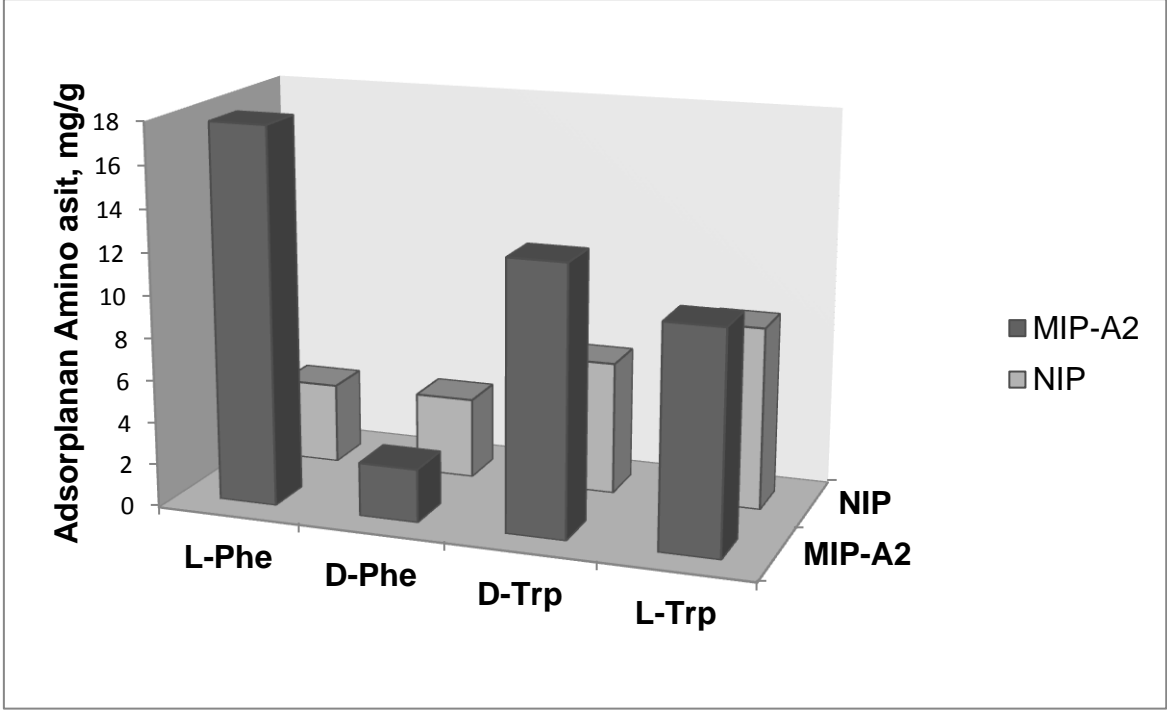
MIP-A2 ve NIP kriyojelleri ile seçicilik deneyi D-Phe, L-Trp ve D-Trp (Şekil 4.14) amino asitleri ile yapılmıştır. Her bir amino asit NIP ve MIP-A2 kriyojel membranlarla sürekli sistemde etkileştirilmiş ve alınan başlangıç ve sonuç çözeltileri ile adsorplanan derişim miktarları belirlenmiştir. Yarışmacı amino asitler ile adsorpsiyon deneylerinin sonuçları Şekil 4.14.' te gösterilmiş ve  $K_d$  ve  $k$  değerleri Tablo 4.5.' de özetlenmiştir.



Şekil 4.13. Kullanılan amino asitlerin moleküler yapıları.

Tablo 4.5. L-Phe'ye göre D-Phe, L-Trp ve D-Trp için  $K_d$  ve  $k$  değerleri.

