

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER
TABANLI KRİYOJEL
AYIRMA SİSTEMLERİ
VE
BİYO-AYIRMA UYGULAMALARI**

Özlem BİÇEN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı
Ağustos-2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özlem Biçen'in "**Moleküler Baskılanmış Polimer Tabanlı Kriyojel Ayırma Sistemleri ve Biyo-Ayırma Uygulamaları**" başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 18/08/2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. ARZU ERSÖZ
Üye	: Prof. Dr. RIDVAN SAY
Üye	: Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ
Üye	: Yard. Doç. Dr. NALAN YILMAZ SARIÖZLÜ
Üye	: Yard. Doç. Dr. AYÇA ÖZCAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TABANLI KRİYOJEL AYIRMA SİSTEMLERİ VE BİYO AYIRMA UYGULAMALARI

Özlem BİÇEN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ERSÖZ
2009, 72 sayfa

Bu çalışmada, moleküler baskılanmış polimer (MIP) tabanlı kriyojel ayırma sistemleri hazırlanmış ve bu sistemlerin biyo-ayırma uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; ilk olarak hyaluronik asit (HA) ayırımına yönelik olarak D-glukuronik asit baskılanmış polimerler hazırlanmış ve bu MIP partiküllerinin elementel analiz, Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisiyle (FTIR) ve şişme testleriyle karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, sentezlenmiş MIP partikülleri poliakrilamid kriyojeli gözeneklerine tutturulmuştur. MIP içeren kriyojeller, FTIR, şişme testi, taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile görüntüleme ve gözenek boyutu analizörü (BET) metoduyla yüzey adsorpsiyon porozimetri yöntemleriyle karakterize edilmiştir. MIP tutturularak hazırlanan kriyojellerin HA adsorpsiyonu spektrofotometrik yöntemle incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 318 mg g^{-1} , HA'nın kriyojel matriksi içindeki glukuronik asit içeren boşluklara bağlanma kapasitesi ise $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Diğer taraftan MIP partikülleri içeren kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğine bakılmış ve HA adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir düşüş olmadığı dolayısıyla hazırlanan polimerlerin tekrar tekrar kullanılabilineceği görülmüştür. Son olarak, HA, balık gözünden izole edilen ve *Streptococcus equi* RSKK 679 suşu tarafından üretilen HA, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) cihazı kullanılarak ayırma-saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik Asit, D-glukuronik Asit, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Kriyojel, FPLC.

ABSTRACT**Master of Science Thesis****MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED CRYOGEL
SEPERATION SYSTEMS AND ITS BIO-SEPERATION APPLICATIONS****Özlem BİÇEN****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2009, 72 pages**

In this study, cryogel separation systems based on molecularly imprinted polymer (MIP) have prepared and its bio separation applications have achieved. For this purpose; firstly D-glucuronic acid imprinted polymers have synthesized for the separation of hyaluronic acid (HA) and characterized by elemental analysis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and swelling tests. Then, synthesized MIP particles have embedded into polyacrylamide based cryogel. This cryogel materials including MIP have also characterized by FTIR, swelling tests, Scanning Electron Microscopy (SEM) and surface adsorption analyse including pore size analyzer (BET) method. HA adsorption of cryogels including embedded MIP particles has investigated by spectrophotometric method. The maximum adsorption capacity has found be 318 mgg^{-1} polymer in cryogel. The association constant has determined as $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the binding of HA to glucuronic acid imprinted beads in cryogel. Also, recovery of MIP particles in cryogel has investigated and results showed that cryogels including embedded MIP particles could be used many times without decreasing their adsorption capacities significantly. Lastly, HA has isolated from fish eye and fermentation of *Streptococcus equi* RSKK 679 cell culture. Isolated HA has separated and purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

Keywords: Hyaluronic Acid, D- Glucuronic Acid, Molecularly Imprinted Polymers, Cryogel, FPLC.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, beni destekleyen, bana yol gösteren ve her zaman bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e ve çalışmalarım süresince desteğini, yardımlarını eksik etmeyen, fikirleriyle bana yol gösteren, aynı zamanda Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (BİBAM) imkanlarından ve Fen Fakültesi Kimya Bölümü olanaklarından yararlanmamı sağlayan BİBAM Müdürü ve Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Yard. Doç. Dr. Ayça ÖZCAN'a, Sayın Yard. Doç. Dr. Sibel Emir DİLTEMİZ'e, Sayın Fehmi DİLTEMİZ'e ve Sayın Arş.Gör. H. Açılyla AKDAMAR'a,

Deneysel çalışmalarımda kullandığım *Streptococcus equi* mikroorganizmalarını temin eden Sayın Yard. Doç. Dr. Nalân YILMAZ SARIÖZLÜ' ye,

Tez çalışmam süresince destekleriyle hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım, Güner SAKA, Sibel BÜYÜKTİRYAKİ, Rüstem KEÇİLİ, ve Sentetik Reseptörler Araştırma Grubundaki (SYNREG) tüm çalışma arkadaşlarıma,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, ilgilerini, sevgilerini, desteklerini benden hiç esirgemeyen, her zaman bana sonsuz güvenen çok değerli Ailem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Özlem BİÇEN

Ağustos-2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hyaluronik Asit Ve Önemi.....	2
1.2. Kriyojel.....	5
1.2.1. Karyotropik Jelasyon İşleminin Temel Karakteristik Özellikleri.....	6
1.2.2. Jel ve Kriyojel Arasındaki Farklılıklar.....	7
1.2.3. Kriyojel Hazırlanması.....	9
1.2.4. Kriyojellerin Uygulama Alanları.....	12
1.2.5. Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	16
1.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	17
1.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimer Hazırlama Yöntemi.....	20
1.3.2. Farklı MIP Hazırlama Yöntemlerinin Avantaj ve Dezavantajları ...	21
1.3.3. Baskılanacak İyon Veya Molekülün Özellikleri.....	23
1.3.4. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Fonksiyonel Monomerler.....	23
1.3.5. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar.....	25
1.3.6. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Çözücüler.....	28
1.3.7. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Başlatıcılar.....	29
1.3.8. Moleküler Baskılı Polimerlerin Özellikleri.....	30
1.3.9. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları.....	31
1.3.10. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonları.....	32

1.3.10.1. Elemental Analiz.....	32
1.3.10.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR).....	32
1.3.10.3. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	32
1.3.10.4. Kuru Haldeki Gözenek Yapısı	33
1.3.4.10.5. Şişmiş Haldeki Gözenek Yapısı.....	34
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	36
2.1.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	36
2.1.3.1. FPLC Cihaz Bileşenlerinin Özellikleri	38
2.2. Yöntem.....	39
2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) Monomerinin Sentezi	39
2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu (II) (MAH-Cu (II)) Metal Şelat Monomeri Sentezi.....	39
2.2.3. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması.....	40
2.2.4. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Mikroküreler (MIP) Tutturulmuş Akrilamit Temelli Kriyojellerin Hazırlanması	41
2.2.5. Balık Gözünden Hyaluronik Asit (HA) İzolasyonu.....	41
2.2.6. <i>Streptococcus equi</i> Suşundan Hyaluronik Asit (HA) Üretimi	42
2.2.6.1. Mikroorganizma	42
2.2.6.2. İnokulumun Hazırlanışı, Fermantasyon Ortamı ve Fermantasyon	42
2.2.6.3. Fermantasyon Ortamından Önsaflştırma İşlemi.....	43
2.2.7. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	43
2.2.7.1. Şişme Testi.....	43
2.2.7.2. FTIR Analizi	43

2.2.7.3. Elemental Analiz	44
2.2.8. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin Karakterizasyonu	44
2.2.8.1. Şişme Testi	44
2.2.8.2. FTIR Analizi	44
2.2.8.3. BET Yöntemiyle Yüzey Analizi	44
2.2.8.4. Yüzey Morfolojisi Analizi	44
2.2.9. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları	45
2.2.10. MIP Tutturulmuş Kriyojellerden HA Desorpsiyonu	46
2.2.11. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonuna pH Etkisi	46
2.2.12. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonuna Akış Hızı Etkisi	47
2.2.13. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonundaki Seçiciliği	47
3. SONUÇLAR, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	48
3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu	48
3.1.1. Şişme Testi	48
3.1.2. MAH Monomerinin Karakterizasyonu	48
3.1.3. MAH-Cu(II) Monomerinin Karakterizasyonu	50
3.1.4. D-Glukuronik Asit Bellekli Polimerlerin Karakterizasyonu	50
3.1.5. D-Glukuronik Asit Bellekler Çıkarılmadan Önceki ve D-Glukuronik Asit Molekülleri Uzaklaştırıldıktan Sonraki MIPlerin Elemental Analiz Sonuçları	53
3.2. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin Karakterizasyonu	53
3.2.1. Şişme Testi	53
3.2.2. Yüzey Alanı Ölçümü	53
3.2.3. Yüzey Morfolojisi	54
3.2.4. FTIR Analizleri	55
3.3. MIP İçeren Kriyojellerde Adsorpsiyon Çalışmaları	56
3.3.1. HA Başlangıç Derişiminin Etkisi	56
3.3.2. pH Etkisi	57

3.3.3. Akış Hızı Etkisi	57
3.3.4. Adsorpsiyon İzotermi	58
3.3.5. Kriyojel Gözeneklerine Tutturulmuş D-Glukuronik Asit Baskılı Polimerlerin HA Bağlanma Etkinliğinin Ölçülmesi	61
3.3.6. Kriyojel Gözeneklerine Tutturulmuş D-Glukuronik Asit Baskılı Polimerlerin Seçiciliği.....	62
3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	62
3.5. MIP İçeren Kriyojellerle HA'nın Kromatografik Olarak Biyolojik Örneklerden Ayırımı	63
3.5.1. Balık Gözü ve Streptococcus equi Örneklerinden İzole Edilen HA'nın Karakterizasyonu.....	66
3.5.1.1. FTIR Analizi	66
3.5.1.2. NMR Analizi.....	67
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hyaluronik asitin yapısı	3
1.2. Hyaluronik asitin yapısındaki hedef bölgeler	4
1.3. Kriyojel oluşum süreci	7
1.4. Çeşitli şekillerde üretilen kriyojeller	8
1.5. Kriyojelin süngerimsi gözenek şekli	9
1.6. Farklı monomerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri	11
1.7. Farklı kopolimerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri	11
1.8. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi.....	12
1.9. Dimetilakrilamit-Protein A kriyojeli.....	13
1.10. Kitosan-Jelatin kriyojeli.....	13
1.11. Kriyojel kolon ile Sepharose kolonun geri basınç özelliklerinin karşılaştırılması	14
1.12. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları.....	18
1.13. Kovalent ve kovalent olmayan moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü	19
1.14. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	29
3.1. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü	48
3.2. MAH monomerinin ¹ H-NMR Spektrumu.....	49
3.3. MAH monomerinin FTIR spektrumu	49
3.4. D-glukuronik asit monomeri	50
3.5. A) D-glukuronik asitin FTIR spektrumu B) D-glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu C) D-glukuronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIPlerin FTIR spektrumları	52
3.6. MIP partikülleri içermeyen akrilamit kriyojeli SEM görüntüleri	54
3.7. Gözeneklerine MIP partikülleri tutturulmuş akrilamit temelli kriyojel SEMgörüntüleri.....	54
3.8. MIP partikülleri içermeyen akrilamit kriyojeli FTIR spektrumu.....	55

3.9. Gözeneklerine MIP tutturulmuş akrilamit temelli kriyojel FTIR spektrumu.....	56
3.10. Kriyojel gözeneklerine tutturulan polimerik mikrokürelere adsorplanan D-glukuronik asit miktarının HA başlangıç derişimi ile değişimi	57
3.11. HA adsorpsiyonuna pH etkisi	57
3.12. HA molekülü için Langmuir adsorpsiyon modeli.....	59
3.13. HA molekülü için Freundlich adsorpsiyon modeli	60
3.14. HA bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği.....	62
3.15. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş MIP'lerin rejenerasyonu	63
3.16. A) HA nın FPLC kromatogramı	
B) Balık gözü örneğinden izole edilen HA nın FPLC kromatogramı	
C) <i>Streptococcus equi</i> suşundan izole edilen HA nın FPLC kromatogramı	65
3.17. A) Ticari HA nın FTIR spektrumu	
B) Balık gözü örneğinden izole edilen HA nın FTIR spektrumu	
C) <i>Streptococcus equi</i> suşundan izole edilen HA nın FTIR spektrumu.....	67
3.18. HA, balık gözü ve <i>Streptococcus equi</i> suşu tarafından üretilerek Ortamdan izole edilen HA ve D-glukuronik asit, N-asetilglukozamin ¹ H-NMR analizi sonuçları	68
3.19. A) Ticari HA'nın Raman Spektrumu	
B) <i>Streptococcus equi</i> tarafından üretilerek fermantasyon ortamından izole edilen HA'nın Raman Spektrumu.	
C) Balık gözünden izole edilen HA'nın Raman Spektrumu.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. MIPIlerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerler	24
1.2. MIP sentezinde kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar	26
1.3. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri	30
3.1. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş MIPIlerin HA adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir ve Freundlich izotermilerinin karşılaştırılması	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAm	: Akrilamit
AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BET	: Gözenek boyutu analizörü
EDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
FT-IR	: Fourier Transform İnfrared Spektrometre
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
K	: Seçicilik katsayısı
k'	: Bağlı seçicilik katsayısı
K _d	: Dağılma katsayısı
MAH	: Metakrilamidohistidin
MBAAm	: N, N'- Metilen bisakrilamit
MIP	: Moleküler baskılanmış polimer
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre
PVAL	: Poli vinil alkol
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
Q	: Adsorpsiyon kapasitesi

1. GİRİŞ

Biyoteknolojideki gelişmeler, enzim, protein, hormon, nükleik asit gibi birçok biyomolekülün büyük kapasitelerle endüstriyel üretimini gündeme getirmiştir. Modern biyoteknolojik yöntemler ile üretilen veya biyolojik sıvılardan uzaklaştırılarak saflaştırılan biyomoleküllerin çok saf olarak elde edilme ihtiyaçları araştırmacıların biyomoleküllerin ayrılma ve saflaştırma işlemleri üzerinde daha fazla çalışmalarını sağlamıştır. Biyomoleküllerin saflaştırılmasında, ürün sağlığının yanı sıra saflaştırılan ürünün kararlılığını ve aktivitesini uygulanan işlemler ile kaybetmemesi önemlidir.

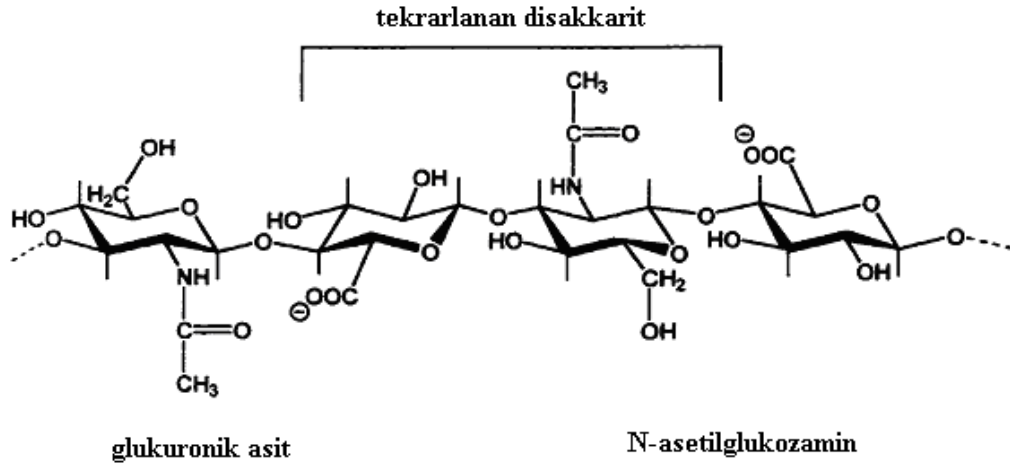
Son zamanlarda bilim ve teknolojiye reseptörlerin ve moleküler tanımlamanın önemi hızlı bir şekilde gelişmektedir. Moleküler baskılama tekniği çok yönlü reseptörleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak sağlamak için geliştirilmiştir. Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip sentetik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Moleküler baskılama yönteminde fonksiyonel monomerler baskılanacak molekül veya iyon ile polimerizasyon başlamadan önce ve polimerizasyon esnasında çapraz bağlayıcı varlığında moleküler etkileşime girerler. Polimerizasyon reaksiyonu sonucunda yüksek oranda çapraz bağlı polimer ağı oluşur. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle veya iyon seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül veya iyon polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, ilk aşamada makro gözeneklerine D-glukuronik asit baskılanmış polimer (MIP) tutturulmuş akrilamid tabanlı kriyojeller hazırlanmıştır. Hazırlanan MIP lerle yapısında D-glukuronik asit bulunan Hyaluronik asit (HA) molekülünün bu ucundan hazırlanan bu MIP lerle etkileşimi sonrası ayırımı ve saflaştırılması hedeflenmiştir. MIP partikülleri birbirine sağlam ve sürekli çapraz bağlarla bağlanmış süngerimsi gözenek yapısına sahip kriyojellerin gözeneklerine hidrojen bağlarıyla tutturularak HA ayırımı için sağlam bir katı destek maddesi elde edilmiştir. HA, vücutta yapısal, ve biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle

ayırımı ve saflaştırılması önemlidir. HA'yı ayırma-saflaştırma işlemlerinde; öncelikli olarak hazırlanan MIP'lerin HA'ya seçiciliğini saptamak amaçlı standart bir seri HA çözeltisi hazırlanmıştır. Sentezlenen MIP tutturulmuş kriyojellerin HA'ya seçiciliği, HA'yı tutma kapasitesi gibi parametreler incelenmiştir. Ardından; balık gözünden ve *Streptococcus equi* suşu tarafından üretilen HA'nın izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen HA kolon dolgu maddesi olarak ilk aşamada hazırlanan MIP tutturulmuş kriyojellerin kullanıldığı hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) cihazıyla ayrılmış ve saflaştırılmış ve cihazın fraksiyon kabından alınan HA, standart HA ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonunda; elde edilen verilere göre farklı biyolojik numunelerden izolasyonu yapılan ve MIP tutturulmuş kriyojel kolondan geçirilerek elde edilen HA'nın standart HA ile kıyaslandığında daha az maliyetle ve yüksek saflıkta elde edildiği ve kozmetoloji, oftalmoloji gibi farklı alanlarda kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