Molekül	NIP		MIP-A2		
	$K_d$ (mL/g)	$k$	$K_d$	$k$	$k'$
L-Phe	4.78	-	28.63	-	-
D-Phe	3.99	1.20	3.75	7.63	6.32
L-Trp	0.72	6.63	1.0	28.42	12.92
D-Trp	2.18	2.2	02.37	12.07	1.81



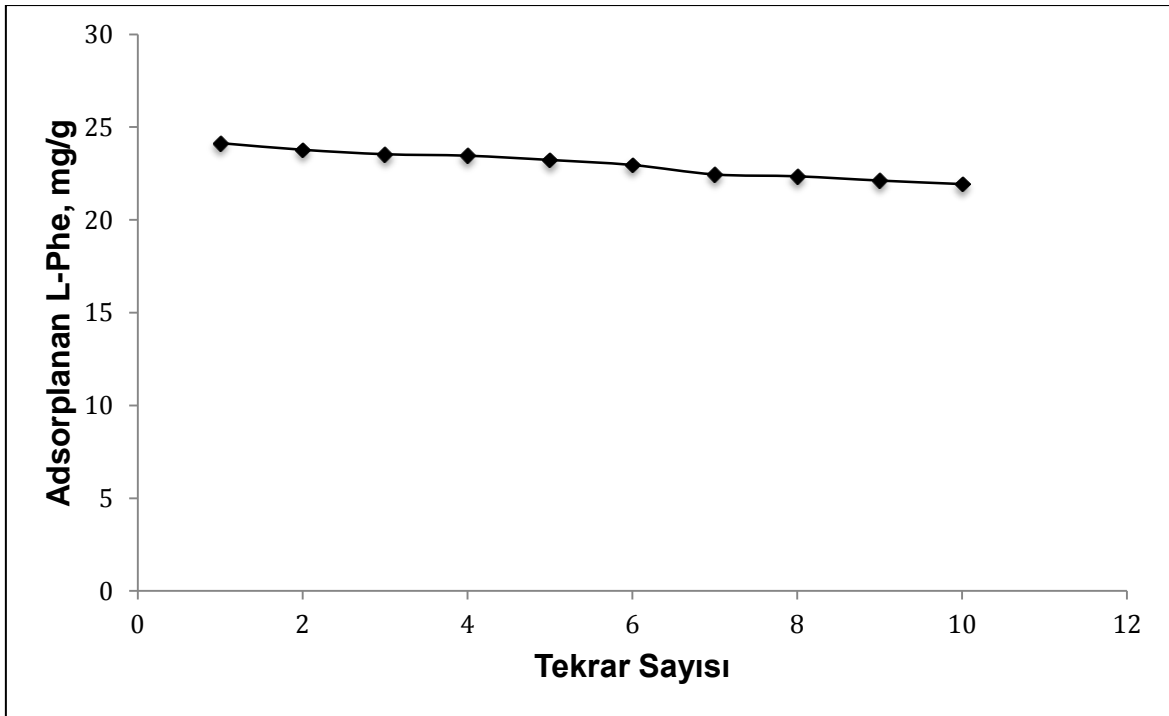
Şekil 4.14. NIP ve MIP-A2 kriyojelleri ile seçicilik deneyi. Amino asit derişimi: 1.0 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH: 5.5; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25 °C.

Bu sonuçlara göre L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) kriyojelin D-Phe, L-Trp ve D-Trp için L-Phe'ye göre  $K_d$  değerleri baskılanmamış adsorbente yarışmacı amino asitlerin L-Phe'ye göre adsorpsiyonu için elde edilen  $K_d$  değerlerine göre daha yüksektir. Bağlı seçicilik katsayısı, L-Phe baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir. Sonuçlar L-Phe baskılanmış polimerin L-Phe moleküllerine D-Phe'ye göre 6.32 kat, L-Trp moleküllerine göre 12.92 kat ve D-Trp moleküllerine göre 1.81 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan hazırlanan L-Phe baskılanmış kriyojel membranın fenil alanin amino asitinin D ve L-enantiyomerlerinin ayrılmasında etkili bir adsorbent olduğu söylenebilir. Hidrofobik bir amino asit olan diğer yarışmacı amino asit triptofanın, içerdiği indol halkası ile baskılanmış polimerde L-Phe'ye özgü oluşturulan kavitelere yapısal olarak uyumlu olmaması, seçiciliğin daha yüksek olmasını (12.92 kat) açıklayabilir.