1.1. Hyaluronik Asit ve Önemi

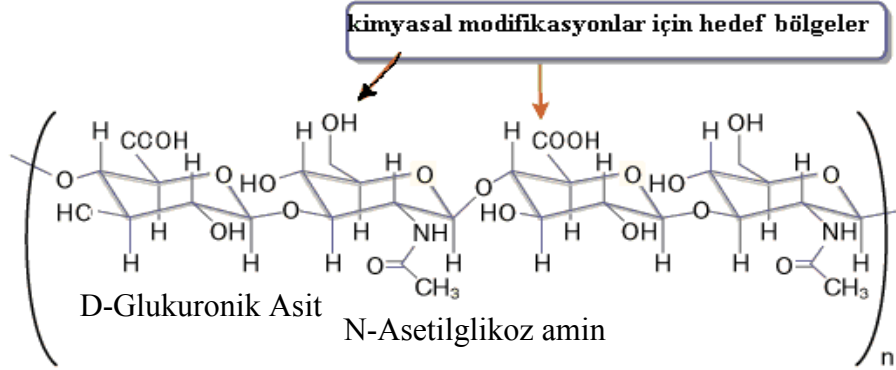
Hyaluronik asit (HA); D-glukuronik asit ve N-Asetil glukozamin gruplarının β -1,4 ve β -1,3 glikozidik bağ ile birbirleriyle bağlanmasıyla oluşan bir dissakkarit polimerdir. Kimyasal olarak, glikozaminoglikan adı verilen, bağ dokusu proteinleri grubunun en basit ve sülfat içermeyen tek üyesidir. İlk olarak Karl Meyer tarafından 1934 yılında gözdeki retinanın saydam sıvısından izole edilmiştir (Meyer, 1934). HA polimer yapısına bakıldığında 1000-5000 kDa aralığında geniş bir moleküler ağırlıkta bulunabildiği ve düz zincirli polimer yapısında 25000 dissakkarit tekrarları olduğu görülmektedir. Ancak bazen küçük fragmentler ve oligosakkaritler halinde de bulunabilmektedir. Yapıdaki dissakkaritler birbirlerine β -1,4 ve β -1,3 glikozidik bağ ile bağlanmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Hyaluronik asit'in yapısı

HA'nın genel formülü formülü $C_{14}H_{20}NNaO_{11}$ olup, kaynağına, izolasyon prosedürüne ve tanımlama metoduna göre değişen sodyum tuzları halinde bulunur. Epitel ve sinir dokunun en önemli bileşenlerinden biri olan HA, sinoviyal sıvı, bağ dokusu ekstrasellüler matriksi, göz vitröz sıvısı, hyalin kırıkta, eklem sıvısı, dermis, epidermis ve göbek kordonu gibi vücutta farklı bölgelerde bulunmaktadır. (Maleki A. ve ark. 2007, Iavazzo C. ve ark. 2007). HA vücutta yapısal, reolojik, psikolojik ve biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesinde önemli rol oynar. Dokuların hidrasyonu ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişinde, hücrelerin hareketinde, farklılaşmasında ve bölünmesinde, eklem kayganlığının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle ortopedi, romatoloji, oftalmoloji, dermatoloji ve kozmetolojide kullanılmaktadır (Yu H.ve ark.2008). Diğer doğal ve sentetik polimerlere göre çok daha fazla su tutma kapasitesine sahiptir, kendi hacminden bin kat fazla su tutabilir. Kırıkta hücreleri gibi doğrudan kan temini olmayan hücreler için HA'nın su tutma kapasitesi bu hücrelerde besinin sağlanması ve atıkların hücrelerden uzaklaştırılması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesine yardımcı olur (Luo H. ve ark. 2008). Ayrıca enjekte edildiği yerde uzun süre yapısında ve şeklinde deformasyon olmadığı için en çok tercih edilen dolgu maddesi olarak da görev yapmaktadır. Bu özelliği ile HA, yara tedavisinde kullanılmaktadır.

HA'nın yapısında bulunan karboksilik asit ve hidroksil grupları kimyasal modifikasyonlar için hedef bölgelerdir (Şekil 1.2.). Bu hedef bölgeler kullanılarak HA türevli biyomedikal malzemeler üretilmektedir.



Şekil 1.2. HA'nın yapısındaki hedef bölgeler.

HA, keşfedilmesinden bu yana yapısındaki hedef bölgelerden modifikasyonu yapılarak biyomedikal olarak farklı uygulamalarda kullanılmıştır. Erken yaşlanma hastalığı olan acrogeria tedavilerinde, katarakt ameliyatlarında, ortopedi alanında ise dizlerdeki ve eklemlerdeki kireçlenmelerin (osteoarthritis) tedavisinde ve bunlara ek olarak egzama tedavisinde günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Phul W. Ve ark. 1997, De Andrés Santos MI ve ark. 1994).

HA'nın yüksek biyo uyumluluk göstermesi ve dokuların ekstrasellüler matriksinde bol bulunması onu doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryal iskelet olarak kullanılabilir popülar bir malzeme yapmaktadır (Shu XZ ve ark. 2004). Diğer yandan prostat ve göğüs kanseri teşhis ve tedavisinde HA, tümör işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır. HA kozmetik amaçla yaşlanmaya bağlı kırışıklıkları azaltmak için dolgu maddesi olarak ve nemlendirici etkisi nedeniyle cilt bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır.

HA, ya hayvansal kaynaklardan ya da bakterilerden fermentasyon ve doğrudan izolasyon yöntemleriyle elde edilmektedir. HA ayrıca Grup C Streptokok gibi bazı bakterilerin kapsül bileşenidir. Grup A ve Grup C Streptokoklar glikozu asimile ederek çeşitli çevresel koşullar altında HA'yı ikincil metabolit olarak üretmektedirler. Bu bakterilerin sahip olduğu kalın HA tabakası

onlara konaklarının immün sistemlerinden korunmalarını sağladığı gibi aynı zamanda fagositler ve antibadiler tarafından da tanınmalarını sağlar (Kendall, F. Ve ark. 1937).

Yapılan bir çalışmada HA, insan göbek kordonundan izole edilerek, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmış ardından izole ürün HA'nın deri hastalıkları tedavisinde kullanılabilineceği gösterilmiştir (Lago ve ark. 2005).

1.2. Kriyojel

Kriyojel, monomerik ve polimerik öncülerin uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen jel matrisidir.

Kriyojel sözcüğü Yunanca kökenli olup, -kryos- (buz, soğuk) ve -jel- (jel) sözcüklerinin bir araya getirilmesinden meydana gelmiştir. Dolayısıyla soğukta yapılan jel anlamına gelmektedir.

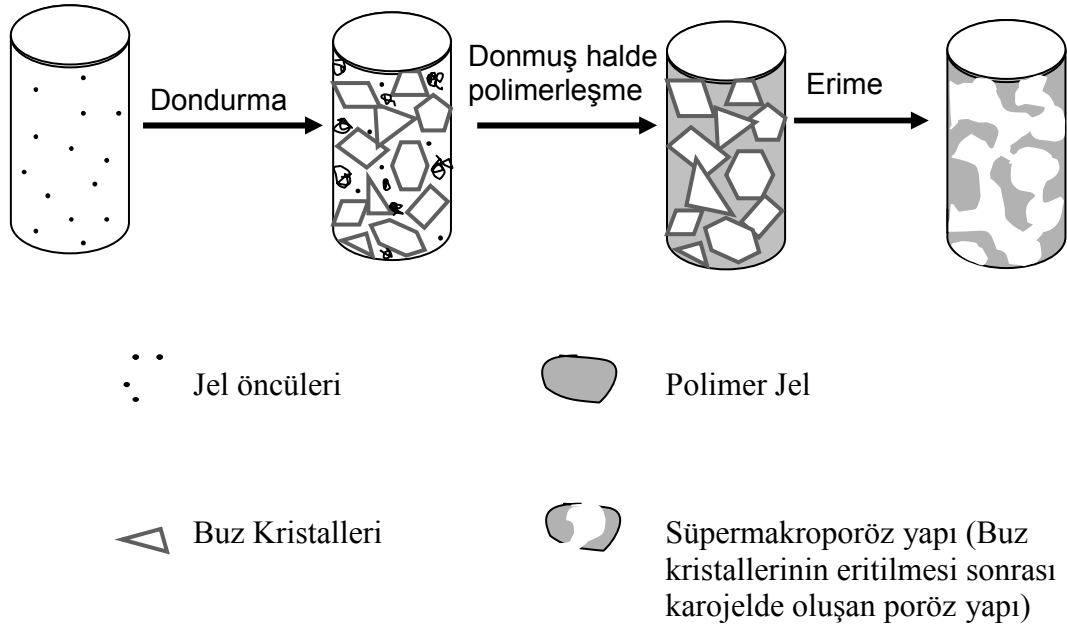
Kriyojeller birbirine bağlantılı büyük gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler pratik olarak, herhangi bir büyüklükteki çözünenlerin difüzyonuna, aynı zamanda nano partüküllerin, mikropartüküllerin kütle geçişlerine izin verirler. Kriyojellerin yapı iskeletine bakıldığında sünger morfolojisine sahip olduğu görülmektedir. Yani birbirine bağlantılı gözenekli sürekli bir yapı kriyojellerin temel yapısını oluşturur. Bu sünger şeklindeki gözenek sistemi çözünenlerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişlerini sağlar. Kriyojellerin temel yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla birleştirildiğinde, biyolojik nanopartüküllerin, mikropartüküllerin (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için bu yapıları ilgi çekici parçacıklar haline getirir (Lozinsky, I. V. ve ark. 2003).

Kriyojeller, karyotropik jelasyon işlemiyle üretilirler. Karyotropik jelasyon işlemi daha çok dondurma-eritme şeklinde gerçekleştirilen bir işlemdir. Kriyojel hazırlama sürecinin temel basamaklarından bahsetmek gerekirse, kriyojel oluşturmak için ilk önce monomer, monomer karışımları veya polimer uygun bir çözücüde çözülerek homojen çözeltisi şeklinde hazırlanır. Bu çözelti içerisine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli tepkime başlatıcı da eklenerek, hazırlanan homojen karışım belirli bir süre dondurucuda bekletilir, karışımın donması

sağlanır. Daha sonra buz halindeki karışım oda sıcaklığına alınarak polimer içinde oluşan buz kristallerinin erimesi ve bir yandan da kriyojel oluşumu başlar. Polimer içerisindeki buz kristalleri iyice eridiğinde, madde oda sıcaklığına geldiğinde, elde edilen birbirine bağlantılı gözeneklerden oluşan ürün, kriyojeldir (Yao, K ve ark. 2006). Kriyojel hazırlama sırasında öncü olacak maddeler seçilirken önemli bir nokta; termotropik jellerin kriyojel hazırlanmasında öncü olarak kullanılmayacağıdır.

1.2.1. Karyotropik Jelasyon İşleminin Temel Karakteristik Özellikleri

- Jel formasyon ajanları (monomer veya polimer) içeren çözelti çözücü kristalizasyon noktasının birkaç santigrat derece alt sıcaklığında dondurulur. Burada donmuş sistem tek bir katı halinde görünmesine rağmen aslında heterojendir ve donmuş çözücü kristalleri içerisinde donmamış sıvı mikro faz içerir.
- Jel oluşturma ajanları donmuş çözücü kristalleri içerisindeki donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır. Burada donmamış sıvı mikrofaz başlangıç toplam hacmin sadece küçük bir kısmını içermesine rağmen, jel öncülerinin derişimi jel oluşumunu ilerleterek yavaş yavaş artmaktadır.
- Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan görevini üstlenir. Eritildiğinde boşlukları terk ederler ve büyük gözenekler çözücü ile dolar. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey tansiyonu gözeneklerin şeklini belirler, gözenek yüzeyini pürüzsüzleştirir.
- Dondurulduğunda, çözücü kristalleri diğer kristallerle karşılaşmaya kadar büyürler ve bu yüzden erime sonrasında birbirine bağlanmış gözenekler sistemi jel içerisinde artar.
- Kriyojelin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikro gözenekler içerir. Böylelikle, kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekler içerirler (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Kriyojel oluşum süreci.

1.2.2. Jel ve Kriyojel Arasındaki Farklılıklar

Jel adı altına birleşen polimerik materyaller, makromolekülleri geniş mesafeli bağ yolu ile bağlanmış ve zaman içinde değişime uğramayan polimer-hareketsiz çözücü sistemleridir. Polimer ağlarının bağlantı yerlerindeki intermoleküler bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılabilir: Kimyasal ve fiziksel jeller.

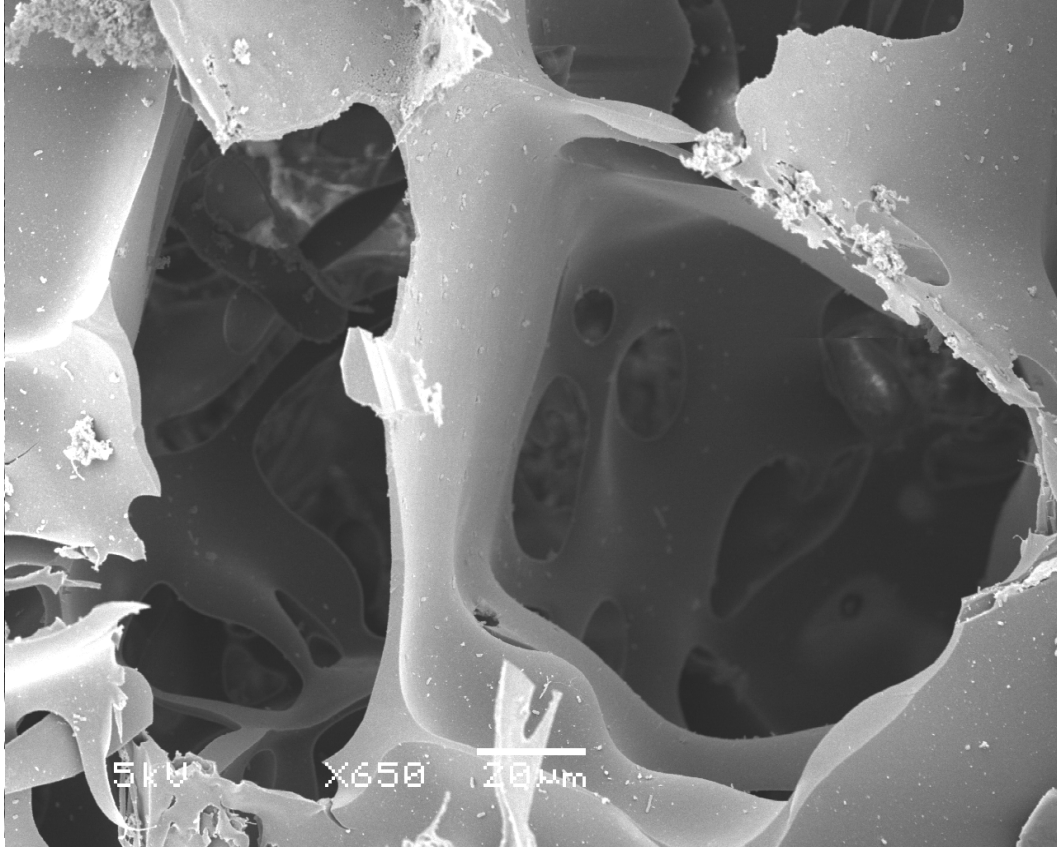
Kriyojeller herhangi bir kimyasal şekilde olabilirler: Kovalent, iyonik ya da non kovalent kriyojeller. Dondurma – kurutma polimerik materyalleri şeklinde düşünülerek hazırlanan jeller de kriyojellere benzer olarak makro ve mikro yapıda gözenekler içerirler. Çözücü kristallerinin (genellikle sulu sistemler için buz) süblimleşmesi sonucu elde edilen dondurulmuş çözücü, polimerik materyalde yani oluşan jelde birbirine bağlı gözenekler sistemi oluşturur. Fakat bunlar sadece ince objeler (filmler, ince tabakalar) şeklinde üretilbilirler. Bu jellerin silindirik halinde üretilmesi teknik açıdan pek pratik değildir. Diğer taraftan kriyojeller, bloklar, silindirler, tüpler, granüller ve diskler olmak üzere istenilen her şekilde üretilbilirler (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Çeşitli şekillerde üretilen kriyojeller.

Ayrıca bunlara ek olarak, kriyojellerin üretimi diğer dondurma- kurutma ile üretilen jellerin üretiminden daha basittir. Çünkü çözücü hareketi için kriyojel üretiminde indirgenmiş basınç gerekli değil iken, diğer jel üretiminde çözücü hareketi için indirgenmiş basınç gereklidir.

Birbirine bağlı geniş gözeneklerden oluşan bir sistem kriyojellerin temel karakteristik özelliğidir. Çözünenlerin bilinen homofaz jellerin içindeki difüzyonunun aksine, sünger şeklindeki gözenek yapısına sahip kriyojeller (Şekil 1.5.), çözünenlerin kriyojel içinden madde kaybı olmadan geçişlerine olanak verir. Diğer tür jellerde, çözünen, jel içerisinden geçerken madde kaybına uğrar (Lozinsky, I. V. ve ark. 2003).



Şekil 1.5. Kriyojelin süngerimsi gözenek şekli

1.2.3. Kriyojel Hazırlanması

Bir kriyojel elde etmenin genel prosedürü şu şekildedir:

1. Makromoleküller, düşük moleküler çözünenler (monomer, monomer karışımı veya polimer) ile çözücü içeren homojen karışım dondurulur.
2. Dondurulmuş sistemde donmuş çözeltinin polikristalleri oluşur. Ancak, ortamda aynı zamanda donmamış bir mikrofaz da bulunur.
3. Bu sistem kontrollü olarak erimeye bırakılır. Bu sırada kriyojellerin polimerik iskeleti oluşur, fakat aynı zamanda çok çok az miktarda çözücü de sistemde bulunmaktadır. Yani kriyojellerin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikrogözenekler içerir. Böylece kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekli bir yapıya sahip olurlar.

→ Kriyojel sentezleme işleminde öncü molekül bir polimer ise;

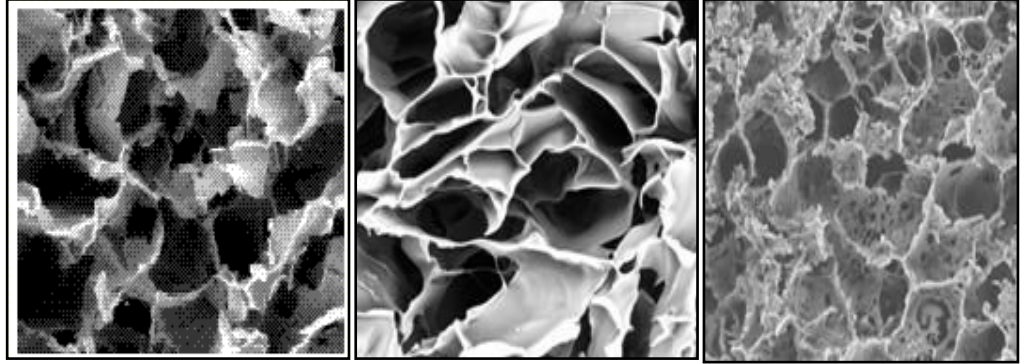
İlk basamakta polimer iyi çözüldüğü bir çözücünde çözülür. İçerisine katalizör görevi yapacak reaktif ya da dondurma işleminden önce polimer oluşumunu engelleyen reaktif hızlı bir şekilde iyice karıştırılarak eklenir. Bu reaktifin de çözücü içerisinde iyi bir şekilde çözünür olmasına dikkat edilmelidir. Elde edilen çözelti dondurulur. Buradaki donma sıcaklığının da çözücü kristalizasyon noktasının birkaç santigrat derece alt sıcaklığında olmasına özen gösterilmelidir.

→ Kriyojel sentez işleminde öncü molekül bir monomer ise;

Öncü molekülün monomer olduğu kriyojel sentezlerinde karyokopolimerizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde monomer önceden polimer haline getirilmez. Direkt olarak kriyojel sentezlenmesi prosesinde çözeltinin içerisinde, hem monomerden polimer oluşumu hem de çözücü kristallenmesi oluşur. Karyokopolimerizasyon yönteminin donma aşamasında, monomerler sulu çözeltilerinde donmuş halde bulunurken, aynı sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu da görülür. Bunun sonucunda buz kristalleri ya da buz blokları gözlenir. Dolayısıyla bu aşamada seçilecek olan sıcaklık değeri, monomerlerin donma noktasının altında ve aynı zamanda çözücü kristalizasyonu için de yeterli bir değer olmalıdır. Eritme aşamasında ise, kristal haldeki çözelti birbirine bağlanmış süper makro gözenekleri oluştururken, erimiş monomer çözeltisi ise bu kristallerin etrafında kopolimerizasyonu ve jel matriksini oluştururlar. Bu yöntemde ilk önce monomerler ve çapraz bağlayıcı bunları iyi çözen bir çözücünde çözülür ve hazırlanan çözelti içerisine katalizör görevi yapacak olan reaktif eklenir. Hazırlanan homojen karışım dondurulur ve donma işleminin ardından kontrollü bir şekilde oda sıcaklığında eritilir. Elde edilen ürün, öncü molekülün monomer olduğu kriyojeldir (Galaev, Y. I. 2002).

Kriyojeller sentezlenirken başlangıç öncü madde akrilamid, polivinil alkol, karbon, metilmetakrilat gibi sentetik kimyasallar olabildiği gibi, kitosan,

jelatin gibi doğal polimerler de olabilir (Şekil 1.6.). Ayrıca; sentetik maddelerle doğal polimerlerin kopolimerizasyonu oluşturularak öncü madde olarak; poli (vinil klorür- ko- jelatin, poli(akrilamid kitosan) gibi polimerler de olabilmektedir (Şekil 1.7.).



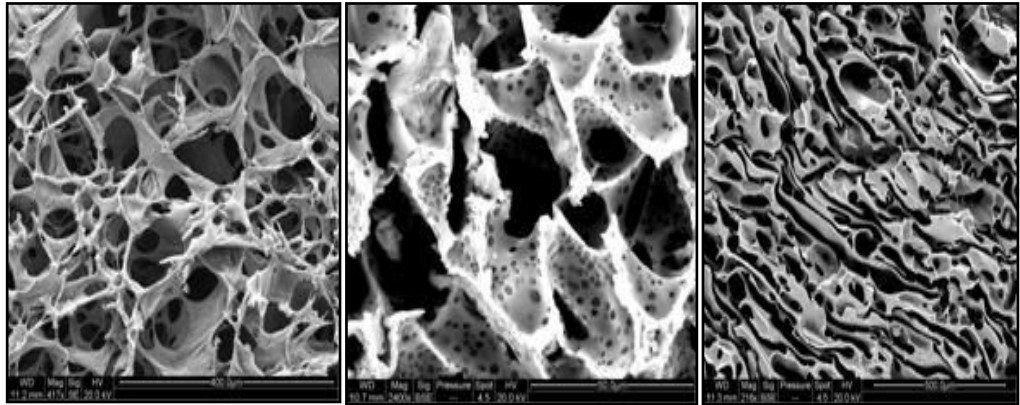
(1)

(2)

(3)

Şekil 1.6. Farklı monomerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri.

- 1) Poli(N-izopropilakrilamid) kriyojeli.
- 2) Kitosan-jelatin kriyojeli.
- 3) Poli(Akrilonitril) kriyojeli.



(a)

(b)

(c)

Şekil 1.7. Farklı kopolimerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri.

- a) Poli(dimetilakrilamid- ko- polivinilalkol)
- b) Poli(vinil klorür- ko- jelatin)
- c) Poli(akrilamid kitosan)

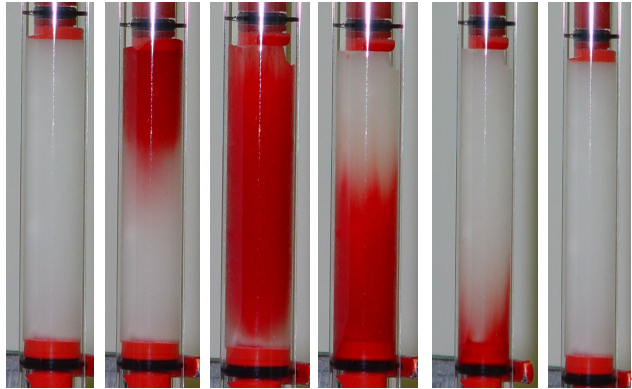
Kriyojellerin yapısındaki gözeneklerin büyüklüğü, gözenek dağılımı, yapının elastikliği sentez aşamasında kullanılan çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarlarıyla

ve donma işleminin süresiyle değişmektedir. Kullanılan çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcı oranı arttırıldığında daha sert ve sıkı yapıda gözenekler oluşmaktadır.

1.2.4. Kriyojellerin Uygulama Alanları

Kriyojeller sahip oldukları eşsiz yapısıyla kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak, memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak, doku mühendisliğinde ve günlük hayatta filtre ve membran olarak kullanımlarıyla karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanıldıklarında kolonda geri basınç oluşturmadıklarından verimli ayırımlar elde etmede kromatografi malzemesi olarak kullanılmaktadırlar.

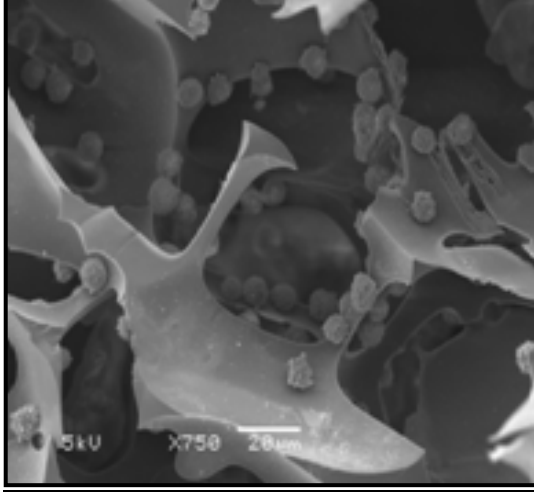
Kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak kullanımlarına bakıldığında; dimetil akrilamit, N-izopropil akrilamitten sentezlenen kriyojellere protein-A, antibody yada metal ligandlar gibi spesifik ligandlar immobilize edildiğinde seçici bağlanmayla ayrılması istenen hedef hücrelerin (kök hücre, kanser hücreleri, makrofajlar) kromatografisi için kullanım alanının olduğu görülmektedir (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi.

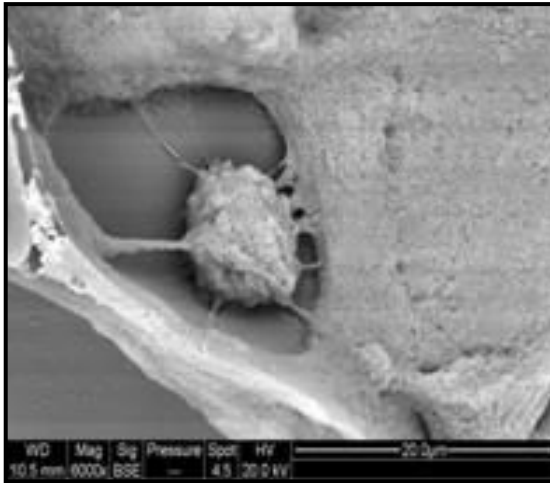
Memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak kullanımında akrilamit, poli akrilonitril veya polivinilprolidan tabanlı kriyojeller, kollajen veya jelatinle

modifiye edilir (Şekil 1.9.). Bu maddeler hücrelerin kriyojel içerisinde yaşamasına olanak sağlar.



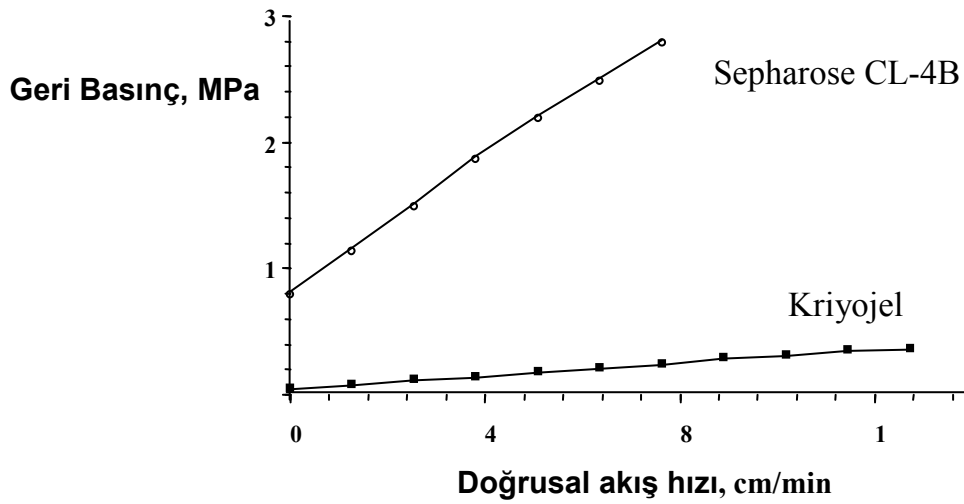
Şekil 1.9. Dimetil akrilamit-protein A kriyojeli (hücre kromatografisi)

Doku mühendisliğinde kriyojellerin kullanımında; polivinil kaprolaktam, dextran, jelatin ve aljinat içeren akrilamit, dimetil akrilamit, poli vinil alkol tabanlı kriyojeller jelatin veya kollojenlerle modifiye edilerek, doku hasarının giderilmesinde ya da rejenerasyonunda kullanılabilir yüzey oluşturmaktadırlar (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Kitosan-jelatin kriyojeli

Kriyojellerin kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanımları, diğer bir kolon dolgu maddesi olan Sepharose CL-4B kolon ile karşılaştırıldığında kriyojel kolonların akışa karşı direncinin diğer Sepharose kolonlara göre çok daha az, hatta ihmal edilebilir düzeyde olduğu ve bu özelliğinin de onları kromatografide kolon dolgu maddesi olarak ilgi çekici materyaller yaptığı bilinmektedir (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Kriyojel kolon ile Sepharose kolonun geri basınç özelliklerinin karşılaştırılması.

Kriyojellerle Vladimir I. Lozinsky ve ark. (Lozinsky, I. V. ve ark. 2003) tarafından yapılan çalışmada; kriyojellerin biyo ayırmada kullanılmasından faydalanarak, kriyojelde *Escherichia coli* hücrelerinin tutunmasını incelemişlerdir. Bunun için akrilamit kriyojeli hazırlamışlardır. Hazırlanan kriyojelde kapiler gözenek boyutu 10-100 μm aralığındadır. *E.coli* hücrelerinin büyüklüğü ise 1x3 μm dir ve kriyojelin gözeneklerinden kolayca geçebileceği düşünülmüştür. *E.coli* hücrelerinin kriyojelle tutunmasını sağlamak için kriyojel sentez aşamasında gözeneklerine bir ko-monomer tutturularak kriyojelin pozitif yüklenmesi sağlanmıştır. *E.coli* hücrelerinin yüzeyi de negatif yüklenerek, hücrelerin kriyojelde sürüklenmesi sırasında tutunmaları sağlanmıştır. Gerçekte *E.coli* hücreleri herhangi bir ligand içermeyen saf kriyojel yüzeyine tutunmaz. Bu nedenle hücrelerin tutunmasını sağlamak için böyle bir işlem yapılmıştır. Kriyojelle tutulan hücreler sodyum klorür solüsyonu ile elüe edilmiştir. Ard arda

yapılan işlemlerle *E.coli* hücrelerinin en fazla miktarda ayrılabilceği kriyojel kolonu özellikleri tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise kriyojellerin adsorpsiyon çalışmalarında kullanımı incelenmiştir (Kim, S.ve ark. 2006). Karbon kriyojellerinin fenol ve reaktif boyaları adsorpsiyonunu incelemiştirlerdir. Bunun için; aktive edilmiş karbon kullanarak hazırlanan kriyojelin temsil ettiği aktive edilmiş karbon mikrosferi ve karbon kriyojelinin temsil ettiği karbon mikrosferi olmak üzere iki ayrı adsorban yüzey kullanılmıştır. Reaktif boya olarak da Black 5 ve Red E kullanılmıştır. Aktive edilmiş karbonların çoğu gelişmiş mikroporoziteye ve yüksek yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle düşük moleküler ağırlıklı bileşikler için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, yüksek moleküler ağırlıklı büyük moleküllerin uzaklaştırılması için uygun değildir. Karbon kriyojelleri formaldehit (HCOH) ile resorsinolün $[C_6H_4(OH)_2]$ inert atmosferde piroliz ve dondurma-kurutma işlemleri takip edilerek çok zayıf bazik sulu çözeltideki sol jel polikondenzasyonundan sentezlenebilir. Karbon karyojelleri yüksek BET yüzey alanına ve geniş mezopor hacimlere sahiptir. Ayrıca mezopoziteleri reaktantların miktarları değiştirilerek, katalizörle ve sol jel polikondenzasyonu ile kontrol edilebilir. Yapılan çalışmada, karbon kriyojellerinin sıvı faz adsorpsiyonu için adsorban olarak kullanımları üzerine odaklanılmıştır. Fenolün adsorplanmasında, aktive edilmiş karbondan oluşan aktive edilmiş karbon karyojellerinin, karbon karyojellerine göre daha fazla miktarda fenol adsorpladığı görülmüştür. Ayrıca fenolün adsorplanmasına bakıldığında, test edilen örneklerin adsorpsiyon kapasitelerinin öncelikli olarak BET yüzey alanlarına ve mikro gözenek hacmine bağlı olduğu görülmüştür. Karbon kriyojellerinde Black 5 ve Red E adsorplanmasında ise, adsorplanan Black 5 ve Red E miktarlarının aktive edilmiş karbon kriyojellerinde adsorplanan miktarlarından daha fazla olduğu görülmüştür.

Ceyhun Babaç ve ark. Poli(akrilamit allil glisidil eter) [poli(Aam – AGE)] monolitik kriyojeline tutturulmuş immobilize konkanavalin A ya (con A) sulu çözeltiden insan immunoglobulin – G (IgG) ve insan plazmasının bağlanması üzerine çalışmışlardır (Babac, C. ve ark. 2006). Poli(akrilamit allil glisidil eter) kriyojeli, monomerlerin donmuş çözeltilerinden karyokopolimerizasyon işlemiyle

hazırlanmıştır. Elde edilen monolitik kriyojel 10 – 100 µm boyutunda birbiriyle bağlantılı sürekli bir polimerik matriks içermektedir. Con A epoksi gruplarıyla poli (Aam – AGE) karyojeline kovalent bağlarla tutturularak immobilize edilmiştir. Con A - poli(Aam – AGE) kriyojelinin maksimum IgG bağlama kapasitesi pH 7.4'te görülmüştür. Daha sonra %90 dan fazla adsorplanmış IgG sodyum klorür çözeltisi kullanılarak elüe edilmiştir. Diğer kan proteinleri için saptanan adsorpsiyon kapasiteleri ise fibrinojen için 1.0 mgg⁻¹ ve albümin için 1.7 mgg⁻¹ olarak bulunmuştur. Con A - poli(Aam – AGE) karyojelleriyle 10 tekrar yapıldığında, IgG moleküllerinin adsorpsiyon kapasitesinde kayıp görülmeden adsorpsiyon/ desorpsiyon için kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

1.2.5. Kriyojellerin Karakterizasyonu

Farklı monomerler, monomer karışımları veya polimer ya da polimer karışımları kullanılarak sentezlenen kriyojellerin, taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisiyle (FTIR), azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle ve şişme testlerinin uygulanmasıyla karakterizasyonu yapılmaktadır.

SEM ile görüntülemeyle kriyojel yapısındaki gözenek dağılımı, gözenek boyutları, yapıyı meydana getiren gözenek örgüsü gibi bilgiler elde edilmektedir. SEM ile görüntüleme yapmak için ilk önce örnekler kurutulur ve ardından altın ile kaplama yapılır.

FTIR analizi ile sentezlenen kriyojeldeki fonksiyonel gruplar aydınlatılır ve buna göre, kriyojel gözeneklerinin amaca yönelik bir madde için modifikasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği belirlenmektedir. Kriyojellerin FTIR spektrumları katı halde, IR spektroskopi cihazının ATR modunda çalışılarak alınmaktadır. Bu yöntemde kuru haldeki kriyojeller kristal üzerine konular ve üzerine infrared ışığı gönderilerek maddenin spektrumu alınmaktadır.

Azot adsorpsiyon porozimetri yöntemiyle, kriyojelin yüzey alanı, gözenek boyutu, gözenek hacmi, parçacık boyutu ve gözenek dağılımı gibi özellikleri belirlenmektedir. BET metoduna göre yapılan analizlerle –198 °C deki sıvı azot

ortamında azot (N₂) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m²g⁻¹ olarak yüzey alanları ölçülebilmektedir.

Şişme testiyle de kriyojellerin hidrofilik karakterde olmaları ve hacimlerinin % 150 sine kadar su tutma kapasiteleri bulunduğundan, sentezlenen kriyojele özgü bünyesindeki su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme miktarı belirlenebilmektedir. Kriyojellerin şişme oranı aşağıdaki eşitlik 1.1. ile bulunabilir.

$$\text{Şişme oranı (\%)}: [(w_{\text{şişmiş}} - w_{\text{kuru}}) / w_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (1.1.)$$

w_{şişmiş}: şişen kriyojellerin ağırlığı, w_{kuru}: kuru kriyojellerin ağırlığı

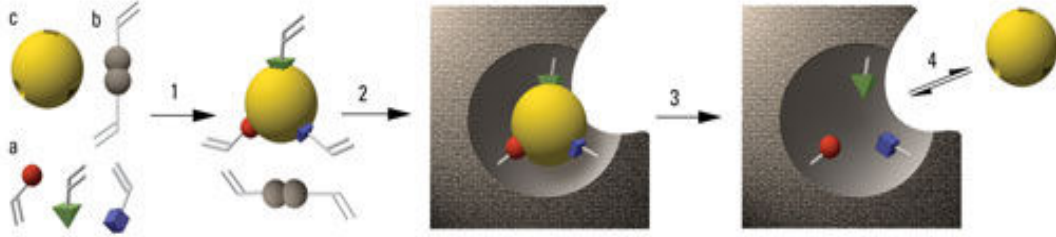
1.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler etkileşim kavramı oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1894’de Fischer’in enzim-substrat etkileşimini ortaya koyan ünlü “anahtar-kilit” modelini ortaya atmasıyla birlikte konuyla ilgili modern fikirler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu tanıma göre, enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan ve bu şekle uygun yapılar bulunmaktadır. Böylece substrat bir anahtar gibi enzimin aktif bölgeleriyle etkileşmektedir.

Moleküler etkileşim kavramının en yeni ve büyük çapta ilgi gören uygulamalarından biri de moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama (bellekleme) yöntemi farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin yüksek oranda seçicilikle ayrılması için akıllı polimer elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemidir (Diltemiz S. E.,2006).

Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır. Çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve birlikte polimerleşirler. Temel olarak monomerler kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla hedef molekül ile bir kompleks oluşturur. Polimerizasyondan sonra hedef molekül uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri hedef moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. Böylece esas olarak hedef molekülü seçici olarak tekrar

bağlayabilen polimer üzerine bir moleküler ‘kalıp’ baskılanmıştır. Şekil 1.12’ de moleküler baskılama yöntemi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.12. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları (a): Fonksiyonel monomerler, (b): çapraz bağlayıcılar ve (c): Kalıp molekül, (1): Kalıp molekül ile Fonksiyonel monomerlerin karışımı, (2): Çapraz bağlayıcılar ile fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonu, (3): Kalıp etrafında çözünmeyen ve yüksek çapraz bağlı polimerlerin oluşumu, (4): Kalıbın uzaklaştırılması

Moleküler baskılanmış polimerler (Molecularly imprinted polymers, MIP) biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Fakat moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden şu açılardan farklıdırlar.

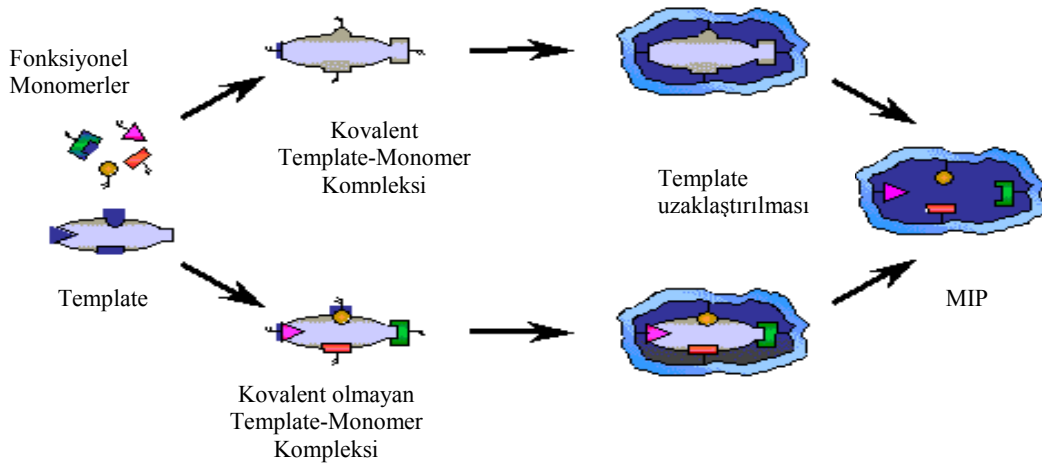
- Moleküler baskılanmış polimerler çok büyük, katı ve çözünmezdirler.
- Buna karşın bunların doğal karşılıkları olan biyolojik reseptörler daha küçük, esnek ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
- Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna karşın biyolojik reseptörler çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler.
- İlave olarak moleküler baskılanmış polimerlerdeki bağlama bölgelerinin popülasyonu heterojendir.

Ayrıca baskılama için kullanılan pek çok polimerin karmaşık yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlama bölgelerinin katı materyal boyunca bulunması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler moleküler baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önlerler (Haupt K. 2003).

Moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlımlıkları, asitler, bazlar metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdırlar.

Moleküler baskılı polimerleri hazırlamak için kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşime göre iki farklı yaklaşım kullanılır. Bunlardan biri Wulff ve ark. (1977) tarafından geliştirilen ön-organizasyon yöntemidir. Bu yöntemde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler birbirlerine kovalent bağlanma ile bağlanırlar ve polimerizasyon boyunca bu kompleks yapı kararlılığını korur (Şekil 1.13.).

Diğer yaklaşım Mosbach ve ark. (1981) tarafından geliştirilmiş olan kovalent bağlanma yerine kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve iyonik gruplar arasında gerçekleşen Coulomb etkileşimleri gibi etkileşimleri içine alan kovalent olmayan yaklaşımdır (Şekil 1.13.) (Vlatakis ve ark. 1993).



Şekil 1.13. Kovalent ve kovalent olmayan moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü.

Serbest radikal polimerizasyonu, çok yönlü uygulamaları ve deneysel kolaylığının yanında ekonomik bir yöntem olduğu için MIP'lerin hazırlanmasında en çok kullanılan tekniktir. Günümüzde endüstride en çok bu teknik tercih edilir (Komiya ve ark. 2002). Bu yöntemde polimerizasyon 2,2'-

azobis(izobutironitril) (AIBN) gibi bir radikal başlatıcının termal bozulmasıyla başlatılabilir.

Bu zamana kadar yapılan pek çok MIP çalışması radikal polimerizasyonu ile hazırlanan organik polimerleri açıklamaya yöneliktir.

Organik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan monomerler,

- a) Bazik (vinilpridin)
- b) Asidik gruplar (metakrilik asit)
- c) Yüklü gruplar (3-akrilamidopropiltrimetilamonyum klorür)
- d) Hidrofobik (stiren)
- e) Hidrojen bağı gösteren (akrilamit) vs. sayılabilir.

Monomerlere ilave olarak polimerizasyon karışımı sıklıkla, analit moleküllerinin baskılanmış bölgelere ulaşmasına izin veren, polimerde poröz bir yapı sağlayan bir çözücü içerir (Haupt., 2003).

1.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimer Hazırlama Yöntemi

Molekül baskılanmış polimer hazırlama yöntemi olarak aşağıdaki yöntemler verilebilir:

1. Yığın polimerizasyonu
2. Süspansiyon polimerizasyonu
3. Kimyasal aşılama
4. Soft litografi
5. Moleküler kendi kendine birleşme yaklaşımı
6. Elektropolimerizasyon (Ji-Lai G. ve ark., 2003)

Moleküler baskılamada genel olarak yığın polimerizasyonu kullanılır. Bu yöntem monomerlerin doğrudan doğruya veya pek az katkı maddesi ile polimerizasyonuna dayanır. Kondenzasyon polimerizasyonuna uğratılan monomerler genellikle bu yöntemle polimerleştirilir. Yabancı maddelerin polimerizasyon ortamına girme olasılığı düşük olduğundan polimerik ürünün ayrılması kolaydır.

Elde edilen katı polimer parçalanır ve uygun boyutlara öğütülür. Bu zaman alıcı bir işlemdir. Ayrıca bu polimerlerin sensörlerde algılayıcı elemanlar olarak modifiye edilmeleri kolay değildir ve elde edilen sensörün performansı düşüktür. Bu problemi çözmek için pek çok çalışma yapılmıştır. Bu yaklaşımlardan bir tanesi de elektropolimerizasyondur. Bu metotla herhangi bir şekil ve büyüklükteki elektrotun yüzeyine sıkıca bağlanmış polimer filmleri kolayca oluşturulabilir ve film kalınlığı iletken polimerler için geçirilen yük miktarı kontrol edilerek veya iletken olmayan filmlerin kendi içlerinde düzenlenmesiyle ayarlanabilir. Bu özellik kimyasal sensörlerin gelişimi için transdüser yüzeyi ve kaplama malzemesi arasında doğrudan bir ilişki oluşturma imkanı verir (Peng H. 2000).

1.3.2. Farklı MIP Hazırlama Yöntemlerinin Avantaj ve Dezavantajları

Wulff ve ark. 1977'de ilk kovalent baskılamayı gerçekleştirmişlerdir. 2:1 oranında p-vinilbenzenboronik asit ile 4-nitrofenil- α -D-monopyranoside'in (template) kovalent konjugesini sentezlemişler ve bu konjugeyi metilmetakrilat ve etilen dimetakrilat (çapraz bağlayıcı monomer) ile kopolimerize etmişlerdir.

Mosbach ve çalışma ark. moleküler baskılama için fonksiyonel monomer ve baskılanacak molekül arasında sadece kovalent bağların gerekli olmadığını göstermişler. Moleküler baskılamada kovalent olmayan etkileşimler doğadaki biyolojik etkileşimleri temel alır. Üstelik spesifik biyolojik tanıma çoklu etkileşimlerden oluşur. Moleküler baskılamada kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan yaklaşım sadece kalıbı tanıma değil aynı zamanda baskılanmış polimerdeki ligand-seçici bölgelerin üretimini de içerir.

Baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan etkileşimler çok yönlüdür. Bu etkileşim türü zayıf olsa da kendiliğinden çoklu etkileşim bölümlerin oluşması ile bunun üstesinden gelinebilir. Bu bağ türlerinin hızlı birleşme-ayırılma kinetikleri sayesinde kısa zamanda çok fazla kombinasyonlar yapılabilir. Baskılamada kovalent olmayan etkileşimlerin kullanılmasıyla doğadakine benzer tanıma bölgeleri oluşur. Kendiliğinden moleküler baskılama yaklaşımında iyonik, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı

ve metal koordinasyonu gibi zayıf moleküller arası etkileşimler analit ile monomer kompleksi arasında gerçekleşir. Sıvı fazdaki kompleks kendiliğinden oluşur ve çapraz bağlayıcı ile polimerleştirilir (Kriz, D. ve ark, 1997). Baskılanan molekül basit ekstraksiyon işlemi ile kolayca uzaklaştırılabilir.

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin bazı avantajları ve dezavantajları vardır (Haupt ve ark. 2002). Günümüzde kovalent olmayan yaklaşım pek çok araştırmacı tarafından baskılanmış polimer hazırlamak için kullanılmaktadır (Kriz ve ark. 1997; Zhong ve ark. 2001). Kovalent olmayan yaklaşım, kovalent olmayan etkileşimlerle kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesine polimerizasyon öncesinde olanak tanıdığından basit ve sorunsuzdur. Kalıp molekülün kovalent modifikasyonuna gerek yoktur ve kalıp monomer kompleksi oluşturmak için farklı bağlanma etkileşimleri kullanılabilir. Kovalent olmayan bağlanma kinetiği kovalent bağlanmayla kıyaslandığında enzim-substrat bağlanmalarına benzer (Sellergren 1988). Baskılanmış polimerleri hazırlamada, kalıp molekülün yapısı ve reaktivitesi hakkında spesifik bilgiye gerek yoktur. Buna ek olarak kovalent olmayan baskılamada kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler spesifik değildir. Kovalent olmayan polimerlerde bağlanma bölgelerinin dağılımı homojen değildir ve bu da spesifik olmayan bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküler tanınmasına neden olur (Katz ve Davis 1999; Dong ve ark. 2002). Eğer hazırlanan polimer kromatografi çalışmalarında kullanılacaksa pik genişlemesi gerçekleşebilir (Malik ve ark. 1994; Yoshizako ve ark. 1998). Kovalent yaklaşımda bağlanma bölgelerinin homojen dağılımını sağlamak için kararlı kalıp-monomer kompleksi baskılama işlemi öncesinde oluşturulur (Ikegami ve ark. 2004). Kovalent yaklaşımın dezavantajlarının çok olması nedeniyle sınırlı bir kullanıma sahiptir. Kovalent yaklaşımda polimer ağ örgüsü içindeki monomer-kalıp molekül arasındaki kovalent bağları kırıp kalıbın polimerden uzaklaştırılması işlemi oldukça zordur (Kriz ve ark. 1997; Sellergren 1988).

1.3.3. Baskılanacak Molekülün veya İyonun Özellikleri

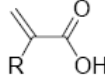
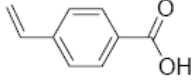
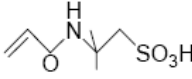
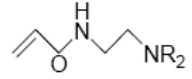
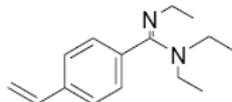
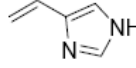
Tüm moleküler baskılama işleminde baskılanacak molekül veya iyon fonksiyonel monomerdeki fonksiyonel gruplarla doğrudan etkileşeceği için baskılanacak molekül çok önemlidir. Baskılanan molekül için önemli olan parametreler; baskılanan molekülün polimerleşebilecek grup içerip içermediği, serbest radikal 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 olmalı) (Cormack, P. A. G. ve ark. 2003). Özellikle eser seviyelerde etkili ayırma ve zenginleştirme için baskılanacak molekülün kantitatif olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Etkili bir ekstraksiyon ile baskılanacak molekülün % 99'u kadarı uzaklaştırılabilir. Geriye kalan % 1'i kuvvetli bir şekilde bağlanmıştır ve materyalin ard arda kullanılması ile yavaşça atılır. Bu analizin duyarlılığını sınırlar. Fakat, MIP hedef analit için yeterli sayıda tanıma bölgesi oluşturur. Baskılanacak molekül olarak, ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotit bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir.

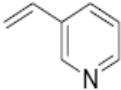
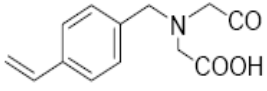
1.3.4. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Moleküler baskılı polimerlerin en önemli basamağı kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma basamağı olduğu için fonksiyonel monomerlerin seçimi kritiktir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısıdır. Non-kovalent moleküler baskılamada baskılamanın gerçekleşmesi için genellikle daha fazla miktarda baskılanacak molekül kullanılır. Kovalent olmayan baskılama için baskılanacak molekül fonksiyonel monomer oranı 1:4 oranında ya da daha yüksektir. Kompleks oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerin fonksiyonelliği ile baskılanacak molekülünün veya

iyonun fonksiyonelliğinin uyuşması çok önemlidir. Bununla birlikte, iki ya da daha fazla monomer ile kopolimerizasyon gerçekleştirilecekse, monomerlerin reaktivite oranlarının kopolimerizasyonu gerçekleştirebilecek özellikte olması gerekmektedir. Fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kompleksleşme monomerin sterik ve elektronik etkisine bağlıdır. MIP'lerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerlerin listesi Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. MIP'lerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerlerin listesi (Dmitrienko ve ark. 2004)

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısal Formülü
Akrilik asitler (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	
Vinilbenzoik asitler	
Akrilamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinylimidazoller	

Vinilpiridinler	
4-(Vinilbenzil)iminodiasetik asit	

1.3.5. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken dikkat edilmesi gereken diğer bir önemli noktada çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır (Idziak ve ark. 2001).

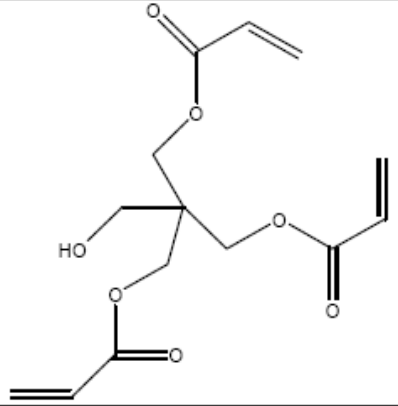
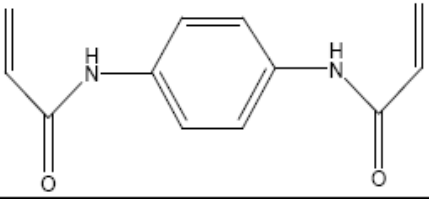
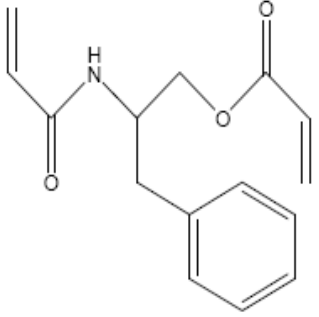
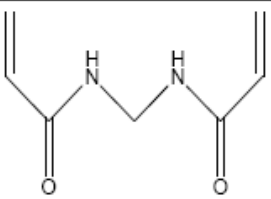
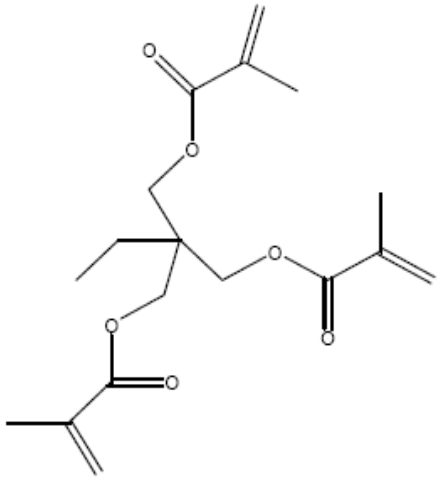
Baskılanmış polimerlerde çapraz bağlayıcılar öncelikle polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinde mekanik kararlılığının olmasını sağlar. Kalıcı gözenekli (makro gözenekli) 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 uyuşmalıdır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı ajan baskın olduğunda kopolimerizasyon etkili bir şekilde gerçekleşmez. 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 durumda kurulursa bu bölgeler bağımsız olarak çalışamazlar. Bir taraftaki

konuk bağlanma komşusundaki konuk bağlanmasını 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, F. ve ark. 2004). Moleküler baskılama için uygun birkaç çapraz bağlayıcı baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer gibi davranarak kendiliğinden kompleksleşebilir. Farklı türde çapraz bağlayıcı ajanının kullanılması ile konuk bağlanma bölgelerinin yapıları ve bunların etrafındaki çevre kontrol edilebilir.

Çizelge 1.2’de yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcıların listesi verilmiştir. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) en çok kullanılan çapraz bağlayıcıdır.

Çizelge 1.2. Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Moleküler Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Moleküler Yapısı
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	
N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	

MIP'lerde polimer ağ-örgüsü içinde analite seçici oyuk oluşumu uygun çapraz bağlayıcı ve çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranına bağlıdır. Farklı çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılı polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve bu da seçiciliği etkiler.

1.3.6. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan Çözücüler

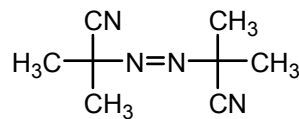
Çözücü, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını, gözenekli polimerde ise gözeneklerin oluşmasını sağlar. Bu nedenle çözücüye genellikle 'porogen' denir. Makro gözenekli polimer hazırlandığında, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmek için kullanılabilir. Çözücünün bu iki görevi yanında kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu arttırma gibi bir görevi de vardır. Polimerden konuk bağının bırakılmasını gözeneklilik kolaylaştırır. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerlerin içine dahil edilir ve son işleme uzaklaştırılır. Bu işlemler süresince, boşluk çözücü molekülleri tarafından polimerde gözenek olarak tutulur. Çözücü bakımından az olarak hazırlanan polimer çok sert ve yoğun olur ve güçlükle baskılanacak molekülü bağlar. Çözücünün diğeri 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 baskılamanın 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 etkileşimin oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için çözücü seçimi daha önemlidir. Kloroform çoğu monomer ve baskılanacak molekülü iyi çözdüğü için ve hidrojen bağlanmasını güçlükle önlemesi nedeni ile çok yaygın olarak kullanılan çözücülerden biridir. Bununla birlikte, ticari kloroformda depolama süresince fosgen oluşumundan kurtulmak için etanolle stabilize edilir. Bu etanol monomer ile baskılanacak molekül

arasındaki hidrojen bağlanmasını engellemesi nedeni ile çoğu moleküler baskılama için (özellikle kovalent olmayan baskılama için) uygun değildir. İyi bir sonuç elde etmek için kloroform kullanılmadan önce damıtılmalıdır. Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır (Chapuis, F. ve ark. 2004). Normalde toluen gibi protik olmayan çözücüler hidrojen bağını kararlı kıldığı için tercih edilir. Bununla birlikte, kompleksleşmede hidrofobik kuvvetler kullanılıyor ise çözücü olarak su seçilebilir.

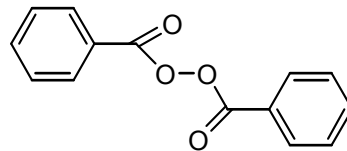
Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir. Hazırlanan polimerin analite seçiciliği için oluşan kavitenin analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar ne de çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır. Ayrıca MIP'ler farklı çözücülerde farklı şişme özellikleri gösterirler. Şişme fonksiyonel grupların üç boyutlu yapısını değiştirdiği için ve bu MIP'in seçiciliğinin değişmesine yol açtığından analit tanıma basamağında daha zayıf bağlanmalar oluşmaktadır.