#### 4.3.9. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Bir biyoafinite destek malzemesinde (adsorbentinde) aranan önemli özelliklerden biri de, bu malzemenin defalarca tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik, ayırma işleminin maliyetini

önemli ölçüde azaltan bir etmendir. Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği aynı kriyojel membranın 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi ile gösterilmiştir (Şekil 4.15.). Her adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası sterilizasyon için kriyojel membranlar 30 dk deyonize su ile yıkanmıştır. Desorpsiyon ve sterilizasyon işlemleri sırasında polimerik yapıdan MAPA sızması gözlenmemiştir. 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde kullanılan desorpsiyon ajanı için kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 4.15. L-Phe baskılanmış MIP-A2 kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği. L-Phe derişimi: 1.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dk; pH:5.48; adsorpsiyon süresi: 2 saat; T: 25°C.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, L-fenilalanin'in tanınması için L-Phe baskılanmış poli(HEMA/MAPA) süpermakrogözenekli kriyojeller sentezlenmiş ve L-Phe'nin adsorpsiyon işleminde kullanılmıştır. MIP kriyojellerin yüzey alanı 36.2 m<sup>2</sup>/g olarak hesaplanmıştır.

MAPA'nın polimerik yapıya katıldığı FTIR spektrumları alınarak gösterilmiştir. Hem PHEMA hem de poli(HEMA/MAPA) kriyojelin yapısındaki -OH gruplarının gerilme titreşimi sırasıyla, yaklaşık 3400 cm<sup>-1</sup> civarında gözlenmiştir. Poli(HEMA/MAPA) kriyojellerin FTIR spektrumunda yaklaşık 748 cm<sup>-1</sup> civarında görülen band ise, polimerik yapıya giren MAPA yapısındaki aromatikliğin bir göstergesidir.

Öncelikle L-Phe baskılanmamış ve baskılanmış kriyojeller sentezlenmiştir. MIP-A, MIP-B ve MIP-C farklı MAPA oranları belirlenerek sentezlenmiştir. Adsorpsiyon işlemlerinden önce kriyojellerin % desorpsiyon oranlarının belirlenmesi işlemleri yapılmıştır. En iyi desorpsiyon 1:1 (kalıp molekül/monomer) oranda MIP-A kriyojelinde elde edilmiştir. Daha sonra kavite miktarının belirlenmesi için 1:1 oranda 2.5, 5 ve 10 kat fazla miktarda kriyojeller sentezlenmiştir. Fakat MAPA monomerinin çözünmemesi üzerine sadece 2.5 kat fazla miktarda kullanılarak MIP-A2 kriyojeli sentezlenmiş ve tüm çalışmalar bu kriyojel üzerinden yürütülmüştür.

L-Phe başlangıç derişiminin L-Phe adsorpsiyonuna etkisi deneylerinde, çözeltildeki L-Phe derişiminin artmasıyla, MIP kriyojeller tarafından birim kütle basına adsorplanan L-Phe miktarı, çalışılan sürekli sistemde 1.5 mg/mL`den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. NIP kriyojellerde non-spesifik L-Phe adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir (4.62 mg/g).

MIP-A kriyojel membranlarda pH etkisi deneylerinde pH 5.48 de L-Phe amino asitinin adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde artmıştır. Tüm adsorpsiyon çalışmaları bu pH değeri üzerinden yürütülmüştür. Sürekli sistemdeki çalışmalarda maksimum L-Phe adsorpsiyonu 1.5 mg/mL derişim için 24.13 mg/g olarak bulunmuştur.

Akış hızının değişimi de L-Phe adsorpsiyon kapasitesine etki göstermiştir. Akış hızı 0.5 mL/dk'dan 3.0 mL/dk'ya arttırılırken L-Phe adsorpsiyon kapasiteside 24.13 mg/g'dan %33.8 oranında azalarak 8.15 mg/g'a düşmüştür. Bu azalmanın sebebi kalıp molekül L-Phe'in MAPA monomeri ile daha az etkileşme süresine sahip olmasına bağlıdır.

Adsorpsiyona sıcaklık etkisi deneylerinde hidrofobik etkileşimin sıcaklık artışı ile arttığı gözlenmiştir. MIP kriyojellerin adsorplanan L-Phe miktarı sıcaklığın artmasıyla önemli oranda artmıştır. Düşük sıcaklıkta (4°C) gözlenen L-Phe adsorpsiyonu, 16.51 mg/g iken 40°C'da bu değer 34.30 mg/g olarak bulunmuştur.