1.3.7. Moleküler Baskılı Polimer Hazırlamada Kullanılan 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. Azobisisobutironitril (AIBN), benzoilperoksit (BPO), azobisdimetilvaleronitril (ABDV), 4,4'-azo-(4-siyanovalerik asit) yaygın olarak kullanılan başlatıcılardır (Şekil 1.14.).



Azobisisobütironitril (AIBN)



Benzoilperoksit (BPO)

Şekil 1.14. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.

1.3.8. Moleküler Baskılı Polimerlerin Özellikleri

MIP'ler, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlılıkları, asitler, bazlar, metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları nedeniyle oldukça dayanıklıdırlar. Ayrıca polimerlerin depolama dayanıklılıkları da çok yüksektir. Dönüşümlü derecelerde onlarca yıl muhafaza edilebilme performansı gösterir yani polimer uzun süre özelliğini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilir. Çizelge 1.3'de polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri verilmiştir.

Çizelge 1.3. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri

Özellikleri	Karakteristikleri
Fiziksel Dayanıklılığı	Mekanik baskıya,yüksek basınca ve yüksek ısıya dayanıklı
Kimyasal Dayanıklılığı	Asitlere,bazlara,çeşitli organik çözücülere ve metal iyonlara dirençli.
Depolama Dayanıklılığı	Performansı kaybetmeden çok uzun süre dayanabilir.
Kapasitesi	0.1-1 mg baskılanmış molekül/g polimer
Geri Dönüşümlülüğü	>99%

1.3.9. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Molekül baskılanmış polimerler aşağıdaki alanlarda kullanılmaktadırlar.

1. Moleküler tanımlama çalışmalarında,
- 2 .MIP'lerin ayrılması ve izolasyonunda,
 - Kiral ayırmalar
 - Substrat-seçici ayırmalar
3. Polimerin antibadi ve reseptör taklidi olarak bağışıklık sistemi analizlerinde,
 - Ligand bağlı analizlerde rakip olarak
 - Tanı kullanımlarında
4. Polimerlerin katalitikte enzim taklidi olarak,
5. Biyosensör olarak,
6. Katı faz ekstraksiyonunda,
7. Sıvı kromatografisinde,
8. Kapiler elektroforezde,
9. Kapiler elektrokromatografide,
10. Kimyasal sensörlerde (Byrne, M. E. ve ark. 2002).

MIP, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), katı faz ekstraksiyonu, bağ analizlerini içeren pek çok farklı analitik teknikte ve sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanılır. HPLC'de sabit faz sorbentleri olarak MIP'lerin uygulamalarında, HPLC kolonlarını doldurmak için büyük miktarda MIP ve dolayısıyla büyük miktarda hedef molekül gereklidir. Hedef moleküllerin pek çok durumda az bulunması ve pahalı olması problem oluşturabilir. Bu yüzden MIP'lere dayanan minyatürize edilmiş yeni kromatografik metotların geliştirilmesi gerekmektedir. Kapiler elektrokromatografi (CEC) bu isteği karşılar, çünkü kapiler kolon hacmi geleneksel HPLC kolon hacminden daha küçüktür. Ayrıca, yüksek derecede ayırma verimleri, daha hızlı analiz zamanları ve daha az numune tüketilmesi bu teknik kullanılarak sağlanabilir.

1.3.10. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonları

1.3.10.1. Elemental Analiz

Elementel analiz bilinmeyen maddenin elementel bileşimi hakkında bilgi edinmek için kullanılan klasik metodlardan biridir. Elementel analiz, örneklerde bulunan Karbon, Hidrojen, Azot ve Klor'un kütle yüzdesi olarak ölçülmesinde kullanılır. Azot, halojen, sülfür, fosfor gibi elementleri içeren türlerin eklenmesi ya da uzaklaştırılması kolayca tayin edilebilir (Cormack, P. A. G. ve ark, 2004).

1.3.10.2. Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Çözünmeyen polimerlerin infrared spektrumu polimerlerin KBr peletlerinin hazırlanması ile kolayca elde edilir. Monomerler bantları ile polimerler bantlarının karşılaştırılması ile monomerlerin birleşmesinin boyutu belirlenebilir. Baskılanmış polimerlerin FTIR spektrumu elementel analiz gibi polimerin bileşimi hakkında ve örnek, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı farklı çevrelerde olduğunda önemli bilgi verir (Cormack, P. A. G. ve ark, 2004).

1.3.10.3. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çözülebilir polimerlerin düzeninin belirlenmesi için kullanışlı bir metottur. Çözünmeyen türler katı hal NMR ile analiz edilebilir. Ağ polimerleri için örnekteki farklı kimyasal çevre hakkında bilgi verir. Çapraz polarizasyon sihirli açı spin, (cross-polarisation magic angle spinning, CP-MAS) ile farklı türdeki karbon atomlarının yaptığı bağıl miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Bu özellikle divinil monomerlerinin polimerizasyonundan sonra geriye kalan reaksiyona girmemiş çift bağların miktarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan tekniktir. Bununla birlikte baskılanmış polimerlere bağlanmayı izlemek için de kullanılır (Cormack, P. A. G. ve ark, 2004).

1.3.10.4. Kuru Haldeki Gözenek Yapısı

Gözenekli maddelerin gözenek yapısı spesifik yüzey alanı, S (m^2g^{-1}), spesifik gözenek hacmi, V (mlg^{-1}), ortalama gözenek çapı (A^0), gözenek büyüklüğü dağılımı ile belirlenebilir. Bu parametreler genellikle azot ya da civa geçirgenlik ölçümleri gibi gaz adsorpsiyon-desorpsiyon ölçümleri ile belirlenebilir (Cormack, P. A. G. ve ark, 2004).

Azot sorpsiyon porozimetricde belirli basınç serilerinde gaz belirli kütledeki kuru polimere uygulanır. Basıncın fonksiyonu olarak emilen gazın miktarının ölçülmesi yüzey alanı ve gözenek boyutu analizörü (BET) ve matematik modellerin uygulanmasıyla sorpsiyon izotermelerinden spesifik yüzey alanı (m^2g^{-1}), spesifik por hacmi (mlg^{-1}), ortalama gözenek çapı ve gözenek büyüklük dağılımı elde edilebilir. Bu metot orta büyüklükteki ve küçük gözenekli polimerlerin analizi için kullanışlıdır. IUPAC'ın tanımına göre mikrogözenekli polimerler < 2 nm, orta gözenekli polimerler 2 nm-50 nm arası, makrogözenekli polimerler ise > 50 nm olarak belirlenmiştir. Her bir ekleme sonrası denge basıncının ve eklenen gaz miktarının kaydedilmesi sonucu adsorpsiyon izotermeleri adsorplanan gaz miktarının $0 < p/p_0 < 1$ aralığında bağlı basıncın fonksiyonu olarak çizilir. (p : denge basıncı, p_0 : saf sıvı emicinin doyumluk buhar basıncı). Gaz adsorpsiyonun mekanizması moleküler çap ile gözenek çapı arasındaki orana bağlıdır (Cormack, P. A. G. ve ark, 2004).

Civa geçirgenliği ile analiz, belirli kütledeki kuru polimere çeşitli basınçlarda civa uygulanması işlemini içerir. Bu metodla makro gözenekli yapılarda daha duyarlı sonuçlar elde edilmesine karşın azot sorpsiyon porozimetri ile benzer bilgiler elde edilir. Civa geçirgenliği yıkıcı bir teknik olduğundan dolayı materyalin mekanik olarak sağlam olması gerekmektedir.

Gözenek büyüklüğünün azalması ile yüzey alanı artar. Mikrogözenekli adsorbanlar: $> 500 m^2g^{-1}$, ortagözenekli adsorbanlar: $10-500 m^2g^{-1}$, makrogözenekli adsorbanlar: $< 10 m^2g^{-1}$. Adsorbanların por büyüklüğüne bağlı olarak yüzey alanlarının hesaplanmasında farklı modeller uygulanır. Orta ve

makro gözenekli adsorbanlar izotermin $0.05 < p/p_0 < 0.35$ bölgesinde en iyi BET ile ölçülür.

Makro polimerler kuru haldeyken bile sürekli gözeneklidir ve gözenek ağırlık değerlendirmek için çözücü kullanılabilir. Alınan çözücü miktarının ölçülmesi ile polimerin spesifik por hacmi ölçülebilir (mlg^{-1}).

Eğer adsorban orta gözenekli ya da mikrogözenekli ise azot adsorpsiyon ölçümlerinden spesifik por hacmi ölçülebilir. Gözenek çapı 1000 \AA 'dan büyük olan makrogözenekli adsorbanlar için por hacmi, basınç-hacim eğrisinin integre edilmesi ile civa geçirgenliği ölçümleri ile belirlenebilir.

Mikroskopi, çeşitli büyüklük derecelerindeki baskılanmış polimerlerdeki farkı incelemede kullanılır. Örneğin, ışık mikroskopi polimer mikrokürelerinin yapısal bütünlüğünü doğrulamada kullanılırken, taramalı elektron mikroskobu (SEM) makro gözenekleri görüntülemek için kullanılır.

1.3.10.5. Şişmiş Haldeki Gözenek Yapısı

Gözenekli adsorbanlar genellikle sıvı ortamında kullanıldıkları için şişme oranları önemlidir. Adsorbanlar belirli çözücü için polimerin ilgisine ve çapraz bağlayıcıların dağılımına ve derecesine bağlı olarak şişerler. Kuru polimer tüpe koyularak yüksekliği ölçülür. Ardından çözücü koyulur ve mikroküreler oda sıcaklığında şişerler (Komiya, M. ve ark. 2003; Cormack, P. A. G. ve ark, 2004). Mikrokürelerin yüksekliği işaretlenerek şişme oranı aşağıdaki eşitlik 1.2. ile hesaplanır.

$$\text{Şişme oranı (\%)}: [(h_{\text{şişme}} - h_{\text{kuru}}) / h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (1.2.)$$

$h_{\text{şişme}}$: şişen kürelerin yüksekliği, h_{kuru} : kuru kürelerin yüksekliği

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

D-glukoronik asit ve metakroilklorür Sigma (St Louis, MO, USA) firmasından elde edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmış ve etilenglikoldimetakrilat (EDMA) hidrokinonin inhibitörü ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4°C’da saklanmıştır. Poli vinil alkol (PVAL; MW: 100.000, 98% hidrolize) ve Azobisisobutironitril (AIBN) Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Tüm cam malzemeler kullanımdan önce seyreltilmiş nitrik asitle yıkanmıştır. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneylede kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tampon ve örnek çözeltileri 0.2 µm membran’dan (Sartorius, Göttingen, Germany) geçirilerek filtre edilmiştir. Histidin fonksiyonel monomeri, Metakrilamidohistidin (MAH) ve metal şelat monomeri, MAH-Cu(II), yayınlanmış prosedürlere göre sentezlenmiştir (R. Say ve ark. 2002; R. Say ve ark. 2003).

Akrilamit (AAm, %99) Sigma–Aldrich’ ten temin edilmiştir. N, N'- Metilen bisakrilamit (MBAAm) Fluka, Chemica ve N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından, N-Asetil glukoz amin (99%) ise Aldrich Chemical Company, Inc. firmasından elde edilmiştir. N-Asetil glukoz amin ve D- glukuronik asit çözeltileri ayrıca kriyojele tutturulmuş glukuronik asit baskılı polimerlerin seçicilik testlerinde kullanılmıştır. Amonyum per sülfat ise laboratuvar stoklarından sağlanmıştır.

Standart hyaluronik asit (HA)çözeltileri hazırlamada kullanılan hyaluronik asit Fluka (BioChemica) firmasından “Hyaluronic acid Na Salt from

Streptococcus equi.” formunda temin edilmiştir. Diğer çözelti hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından elde edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için hazırlanan standart HA çözeltilerinin absorbanları UV-1601 UV-Visible Spectrometer/SHIMADZU marka UV cihazında okutularak ölçülmüştür. Çözeltilerin pH değerlerine WTW Series pH 730 Inolab- pH-metresi ile bakılmıştır. Karakterizasyon işlemlerinde Perkin Elmer 2000 Model FT-IR, NOVA 2200 Surface Area & Pore Size Analyser/Quantachrome Ins. model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı, Bruker DPX FT NMR (500 MHz) NMR cihazı ve LEO S440 model SEM cihazları kullanılmıştır. Ayırma-safılaştırma basamağında Amersham Biosciences Äkta FPLC model hızlı protein sıvı kromatografisi cihazı kullanılmıştır.

2.1.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC)

Kromatografi, bir karışımın poröz bir ortamda, hareketli bir çözücünün etkisiyle, karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketler sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanır. Kromatografik yöntemlerde karışımdaki bileşenler, hareketsiz fazın içerisinden hareketli fazın geçirilmesiyle birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Bu ayırma sırasında her iki faz birbiriyle etkileşime girmektedir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olan bileşenlerin her iki fazla olan etkileşimleri de farklı ölçüde olmaktadır. Böylece hareketli faz tarafından yürütülen bileşenler, sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulduklarından, sabit fazı farklı zamanlarda terk etmektedirler. Ayırma ortamında en az tutulan bileşen ortamdaki ilk önce, en fazla tutulan bileşen ise en son ayrılmaktadır. Bileşenlerin ayırma ortamı tarafından alıkonma süreleri birbirinden yeteri kadar farklı ise bileşenlerin birbirinden ayrılması gerçekleşmektedir (Erdik ve ark. 2001).

Kromatografik yöntemler, hareketli ve hareketsiz fazın türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- a) Kolon Kromatografisi
- b) Gaz Kromatografisi
- c) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
- d) Süperkritik Akışkan Kromatografisi
- e) İyon değişim Kromatografisi
- f) İnce Tabaka Kromatografisi
- g) Kağıt Kromatografisi

Bu yöntemlerden sıvı kromatografisi, hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüdür. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşikler, kolonda bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşime girerek, kolonu farklı zamanlarda terk ederler ve böylece karışımdaki bileşenlerin birbirlerinden ayrılmaları gerçekleşmiş olur.

Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC), kompleks karışımlardan proteinlerin ayrılmasını veya saflaştırılmasını sağlayan bir kromatografi cihazıdır. Proteinler bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerinde en bol bulunan organik bileşiklerdir. Bütün biyolojik olaylarda önemli görevler üstlenmişlerdir: Enzimatik katalizleme, Mekanik hareket, Koruma, Taşıma ve depolama gibi. Proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkisini belirleyip yaşamsal alanda kullanmak birincil amaçtır ve insan vücuduna verilecek protein çok saf olmalıdır, aksi takdirde bir çok yan etkiye yol açabilir. Bu nedenle proteinlerin saflaştırılması önemlidir.

FPLC, bir pompa, bir UV-Vis dedektör, bir kolon, enjektör birimi ve fraksiyon toplama parçalarından oluşmuştur. Sistem protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir hızlı performans sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif bazda HPLC analizleri yapmak için uygundur. Cihaz ayrılan türlerin UV absorbansını ölçmekle birlikte; ortamın, iletkenlik ve pH ölçümünü de yapabilmektedir.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden farklı olarak daha düşük basınçlarda çalışır ve genellikle cam veya teflon bileşenlerden oluşur. Cihaz genellikle biyokimya ve enzimoloji alanlarında kullanılır (Kunz ve ark. 1989,

Hollar ve ark. 1991). FPLC ile kullanılan kolonlar; makromolekülleri, yük, boyut, hidrofobisite veya biyotanıma esaslarına göre ayırabilirler. Bu nedenle amaca yönelik uygun bir kolon seçmek gereklidir. Sistem protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif bazda HPLC analizleri yapmak için uygundur. FPLC cihazı ayrılan türlerin UV absorbansını ölçmekle birlikte; ortamın, iletkenlik ve pH ölçümünü de yapabilmektedir (Özcan A, 2007).

2.1.3.1. FPLC Cihaz Bileşenlerinin Özellikleri

FPLC cihazında aşağıda belirtilen türden dedektörler kullanılabilir;

UV-Vis dedektör; Ksenon flaş lambası hem UV hem görünür bölge aralığında çalışır (190-700nm). Çift yollu akış hücresi dinamik absorbans aralığını 10⁻⁵'den 40 AU'nin üzerine kadar genişletir.

Floresans dedektörüyle luminesans, fosforesans, kemilüminesans ve bioluminesans ölçümleri mümkündür.

Kırılma İndisi Dedektörü; polimerler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, alkoller ve yağ asitleri gibi absorbans yapamayan bileşiklerin analizleri için idealdir.

FPLC cihazında kullanılan pompa, güçlü mekanik motoru sayesinde 4000 psi (275 bar) geri-basınçlarına kadar dakikada 50 ml sıvı pompalayabilir.

FPLC cihazındaki fraksiyon toplayıcısında 18 mm çapındaki tüpler için 144 parça kapasitesi vardır.

FPLC cihazında farklı analiz metotları için farklı kolonlar kullanılabilir:

İyon-değiştirme metodu için; Hiprep 16/10 Q sefaroze XL ve Hiprep 16/10 SP sefaroze XL kolonları bulunur. Sefarozla önceden paketlenmiş Q XL or SP XL ortamı, 20 ml preparatif anyon ve katyon-değişim kolonları yüksek yükleme kapasitesi ve hızlı elüsyon sağlar.

Jel filtrasyon metodu için; Hiload 16/60 superdex 200pg ve Hiload 26/60 superdex 75 pg kolonları bulunur. Superdex 75 kolonu prep peptidler, daha büyük

proteinler, oligosakkaritler yani Mr 3000-70000, için uygundur; Superdex 200 kolonu ise prep antikorlar ve Mr 10000-600000 proteinler için uygundur.

FPLC de hazırlanan örneklerin özelliklerine bakıldığında, 100 μ L-5mL arasında berrak ve safsızlıklardan arındırılmış sıvı örneğin FPLC sistemine enjeksiyonu yapılabilir. Biliniyorsa örnek içerisindeki protein miktarı veya derişimi de verilmelidir. Analizi yapılacak örnek, FPLC cihazına enjeksiyonla verilir ve hareketli faz sayesinde ayırımın yapılacağı kolona taşınır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) Monomerinin Sentezi

2-metakriloamidohistidin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g histidin ve 0.2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃ (% 5, v/v) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuş ve 4.0 mL metakroilklorür, yavaşça bu çözeltiye ilave edilmiştir. Karışım azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, çözeltinin pH'ı 7.0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH), etanol ve etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu(II) (MAH-Cu(II)) Metal-Şelat

Monomeri Sentezi

Metakrilamidohistidin-Cu(II) (MAH-Cu(II)) metal-şelat monomerinin sentezi için MAH monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 1.0 mmol bakır(II) sülfat penta hidrat yavaşça ve sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Bu çözelti 3 saat karıştırma sonunda berrak mavi renge dönüşmüş ve döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılarak etanol/asetonitril karışımından kristallendirilmiştir.

2.2.3. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanması

Metakroil-(L)-histidin-Cu(II)-D-glukuronik asit ligand ön-organize monomerinin hazırlanışı MAH-Cu(II) ve kalıp D-glukuronik asit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MAH-Cu(II) (1.0 mmol) ve D-glukuronik asit (1.0 mmol), 3.0 mL etanol'de 20 dakika karıştırılarak çözülmüştür. Ardından D-glukuronik asit baskılanmış mikroküreler süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Dispersiyon ortamı 60 mL suda 0.2 g poly(vinyl alkol) çözülerek sağlanmıştır. Önorganizasyonu yapılmış MAH-Cu(II)-D-glukuronik asit monomer kompleks (1.0 mmol) çözeltisine 8.0 mL EDMA/12.0 mL toluen-asetonitril çözeltisi eklenmiş ve 0.09 g AIBN monomer karışımında çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra termostatik bir su banyosunun içinde bulunan cam bir polimerizasyon reaktöründe (100 mL) manyetik karıştırıcıyla (sürekli karışım oranı 600 rpm) karıştırılmıştır.

Reaktör nitrojen kabarcıkları oluşturmuş ve daha sonra kararlı hale geçmiştir. Reaktörün sıcaklığı 6 saat boyunca 75°C'de tutulmuştur. Sonrasında 3 saat boyunca 90°C'de tutularak polimerizasyon tamamlanmıştır.

Polimerizasyon sonunda D-glukuronik asit baskılanmış mikroküreler polimerizasyon ortamından ayrılır. Atıklar (bağlanmamış monomer, başlatıcı ve çözücü) yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Oluşan mikroküreler 60/40 (v/v) etanol/su çözeltisiyle 24 saat boyunca muamele edilerek belleklerden D-glukuronik asit uzaklaştırılmıştır. Su-etanol karışımıyla yıkanan mikroküreler 70°C'de etüvde 48 saat boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Aynı yöntemle baskılanmamış mikroküreler MAH-Cu(II) ve EDMA kullanılarak hazırlanmıştır.

2.2.4. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Mikroküreler (MIP) Tutturulmuş Akrilamit Temelli Kriyojellerin Hazırlanması

D-Glukuronik asit baskılanmış polimer tutturulmuş akrilamit temelli süper makro gözenekli kriyojeller serbest radikal karyokopolimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. 6 mmol akrilamit monomeri 10 ml deiyonize suda çözülerek ilk aşamada monomer çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiliye 1 mmol N, N'-Metilen bis akrilamit eklenerek monomer - çapraz bağlayıcı karışımı oluşturulmuştur. Hazırlanan karışıma 0.7 g. D-glukuronik asit baskılanmış polimerlerden eklenerek 10 dakika süreyle karıştırılıp, 5 dakika ultrasonik banyoda muamele edilmiştir. Hazırlanan karışım 2-3 dakika -4°C'de tutulmuştur. Polimerizasyonun başlaması için gerekli olan 0.5 mmol amonyum per sülfat ve 25 µL N, N, N', N'- Tetrametiletilediamin eklenerek, alt ucu bek alevinde kapatılmış olan 5 mL'lik 0.8 çapındaki plastik enjektöre doldurularak, -18°C de 16 saat süreyle dondurulmuştur. Bu sürenin sonunda oluşan polimer ağı arasındaki buz kristallerinin çözülmesi suretiyle kriyojel matrisi oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında 4 saat bekletilmesi sonucunda birbirine bağlantılı makro gözeneklerden ve bu gözeneklere MIP tutturulmuş akrilamit kriyojeli oluşmuştur. Sentezlenen kriyojel, deiyonize suyla 4 kez yıkanarak, içerisindeki reaksiyona girmemiş safsızlıklardan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kullanılıncaya kadar % 0.02'lik sodyum azid çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

2.2.5. Balık Gözünden Hyaluronik Asit (HA) İzolasyonu

Biyolojik örneklerden hyaluronik asit (HA) saflaştırılması işlemi çöktürme, santrifüjleme gibi birbirini takip eden bir seri basamaklı işlemlerden oluşur (W. Huang ve ark. 2008; M. R. Magalhães ve ark. 2008). HA'nın balık gözü örneklerinden izolasyonunda, balık gözlerinden çekilerek toplanan 8 ml'lik göz sıvısı % 2'lik NaCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzülerek süzüntü %1'lik heksadesiltrimetilamonyum bromür çözeltisiyle etkileştirilmiştir. Elde edilen çökelek santrifüjle ayrılarak 1.0 M CaCl₂ çözeltisi eklenerek çökelekte oluşan hyaluronik asit- heksadesilamonyum bromür

kompleksi kırılmıştır. Süspansiyona %25'lik etanol-su çözeltisi eklenerek ortamda bulunan diğer nükleik asitler çöktürülerek santrifüjle ayrılmıştır. Daha sonra toplam hacmin %10'u kadar kloform kullanılarak 4 kez çözücü ekstraksiyonu yapılmıştır. Ardından %75'lik etanol-su ve %75'lik aseton-su çözeltileri eklenerek ortamdaki HA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. Elde edilen çökelek kullanılıncaya kadar -18°C'de saklanmıştır. Yapılan tüm işlemler G. Lago ve ark. (Lago, G. ve ark. 2005) yaptığı çalışmalarındakine benzer prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. *Streptococcus equi* Suşundan Hyaluronik Asit Üretimi

2.2.6.1. Mikroorganizma

Streptococcus equi (RSSKno: 679, Kaynak: Liverpool) Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

2.2.6.2. İnokulumun Hazırlanışı, Fermantasyon Ortamı ve Fermantasyon

M17 Broth (polipepton, fitonpepton, maya özütü, nütrient broth, askorbik asit ve sodyum gliserofosfat içeren) içine litreye 5g olacak şekilde glikoz ilave edilip inokulum ortamı hazırlanmış ve deney tüplerinde mikroorganizma ekimi gerçekleştirilerek 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Fermantasyon ortamı 100 mL besiyeri için 2 g glikoz, 1 g maya özütü, 0.25 g Na₂HPO₄.12H₂O, 0.05 g MgSO₄.7H₂O içerir. Ardından 250 ml'lik erlenlere fermantasyon ortamını oluşturan besiyeri konulmuş ve inokulumlardan 2'şer mL aktarılmıştır. 20 saat 37 °C'de çalkalamalı etüvde 250 rpm'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

2.2.6.3. Fermantasyon Ortamından Önsaflaştırma İşlemi

Fermantasyon ortamından önsaflaştırma işlemi için, % 10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS) hazırlanmış ve kültürün her 100 mL'sine 0,1 mL SDS çözeltisi eklenerek 15 dakika muamele edilmiştir. %10'luk Heksadesiltrimetilamonyum bromür hazırlanmış ve kültüre 100'er µl olacak şekilde titrasyon işlemiyle eklenmiştir. Dipte beyaz bir tortu oluşana kadar titrasyon işlemine devam edilmiştir. 1 saat oda sıcaklığındaki muameleden sonra çökelti santrifüjle toplanmıştır. Daha sonra, 2M CaCl₂ hazırlanmış ve kültürün 1/20'si kadar ortama eklenerek 4 saat 4°C'de muamele edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant toplanmıştır.

2.2.7. D-Glukuronik Asit Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu

2.2.7.1. Şişme Testi

D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerinin su tutma oranı, deiyonize su kullanılarak volumetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu işlemde 100 mg kuru polimer mezüre koyulup en üst noktası tüpe işaretlenmiştir. Daha sonra tüp deiyonize su ile doldurularak kürelerin oda sıcaklığında şişmesi her 30 dakikada bir mikrokürelerin yüksekliğinin işaretlenmesi ile belirlenmiştir. Tüpteki şişmiş kürelerin yüksekliği eşitlik 2.1'e göre şişme oranının hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(h_{\text{şişmiş}} - h_{\text{kuru}}) / h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (2.1.)$$

$h_{\text{şişmiş}}$: şişen küreciklerin yüksekliği, h_{kuru} : kuru küreciklerin yüksekliği

2.2.7.2. FTIR Analizi

D-glukuronik Asit baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Model 2000) kullanılarak elde edilmiştir. Kuru mikroküreler KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

2.2.7.3. Elemental Analiz

D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerin elemental analiz sonuçlarının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. 1 mg monolitik polimer elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alimünyum hücresine yerleştirilerek $\pm 0,0001$ g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik örnek cihaza koyularak yakma işlemi sonucunda örneğin karbon, hidrojen, oksijen ve azot analizi yapılmıştır.

2.2.8. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin Karakterizasyonu

2.2.8.1. Şişme Testi

MIP tutturulmuş akrilamit kriyojellerinin su tutma oranı şişme testiyle belirlenmiştir. Bu işlem için kriyojel alınarak etüvde 60°C de 3 saat süreyle kurutulmuştur. Kuru kriyojel tartılarak içerisinde 10 ml deiyonize su bulunan behere atılmış ve 1 gün süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda şişmiş kriyojel tartılarak şişme oranı bulunmuştur.

2.2.8.2. FTIR Analizi

MIP tutturulmuş akrilamit kriyojellerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Model 2000) kullanılarak elde edilmiştir. FTIR spektrumları cihazın ATR modunda çalışılarak alınmıştır. Kuru haldeki kriyojel cihazın kristali üzerine yerleştirilmiştir ve üzerine infrared ışığı gönderilerek FTIR spektrumu elde edilmiştir.

2.2.8 3. BET Yöntemiyle Yüzey Alanı Analizi

1 gram MIP tutturulmuş akrilamit kriyojelleri tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan cihaza yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırılmış ve yapının

fiksasyonu yapılmıştır. 50 noktaya göre analiz yapılarak kriyojelin 1 gramının yüzey alanı bulunmuştur.

2.2.8.4. Yüzey Morfolojisi Analizi

Polimerik MIP tutturulmuş akrilamit kriyojelleri yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler analiz edilmeden önce kurutulmuştur. Kuru kriyojeller örnek haznesine yerleştirilmiş ve altın ile kaplandıktan sonra SEM ile görüntüleri alınmıştır.

2.2.9. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

Sulu çözeltilerden, HA adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için başlangıç derişimin etkisi, pH etkisi ve akış hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıç derişimi etkisini incelemek üzere bir seri HA standart çözeltileri pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanarak UV spektrofotometrede okutulmuş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Daha sonra 1,000 ($\pm 0,002$) g lık MIP tutturulmuş kriyojellerden standart çözeltiler geçirilerek tekrar UV spektrofotometrede okutulmuş ve HA derişimi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (232 nm). Cihazın cevabı bilinen derişimdeki HA standart çözeltileri ile periyodik olarak kontrol edilmiştir. Birim kütle başına, MIP tutturulmuş kriyojellere adsorplanan HA miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik 2.2. kullanılmıştır.

$$Q = [(C_0 - C) \times V] / m \quad (2.2.)$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer kriyojel başına adsorplanan HA miktarını (mgg^{-1}), C_0 ve C sulu çözeltideki HA'nın başlangıç ve son derişim değerlerini (mgL^{-1}), V sulu çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan kriyojellerin kütlesini (g) vermektedir.

2.2.10. MIP Tutturulmuş Kriyojellerden HA Desorpsiyonu

Adsorplanan HA, 1 M NaOH çözeltisinin kullanılması ile oda sıcaklığında kriyojellerden geçirilerek desorbe edilmiştir. Sulu fazda son kalan HA derişimi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Desorpsiyon oranı eşitlik 2.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan HA}}{\text{Adsorplanan HA}} \times 100 \quad (2.3.)$$

MIP tutturulmuş akrilamit kriyojellerinin tekrar kullanılabilirliği, HA adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin 10 kez aynı polimerik materyalin kullanılması ile belirlenmiştir.

2.2.11. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonuna pH Etkisi

MIP tutturulmuş akrilamit kriyojellerinin hyaluronik asit adsorpsiyonuna pH etkisini incelemek için pH 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 da adsorpsiyon çalışmaları spektrofotometrik yöntemle izlenerek yapılmıştır. Her bir pH ta gram polimer başına adsorbe olan HA miktarları belirlenerek, HA adsorpsiyonu için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

2.2.12. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi

MIP tutturulmuş akrilamit kriyojellerinin HA adsorpsiyonuna akış hızının etkisi FPLC’de çalışılarak incelenmiştir. Hazırlanan MIP tutturulmuş kriyojel FPLC de kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış ve 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ve 0.7 mldk⁻¹ akış hızlarında çalışılarak HA’nın ayırımı için optimum akış hızı belirlenmiştir.

2.2.13. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin HA Adsorpsiyonundaki Seçiciliği

Gözeneklerine glukuronik asit baskılanmış polimerler tutturulmuş kriyojellerin hyaluronik asit adsorpsiyonundaki seçiciliği N-asetil glikoz amin ve glukuronik asit çözeltilerinin kriyojel kolonlardan geçirilmesiyle yapılmıştır. Seçicilik çalışmasında N-asetil glikoz aminin seçilmesinin nedeni hyaluronik asidin glukuronik asit dışındaki diğer bir segmenti olması ve yapısının glukuronik aside çok yakın olmasıdır. Sırasıyla kriyojel kolonlardan aynı derişimlerde hazırlanan D-glukuronik asit, HA ve N-Asetil glikoz amin geçirilerek elde edilen verilerden her bir molekül için maksimum adsorpsiyon kapasitesi, Q_{max} , hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

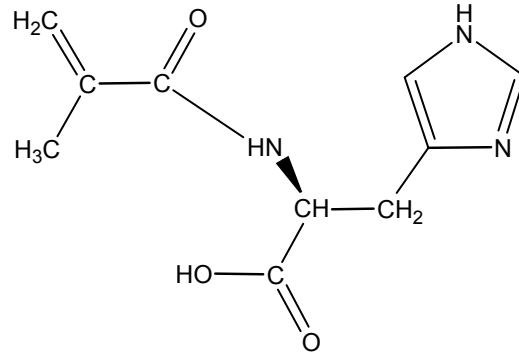
3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.1.1. Şişme Testi

Baskılanmamış ve baskılanmış mikrokürelerin denge şişme değerleri sırası ile % 30 ve % 42'dir. D-glukoronik asit baskılanmamış mikroküreler ile D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerin su tutma oranları kıyaslandığında baskılanmış mikrokürelerin su tutma oranlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Polimer yapısında baskılama ile boşlukların oluşumu sayesinde polimer zincirinde daha fazla hidrodinamik hacim nedeni ile polimer matriksi daha fazla su tutmaktadır.

3.1.2. MAH monomerinin karakterizasyonu

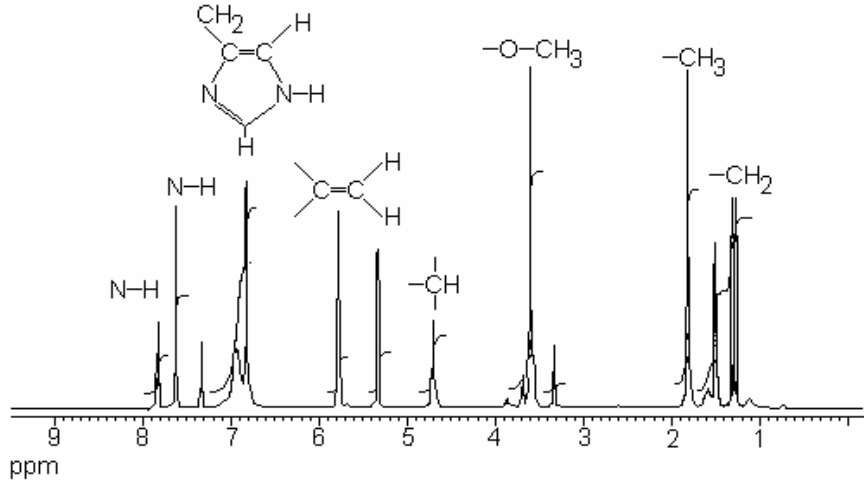
Şekil 3.1'de açık yapısı verilen MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde ¹H-NMR kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü

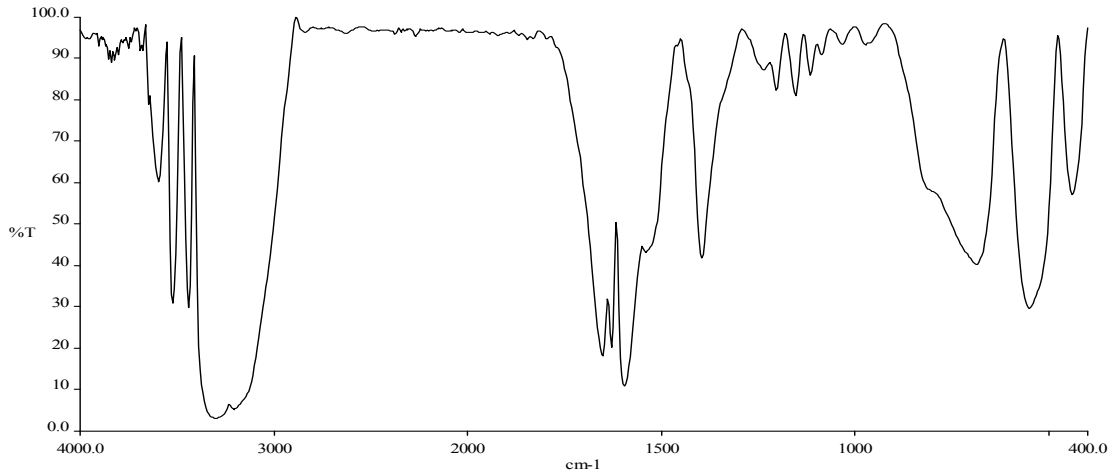
Yukarıda açık yapısı görülen MAH monomerinin Şekil 3.2'de verilen ¹H-NMR spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: ¹H-NMR (CDCl₃): 1.99 (t; 3H, J=7.08 Hz,

CH₃), 1.42 (m; 2H, CH₂), 3.56 (t; 3H, -OCH₃), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (d; 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (d; 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2. MAH monomerinin ¹H-NMR spektrumu

MAH monomeri FTIR ile de karakterize edilmiştir. Şekil 3.3' de FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1653 ve 1629 cm⁻¹'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1529 cm⁻¹'de görülmüştür.



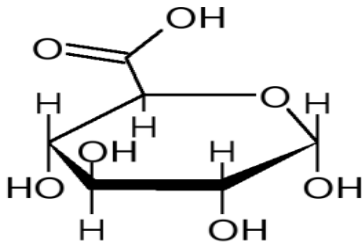
Şekil 3.3. MAH monomerinin FT-IR spektrumu

3.1.3. MAH-Cu(II) monomerinin karakterizasyonu

MAH-Cu(II) metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FT-IR analizlerinin karakteristik pikleri şöyledir: Bozunma: ≥ 350 °C; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3400$ ve 3250 (-CONH-); 3095 (vinyl C-H gerilme); 1680 (C=O karbonil gerilme); 1550 ve 1420 (C=C karboksilat gerilme, sim. ve antisim.); 1520 (C=N, konjuge siklik sistem); 1250 (C-O gerilme); 500 (Cu-N gerilme, zayıf bant). Elementel analiz sonuçlarına bakıldığında analitik olarak hesaplanan $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_3\text{Cu}$ yüzdeleri: C, 37.20; H, 5.31; N, 13.02; Cu, 19.69 şeklinde olup bulunan sonuçlar: C, 37.04; H, 5.43; N, 12.86; Cu, 19.91 şeklindedir.

3.1.4. D-Glukuronik asit bellekli polimerlerin karakterizasyonu

HA, yüzlerce D-glukuronik asit (Şekil 3.4.) ve asetilglukozaminden oluşan bir yapıdır. Glukoz yapısındaki glukuronik asit molekülü hidroksillerinden metal-şelat etkileşimine girmektedir (Denizli, A. ve ark. 2003).