İyonik şiddet etkisi deneylerinde NaCl tuzunun farklı derişim oranları (0.001-0.1M) kullanılarak L-Phe adsorpsiyon sonucuna etkisi NaCl derişimi arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. 0.001 M NaCl de L-Phe adsorpsiyon derişimi 24.13 mg/g'dan 0.1 M NaCl de 25.75 mg/g'a arttığı gözlemlenmiştir. Farklı iyonik şiddet tipleri kullanılarak da L-Phe'in adsorpsiyon derişimi etkisi incelenmiştir. NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuz çeşitleri kullanılarak L-Phe'in adsorpsiyon derişim değişimi incelenmiştir. Burada Hofmeister serisi göz önüne alınarak Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > NaCl hidrofobik etkileşimi arttığı yönde L-Phe'in adsorpsiyon derişiminde de artış gözlenmiştir.

Langmuir adsorpsiyon izotermi, poli(HEMA/MAPA) kriyojellerine L-Phe adsorpsiyonu çalışmaları için lineer bir doğru vermiştir ve bu doğrunun korelasyon sabiti (R<sup>2</sup>) sentezlenen kriyojeller için 0.97 olarak hesaplanmıştır. Langmuir sabiti, b= 0.923 mL/mg ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q<sub>max</sub>) değeri 29.4 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Seçicilik deneyleri L-Phe için hazırlanan NIP ve MIP-A2 kriyojelinde D-Phe, D-Trp ve L-Trp amino asitleri ile incelenmiştir. Sonuçlar L-Phe baskılanmış polimerin L-Phe moleküllerine D-Phe'ye göre 6.32 kat, L-Trp moleküllerine göre 12.92 kat ve D-Trp moleküllerine göre 1.81 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlardan hazırlanan L-Phe baskılanmış kriyojel membranın fenil alanin amino asitinin D ve L- enantiyomerlerinin ayrılmasında etkili bir adsorbent olduğu söylenebilir. Hidrofobik bir amino asit olan diğer yarışmacı amino asit triptofanın, içerdiği indol halkası ile baskılanmış polimerde L-Phe'ye özgü oluşturulan

kavitelere yapısal olarak uyumlu olmaması, seçiciliğın daha yüksek olmasını (12.92 kat) açıklayabilir.

Desorpsiyon deneylerinde, desorpsiyon ajanı olarak %50 etilen glikol/su çözeltisi kullanılmış, 10 döngü boyunca adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi tekrar edilmiştir. Desorpsiyon oranı yaklaşık olarak %90 olarak hesaplanmıştır.



## 6. YORUM

Bu alışmada L-Phe tanınmasına yönelik L-Phe baskılanmış kriyojeller farklı polimerizasyon oranlarında membran formunda sentezlenerek afinite kartuşları hazırlanmış ve karakterizasyonlarının ardından sürekli sistemde adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil kromatografik destek malzemesi olarak kullanılan kriyojeller geniş gözenekleri sayesinde akış direncinin düşük olması ve kolay hazırlanabilmeleri nedeniyle tercih edilmiştir. Adsorpsiyon koşullarının optimize edilmesi amacıyla ortam pH'sı, sıcaklık, L-Phe derişimi, iyonik şiddet ve iyon türü gibi parametrelerin etkileri incelenerek hazırlanan L-Phe baskılanmış kriyojel membranların en yüksek etkinlik gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Belirlenen bu koşullarda farklı yarışmacı amino asitler kullanarak baskılamanın etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar hazırlanan moleküler baskılanmış kriyojel membranların, bu çalışmada hedeflendiği şekilde, fenilalaninin D ve L enantiyomerlerini yeterli seçicilikte ayırabildiğini göstermektedir. Ayrıca hidrofobik yapıdaki diğer bir amino asit olan triptofanın da hazırlanan L-Phe baskılanmış kriyojel membranlara düşük bağlanma oranı yapıdaki L-Phe'ye seçici kaviteilerin varlığına işaret etmektedir. Çalışma sonucunda L-Phe'ye seçici, tekrar kullanılabilir bir adsorbent elde edilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