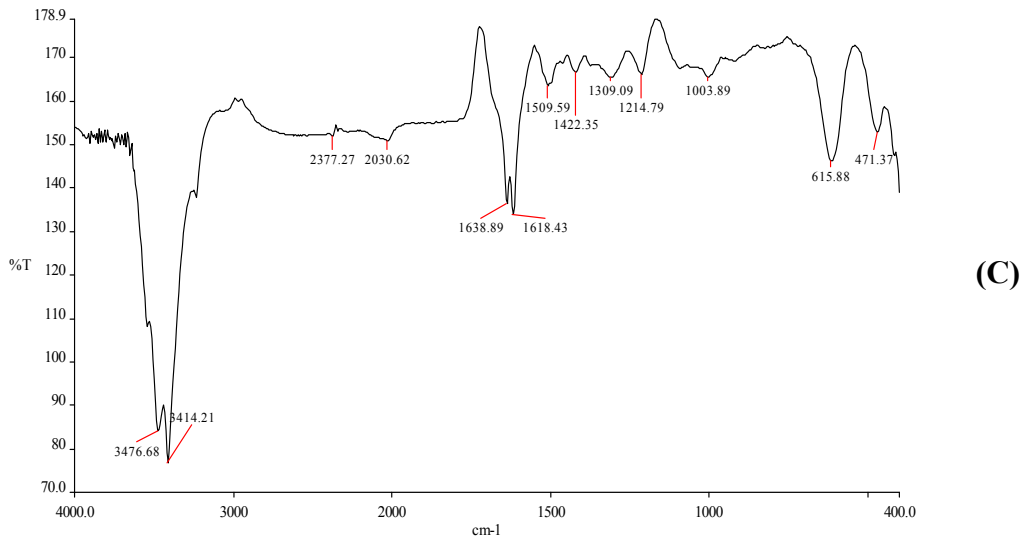
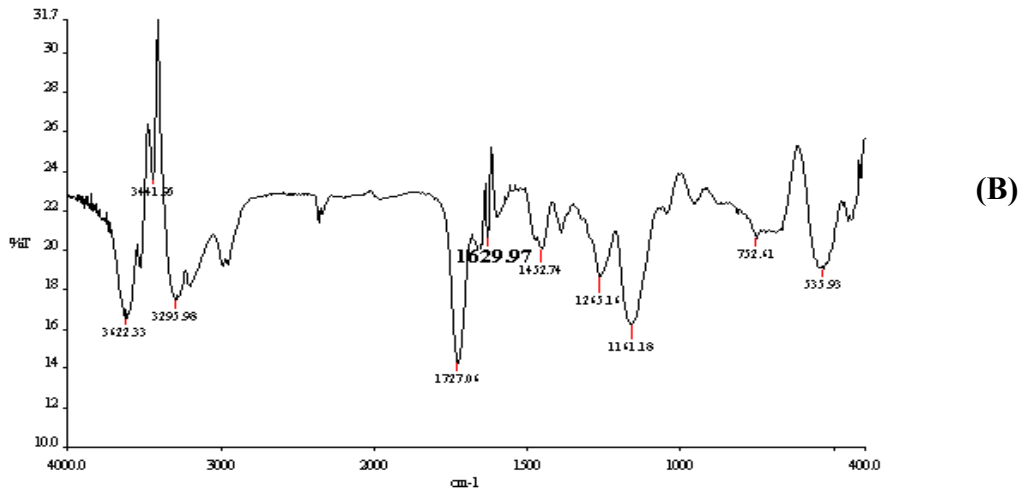
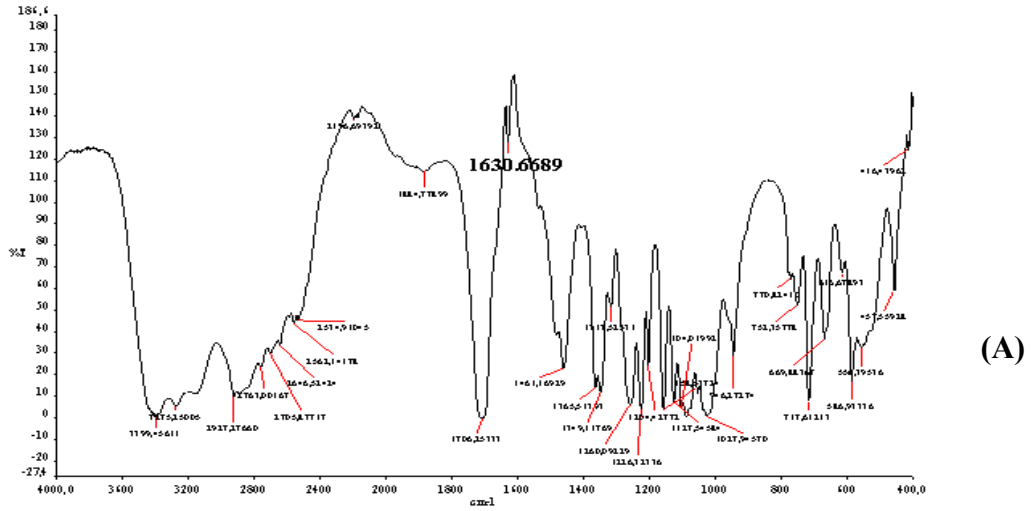
Şekil 3.4. D-glukuronik asit monomeri

Bu bilgi ışığında biyo-uyumluluğa sahip polimerik mikrokürelerin yüzeyinde D-glukuronik asit bağlanma bölgesi ve yuva (D-glukuronik asit bellekli) hazırlanması için ilk aşamada D-glukuronik asit, Cu(II) metal iyonları içeren histidin monomeri (MAH) ile muamale edilmiş ve D-glukuronik asit MAH-Cu(II) monomerine bağlanmıştır.

İkinci aşamada, D-glukuronik asit hedef bellekler eşliğinde metal-şelat monomerleri yüksek oranda çapraz bağlayıcı, etilen dimetakrilat (EDMA),

eşliğinde ısı yoluyla polimerleştirilerek baskılanmış ve D-glukuronik asit bellekli MIP biyoadsorbentler elde edilmiştir. D-glukuronik asit belleklerin oluşması için ise elde edilen MIP biyosorbentler metanolik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisiyle yıkanarak D-glukuronik asit tanımlayan bölgeler boşaltılmıştır.

D-glukuronik asidin (Şekil 3.5-A.), D-glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu (Şekil 3.5-B.) ve D-glukuronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR Spektrumu (Şekil 3.5-C.) karşılaştırıldığında ilk spektrumda gözlenen 1727 cm^{-1} 'deki bandın diğer spektrumda kaybolduğu gözlenmiştir. 1727 cm^{-1} 'deki bu bant D-glukuronik asit yapısında bulunan karboksil grubundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca ilk spektrumda (D-glukuronik asit bellek öncesi) Cu-O titreşimine ait bant $\sim 536\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmekle birlikte, bellek oluşumu sonrası yani D-glukuronik asit çıkarıldıktan sonra bu titreşime ait bant kaybolmuştur. Bu sonuçlar D-glukuronik asit belleklerin KOH ile yıkama sonrasında uzaklaştığını ve D-glukuronik asit yuvalarının oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 3.5. A) D-glukuronik asidin FTIR spektrumu
 B) D -glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu
 C) D-glukuronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR Spektrumu

3.1.5. D-Glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki ve D-Glukuronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin elemental analiz sonuçları

Elemental analiz sonuçlarına bakıldığında analitik olarak hesaplanan D-glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki MIP'lerin C, H, ve N yüzdeleri: C, 24,00; H, 6,536; N, 0,031 şeklinde olup D-glukuronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin C, H ve N yüzdeleri: C, 41,46; H, 6,680; N, 0,059 şeklindedir. D-glukuronik asit molekül belleklerin çıkarılması sonrasında karbon, hidrojen ve azot yüzdelerindeki artış beklenen bir durumdur ve bellek oluşumunu desteklemektedir.

3.2. MIP Tutturulmuş Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.2.1. Şişme Testi

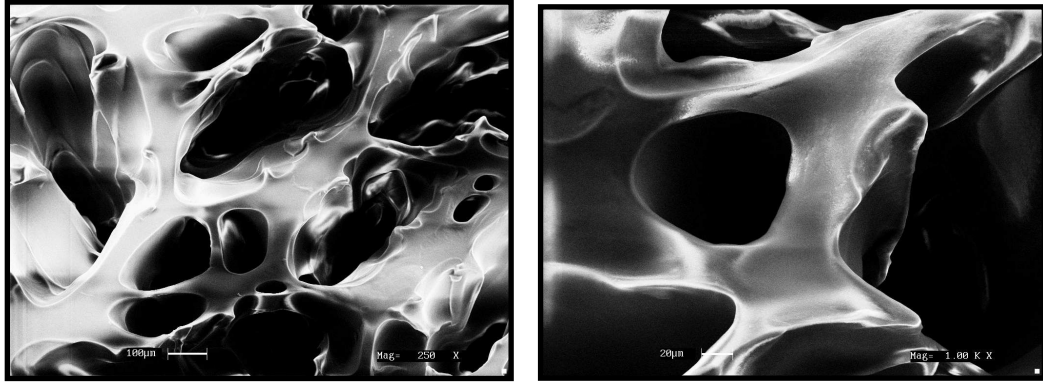
Gözeneklerinde MIP içermeyen akrilamit kriyojellerinin ve gözeneklerine MIP tutturulmuş akrilamit temelli kriyojellerin denge şişme değerleri sırasıyla %156 ve %201 olarak bulunmuştur. D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerin su tutma oranları göz önüne alındığında baskılanmış mikroküreler içeren kriyojellerin su tutma oranının artması beklenen bir durumdur. Polimer yapısında baskılama ile boşlukların oluşumu sayesinde polimer zincirinde daha fazla hidrodinamik hacim nedeni ile polimer matrisi daha fazla su tutmaktadır.

3.2.2. Yüzey Alanı Ölçümü

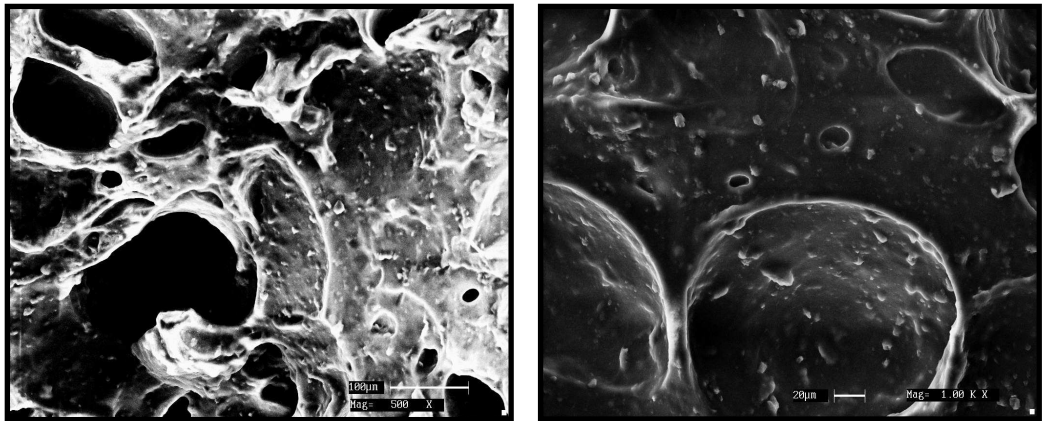
MIP içermeyen kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile $16.5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur. MIP içeren akrilamit kriyojelinin spesifik yüzey alanı ise yine aynı yöntemle belirlenip, $18.4 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

3.2.3. Yüzey Morfolojisi

Gözeneklerinde MIP mikroküreleri içermeyen akrilamit kriyojellerinin ve gözeneklerine MIP mikroküreleri tutturulmuş akrilamit temelli kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de görüldüğü gibi her iki kriyojel türünde de gözenek dağılımı ve yapıdaki gözenek örgüsü homojendir. MIP partikülleri akrilamit kriyojel gözenekleri içerisine hidrojen bağlarla bağlanmış ve HA ayrımı için gözenekli, yüzey alanı geniş, katı bir destek maddesi oluşturmuştur.



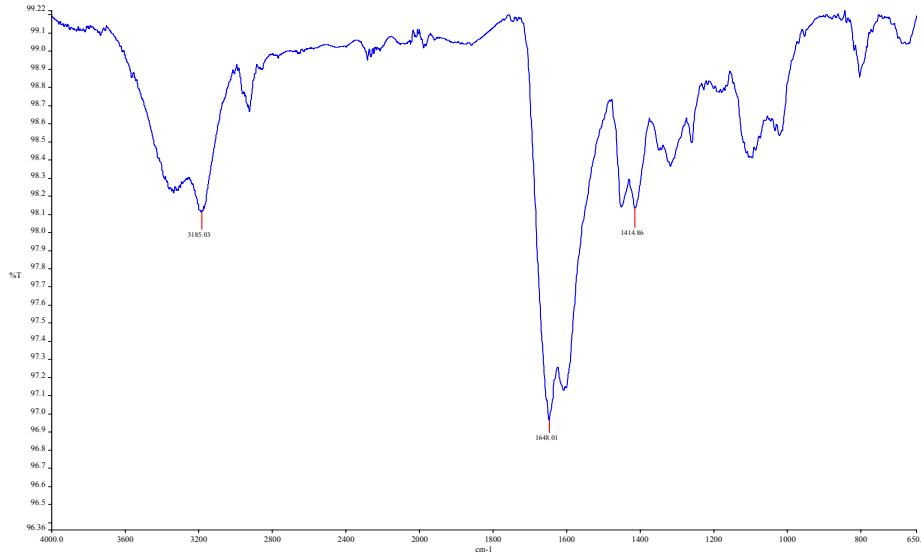
Şekil 3.6. MIP partikülleri içermeyen akrilamit kriyojeli SEM görüntüleri.



Şekil 3.7. Gözeneklerine MIP partikülleri tutturulmuş akrilamit temelli kriyojel SEM görüntüleri.

3.2.4. FTIR Analizleri

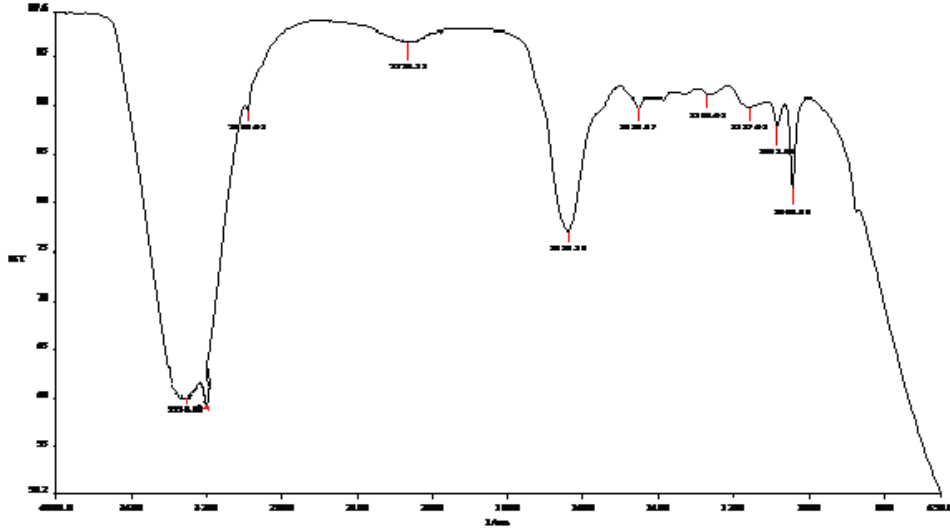
Gözeneklerine MIP tutturulmuş ve MIP tutturulmamış akrilamid temelli kriyojellerin FTIR spektrumları alınarak, kriyojelin gözeneklerine MIP partiküllerinin bağlanıp bağlanmadığı saptanmıştır. Şekil 3.8 de gözeneklerinde MIP içermeyen akrilamid kriyojelinin FTIR spektrumu görülmektedir.



Şekil 3.8. MIP partikülleri içermeyen akrilamid kriyojeli FTIR spektrumu

Akrilamid kriyojelinin karakteristik pikleri şu şekildedir: 1648 cm^{-1} (karbonil bandı), 1600 cm^{-1} (N-H bandı eğilmesi; akrilamidteki karakteristik – CONH₂ grubuna ait pik), 3185 cm^{-1} (N-H gerilmesi), 1414 cm^{-1} (C-H eğilme bandı).

Şekil 3.9' da gözeneklerine MIP tutturulmuş akrilamid temelli kriyojelin FTIR spektrumu görülmektedir.



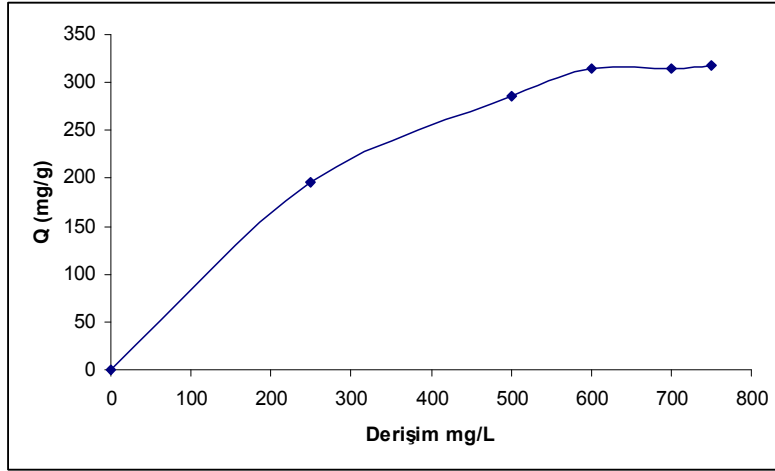
Şekil 3.9. Gözeneklerine MIP tutturulmuş akrilamit temelli kriyojel FTIR spektrumu.

Bu yapı da akrilamit temelli olduğu için akrilamit kriyojelin karakteristik pikleri olan 1638 cm^{-1} (karbonil bandı), 1600 cm^{-1} (N-H bandı eğilmesi; akrilamitteki karakteristik $-\text{CONH}_2$ grubuna ait pik), 3185 cm^{-1} (N-H gerilmesi), 1414 cm^{-1} (C-H eğilme bandı) pikler tekrar görülmekte, bu piklere olarak D-glukuronik asit baskılanmış polimerde kalıp molekülün uzaklaşmasından sonra kalan boşluklu yapının karakteristik pikleri görülmektedir.

3.3. MIP İçeren Kriyojelerde Adsorpsiyon Çalışmaları

3.3.1. HA Başlangıç Derişiminin Etkisi

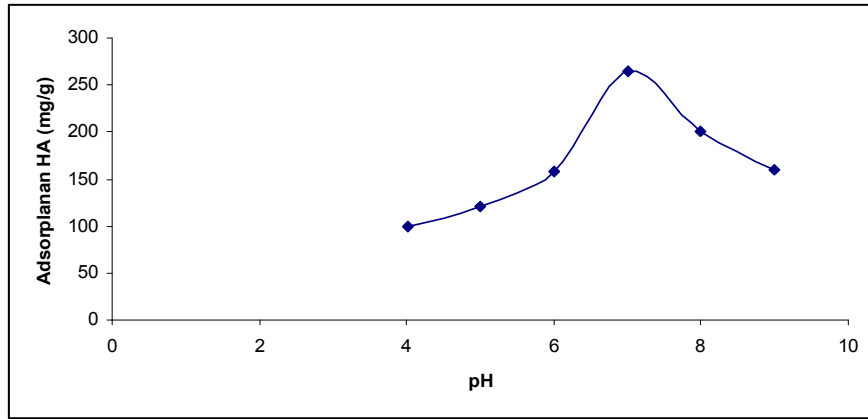
Şekil 3.10'da kriyojel gözeneklerinde bulunan D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelere adsorplanan D-glukuronik asit molekülünün HA başlangıç derişimine etkisi verilmiştir. Polimerin birim kütlesi başına adsorplanan D-glukuronik asit miktarı, HA başlangıç derişiminin artması ile artmıştır. D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelere aktif bağlanma boşluklarının doygunluğa ulaşması, HA derişiminin 650 mgL^{-1} değerine ulaşmasına kadar devam etmektedir. Baskılı mikrokürelere maksimum adsorpsiyon kapasitesi 318 mgg^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10. Kriyojel gözeneklerine tutturulan polimerik mikrokürelere adsorplanan D-glukuronik asit miktarının HA başlangıç derişimi ile değişimi.

3.3.2. pH Etkisi

1000 ppm HA'nın kriyojel gözeneklerindeki MIP lerde adsorpsiyonu farklı pH larda incelenerek, HA'nın adsorplandığı optimum pH değeri olarak pH=7 değeri belirlenmiştir (Şekil 3.11). Bu pHda adsorplanan HA miktarı 265 mgg^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil. 3.11. HA adsorpsiyonuna pH etkisi.

3.3.3. Akış Hızı Etkisi

HA adsorpsiyonuna ilişkin akış hızı çalışmaları, gözeneklerine MIP tutturulmuş kriyojelin FPLC cihazında kolon olarak kullanılması ve hazırlanan 1000 ppm HA'nın farklı akış hızlarında geçirilmesiyle elde edilen pik alanlarının

karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. FPLC cihazında 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 ve 0.7 mldk⁻¹ akış hızlarında çalışılmış ve maksimum adsorpsiyonun 0.5 mldk⁻¹ da olduğu saptanmıştır.

3.3.4. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi eşitlik 3.1 ile aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$Q = \frac{Q_{\max} b C_{\text{eq}}}{1 + b C_{\text{eq}}} \quad (3.1.)$$

Q = Adsorbana adsorplanmış HA derişimi (mmolg⁻¹)

C_{eq} = Çözeltideki HA denge derişimi (mgL⁻¹)

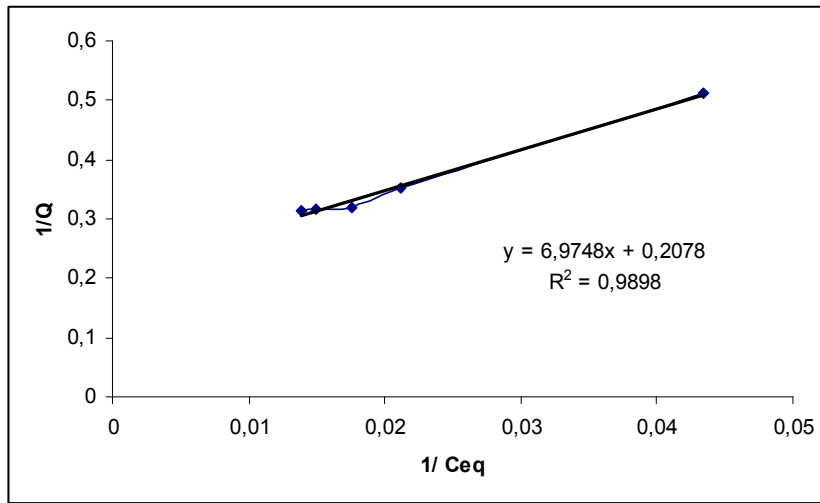
b = Langmuir sabiti (Lmg⁻¹)

Q_{\max} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmolg⁻¹)

Bu denklem eşitlik 3.2. ile aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max}b)][1/C_{\text{eq}}] + [1/Q_{\max}] \quad (3.2.)$$

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_{\text{eq}}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/Q_{\max}b$ 'yi verir Şekil 3.12'de HA molekülünün adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.12. HA molekülü için Langmuir Adsorpsiyon Modeli

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan kesikli deneylerle belirlenmiştir. Deneysel veriler sonucunda, HA'nın adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{\max}) elde edilmiştir. Kriyojel gözeneklerindeki D-glukoronik asit baskılanmış mikroküreler için, korelasyon katsayısı (R^2) 0.9898 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi $480,7 \text{ mgg}^{-1}$ ve Langmuir sabiti ise $2,98 \times 10^{-2} \text{ mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir (Sarıkaya 1993). Aşağıda Freundlich denklemi verilen eşitlikle gösterilmektedir.

$$\ln Q = \ln K_f + n \cdot \ln C_{eq} \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte;

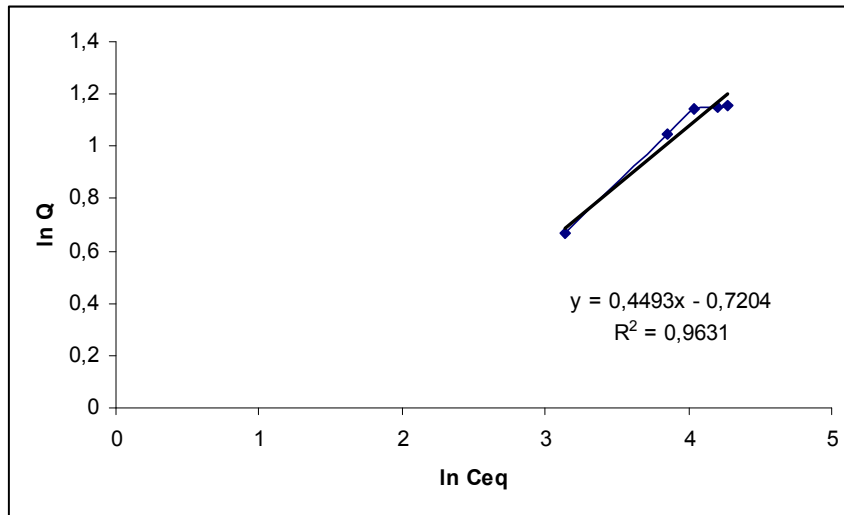
Q= Adsorbana adsorplanmış HA derişimi (mgg^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki HA denge derişimi (mgL^{-1})

n= Freundlich sabiti

K_f =Freundlich sabiti

Ln Q'ya karşı Ln C_{eq} grafiğe geçirildiğinde y eksenini kestiği noktadan K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 3.13'de kriyojeldeki D-glukuronik asit baskılı polimerlere HA adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.13. HA molekülü için Freundlich Adsorpsiyon Modeli

HA adsorpsiyonu için elde edilen veriler sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulanmıştır. Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te görüldüğü gibi HA adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9898), Freundlich için hesaplanan değerden (0,9631) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.

Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerin HA adsorpsiyonuna ilişkin elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş D-glukuronik asit baskılanmış mikrokürelerin HA adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin karşılaştırılması.

	Deneysel	Langmuir			Freundlich		
	Q (m $g g^{-1}$)	Q _m (m $g g^{-1}$)	b(Lm g^{-1})	R ²	K _d (Lg ⁻¹)	n	R ²
Kriyojelde MIP	318	480,7	2,98x10 ⁻²	0,9898	1.1693	0,4493	0,9631

3.3.5. Kriyojel Gözeneklerine Tutturulmuş D- Glukuronik Asit Baskılı Polimerlerin HA Bağlama Etkinliğinin Ölçülmesi

Kriyojel gözeneklerindeki D-glukuronik asit baskılı polimer ve HA arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard yöntemi ile elde edilmiştir.

Bu yöntemde aşağıdaki 3.4 eşitliği kullanılmaktadır.

$$\frac{B}{[F]} = \frac{B_{maks}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad (3.4.)$$

Bu eşitlikte;

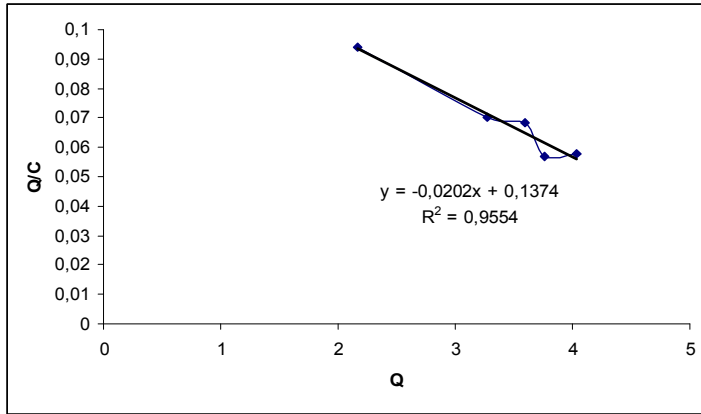
B : Polimere bağlanan D-glukuronik asit miktarını

[F] : Serbest HA derişimini

B_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini ifade etmektedir.

Çizilen grafikten K_a değeri 2018000 M^{-1} ve R^2 değeri 0,9554 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.14). Maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{\max} ise yine grafik üzerinde yapılan hesaplamalarla $4,03 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.14. HA bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği.

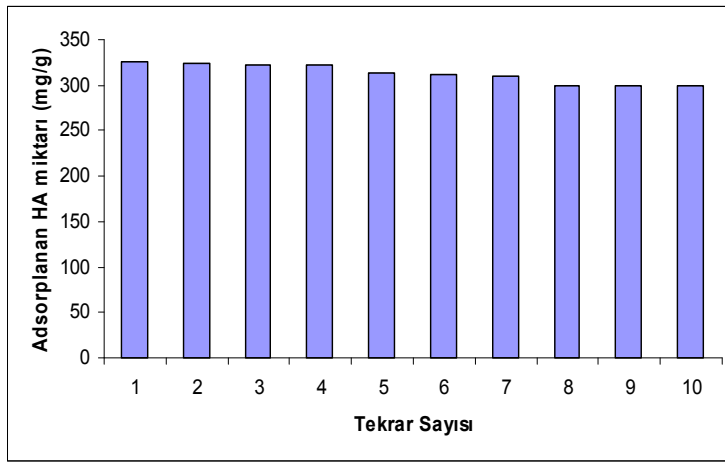
3.3.6. Kriyojel Gözeneklerine Tutturulmuş D-Glukuronik Asit Baskılı Polimerlerin Seçiciliği

MIP içeren kriyojel kolonlardan aynı derişimlerde hazırlanan D-glukuronik asit çözeltisi, HA çözeltisi ve N-asetil glikoz amin çözeltileri geçirilmesiyle elde edilen verilerden maksimum adsorpsiyon kapasiteleri (Q_{\max}) hesaplanarak Q_{\max} değerleri; D-glukuronik asit için 342,3; HA için 318 ; ve N-asetil glikoz amin için de 18.75 mg g^{-1} olarak bulunmuştur.

3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş MIP lere adsorpsiyonla bağlanan HA, 0,1 M NaCl çözeltisi kullanılarak desorbe edilmiştir. Desorpsiyon çalışmalarında 50 ml desorpsiyon reaktifi olan 0,1 M NaCl kriyojel kolondan periyodik olarak geçirilmiştir. Kolondan çıkan çözelti içerisine alınan HA, spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. 2 saat sonunda adsorplanan HA miktarının %40'ı, 10 saat sonunda ise % 97' si desorpsiyon ortamına alınmıştır.

Gözeneklerine MIP tutturulmuş kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla HA adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları 10 kez aynı kriyojel kolonda yapılmıştır ve kriyojel içerisindeki MIP partiküllerinin HA adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.15). Dolayısıyla sentezlenen bu materyallerin HA adsorpsiyonunda, yapısında, ve adsorpsiyon kapasitelerinde herhangi bir kayıp olmadan defalarca kullanılabilineceği gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş MIP lerin rejenerasyonu.

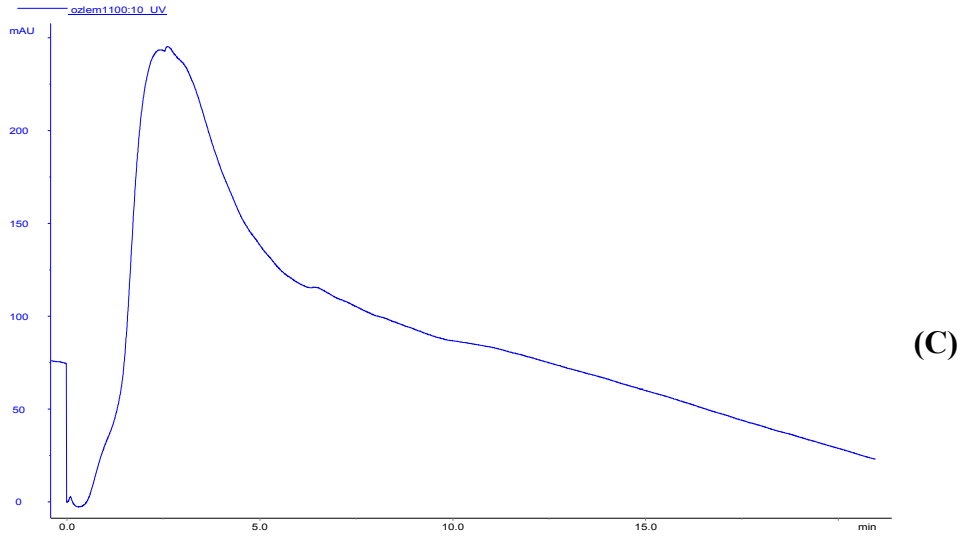
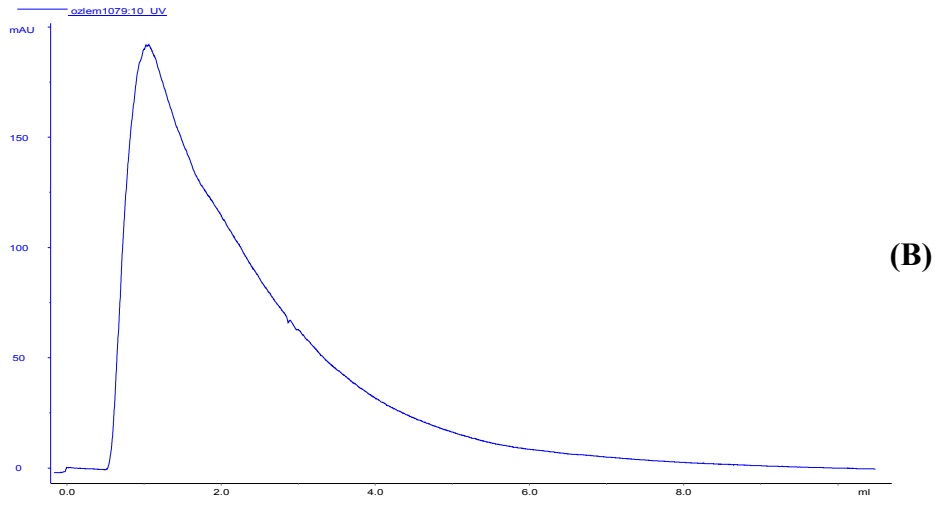
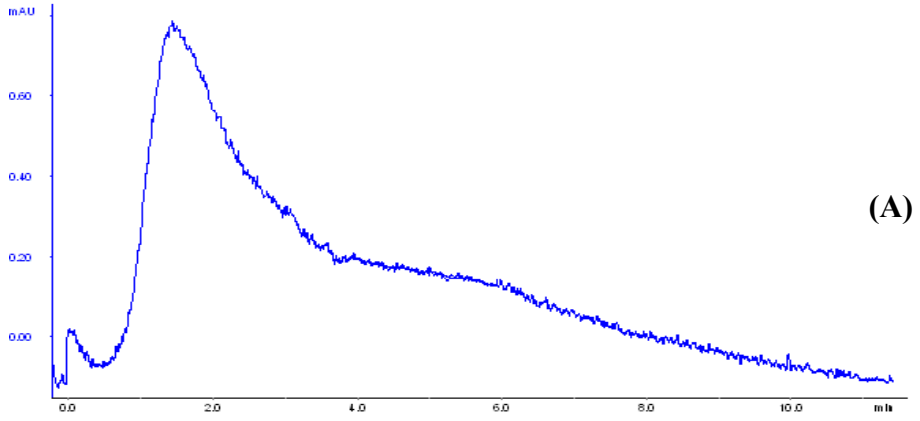
3.5. MIP içeren Kriyojellerle HA'nın Kromatografik Olarak Biyolojik

Örneklerden Ayırımı

HA'nın biyolojik örneklerden kromatografik ayırımı FPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. FPLC cihazında kolon dolgu maddesi olarak, gözeneklerine MIP tutturulmuş kriyojel kullanılmıştır. Ayırım işleminde HA, kolondan geçerken kolon içerisindeki D-glukuronik asit boşlukları bulunan kavitelere glukuronik asit ucundan bağlanmış ve desorpsiyon işlemiyle FPLC cihazının fraksiyon kaplarında toplanmıştır. Kromatografik ayırım işleminde hareketli faz olarak 0.1 M NaCl içeren fosfat tampon çözeltisi (pH=8) kullanılmıştır ve akış hızı 0.4 ml dak⁻¹ dir. Bu işlem için öncelikle 2000 ppm lik ticari HA'dan bir seri HA çözeltisi hazırlanmış ve kolondan geçirilerek HA'nın kromatogramı (Şekil 3.16-A.) elde edilmiştir. Daha sonraki basamakta balık gözü

örneklerinden kimyasal işlemlerle çözelti içerisine alınan HA, FPLC kolonundan aynı koşullarda geçirilerek balık gözünden izole edilen HA'nın kromatogramı elde edilmiştir (Şekil 3.16-B.). HA ile balık gözü örneğinden izole edilen HA'nın kromatogramları göz önüne alındığında piklerin alıkonma sürelerine bakılarak 2. dakikada gelen pikin HA piki olduğu saptanmış ve bu anda kolondan çıkan sıvı, fraksiyon kabında toplanarak 48 saat süreyle liyofilizasyonu yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemiyle kolondan çıkan ve HA içeren sıvının çözücüsü azot atmosferinde uçurularak katı partiküller elde edilmiştir. Elde edilen bu partiküllerin HA olup olmadığını anlamak için FTIR ve NMR ile analizleri yapılarak sonuçlar HA ile karşılaştırılmıştır.

FPLC cihazı ile HA'nın kromatografik ayırma işleminde kullanılan diğer bir biyolojik örnek de *Streptococcus equi* suşudur. Bakteri fermantasyonu sonucu ortamda oluşan HA, kimyasal işlemlerle çözelti ortamına alınarak, HA'nın FPLC kolonundan geçirildiği aynı koşullarda FPLC cihazına verilmiş ve ayırımı yapılmıştır (Şekil 3.16-C.). Elde edilen kromatogram, HA kromatogramıyla karşılaştırılarak, alıkonma süresinden HA'nın geldiği aralıktaki çözelti, cihazın fraksiyon kabında toplanarak 48 saat liyofilizasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.16. A) HA'nın FPLC kromatogramı.

B) Balık gözü örneğinden izole edilen HA'nın FPLC kromatogramı.

C) *Streptococcus equi* suşundan izole edilen HA'nın FPLC kromatogramı.

3.5.1. Balık Gözü ve *Streptococcus equi* Örneklerinden İzole Edilen HA'nın Karakterizasyonu

3.5.1.1. FTIR