- Arshady, R. and Mosbach, K., **1981**, Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization. *Makromol. Chem.* 182, 687-692.
- Ateş S., Doğan N. S., **2010**, Properties of Immobilized Phenylalanine Ammonia Lyase and Investigation of its Use for the Prediagnosis of Phenylketonuria, *Turk J Biochem*, 35 (1) ; 58–62.
- Aydoğan, C., Andaç, M., Bayram, E., Say, R., Denizli, A., **2011**, Molecularly Imprinted Cryogel for L-Glutamic Acid Separation, *Biotechnology Progress*, BTPR-11-0318, R2.
- Azarkan, M., Joelle Huet J., Baeyens-Volant, D., Looze, Y., Vandebussche, G., **2007**, Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies, *Journal of Chromatography B*, 849, 81–90.
- Chapuis, F., Pichon, V., Hennion, M.C., **2004**, Molecularly imprinted polymers: Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials, *LCGC Europe*, 17, 408-417
- Cormanck, P.A.G., Elorza A.Z., **2004**, Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation, *J. Chromatogr. B*, 804, 173-182
- Cormanck, P.A.G., Mosbach, K., **1999**, Molecular Imprinting: Recent Developments and the Road Ahead, *React. Funct. Polym.*, 41, 115-124
- El Rassi, Z., **1996**, Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species, *J. Chromatogr. A*, 720, 93–118.
- Fausnaugh, J.L., Regnier, F.E., **1986**. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J. Chromatogr.*, 359, 131–146.
- Hall, A.J., **2005**, Imprinted polymers. In *Topics in Current Chemistry Templates in Chemistry II* 249, 317–349.
- Haupt, K., **2003**, Molecularly imprinted polymers: the next generation. *Anal. Chem.*, 9, 376A–383A.

- Hentze, H.P., Antonietti M., **2002**, Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications, *Reviews in Molecular Biotechnology* 90, 27-53
- Janson, J.C., Ryden, L., **1993**, Protein separation and purification, *Biotechnology*, 3, 617–642.
- Jennissen, H.P., **2002**, Hydrophobic Interaction Chromatography, *Nature Encyclopedia of Life Science*, vol. 9, pp. 353-361.
- Jiang, X., Jiang, N., Zhang, H., Liu, M., **2007**, Small organic molecular imprinted materials: their preparation and application, *Anal Bioanal Chem* 389:355-368
- Komiyama, M., **2003**, *Molecular Imprinting*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., **2003**, *Molecular Imprinting from Fundamentals to Applications*, Wiley-VCH, New York, USA.
- Liao, Y., Wang, W., Wang, B., **1998**, Enantioselective Polymeric Transporters for Tryptophan, Phenylalanine, and Histidine Prepared Using Molecular Imprinting Techniques, *Bioorganic Chemistry* 26, 309–322.
- Lozinsky V, I., **2002**, Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications, *Russian Chemical Reviews* 71 (6) 489 ± 51.
- Lozinsky V, I., **2004**, What new opportunities the use of diverse polymeric cryogels opens for the immobilization of molecules and cell, *Session 5: Chem. Ind.* 58 (6a) 111-115.
- Lozinsky V.I., Galaev I. Y., Plieva F.M., Savina I. N., Jungvid H. ve Mattiasson B., **2003**, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *TRENDS in Biotechnology* Vol.21 No.10
- Madden, M., **2007**, *Phenylketonuria: Defects in Amino Acid Metabolism*, College of Medicine Class , Medical University of South Carolina, *Molecular Basis of Medicine Treatise*

- Mahalakshmi R., Jesuraja S. X., and Jerome S., **2006**, Das Growth and characterization of L-phenylalanine, *Cryst. Res. Technol.*, 41: 8, 780 – 783
- Mahony, J.O., **2005**, Molecularly imprinted polymers – potential and challenges in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 534, 31–39.
- Melander, W., Horvath, C., **1977**, Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 200–215.
- Narayanan, R.S., **1994**. Preparative Affinity Chromatography of Proteins, *Journal of Chromatography A*, 658, 237-258.
- Özcan, A.A., Say, R., Denizli, A., Ersöz, A., **2006**, L-Histidine Imprinted Synthetic Receptor for Biochromatography Applications, *Anal. Chem.*, 78, 7253-7258.
- Piletsky, S.A. and Turner, A.P.F., **2006**, Molecular imprinting of polymers, Landes Bioscience, Georgetown, Texas.
- Porath, J., **1986**. Salt-promoted adsorption: recent developments., *J. Chromatogr.*, 376, 331–341.
- Prasad, B. B., Madhuri, R., Tiwari, M. P., Sharma, P. S., **2010**, Enantioselective recognition of d- and l-tryptophan by imprinted polymer-carbon composite fiber sensor, *Talanta* 81, 187–196
- Queiroz J.A., Tomaz, C.T., Cabral J.M.S., **2001**, Hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Biotechnology* 87 (2001) 143–159
- Queiroz, J.A., Garcia, F.A.P., Cabral, J.M.S., **1996**, Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polyethylene glycol immobilized on Sepharose. *J. Chromatogr. A* 734, 213–219.
- Qui H., Xi Y., Lu F., Fan L., Luo C., **2012**, Determination of l-phenylalanine on-line based on molecularly imprinted polymeric microspheres and flow injection chemiluminescence *Spectrochimica, Acta Part A* 86 456– 460

- Regnier, F.E., **1987**, The role of protein structure in chromatographic behavior, *Science*, 238, 319–323.
- Roe, S., Harris, E.L.V., Angal, S., **1989**, Purification based on hydrophobicity, *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 221–232.
- Sadana, A., Beelaram, A.M., **1994**. Efficiency and economics of bioseparation: some case studies, *Bioseparation*, 4 (4):221-35.
- Saylan, Y., Sarı, M.M., Özkara, S., Uzun L., Denizli, A., **2012**, Hydrophobic microbeads as an alternative pseudo-affinity adsorbent for recombinant human interferon- $\alpha$  via hydrophobic interactions, *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 937–944
- Scouten W.H.,**1981**, *Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, New York: John Wiley and Sons.
- Sproß, J., Sinz, A., **2011**, Monolithic media for applications in affinity chromatography, *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 1958–1973
- Tomaz, C.T., Queiroz, J.A., **1999**, Studies on the chromatographic fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. *J. Chromatogr. A* 865, 123–128.
- Turkova, J., **1993**, *Bioaffinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam.
- Turner , N. W., Jeans, C. W., Brain, K. R., Allender, C. J., Hlady, V., Britt, D.W..**2006**, From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins, *Biotechnology Progress*, 22, 1474 – 1489.
- Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., **2009**, Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 2878–2884.
- Yan, M. and Ramström, O., **2005**, *Molecularly imprinted materials-science and technology*, 1st edn. Marcel Dekker, New York.

Zhang, Z., Zhang, M., Liu, Y., Yang, X., Luo, L., Yao, S., **2011**, Preparation of L-phenylalanine imprinted polymer based on monodisperse hybrid silica microsphere and its application on chiral separation of phenylalanine racemates as HPLC stationary phase, Separation and Purification Technology 87 (2012) 142–148

Kitap:

Denizli A., Küfrevioğlu İ.Ö., Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Ankara

Handbooks from GE Healthcare, Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography Principles and Methods, 11-0012-69.

Mahn, A., January **2012**, Chapter 25 Hydrophobic Interaction Chromatography: Fundamentals and Applications in Biomedical Engineering, Dhanjoo Ghista (editör) Biomedical Science, Engineering and Technology, ISBN 13: 978-953-307-471-9, 603 page

Wijayakshmi, M.A., 2002, Biocromatography Theory and Practice, London and New York.

Tez:

Öncel, S., **2004**, Yüksek Lisans Tezi, Fenilalanin çeren Hidrofobik Etkilesim Kromatografi Sorbentlerinin Sentezlenmesi ve Lizozim Saflastırılması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Semra Akgönüllü  
Doğum yeri : Çubuk  
Doğum tarihi : 07.09.1988  
Medeni hali : Bekâr  
Elektronik posta adresi : semraakgonullu@hacettepe.edu.tr  
Yabancı dili : İngilizce

## **EĞİTİM DURUMU**

Lisans : 2006-2010 Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümü,  
Tokat  
Yüksek Lisans : 2011-2013 Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara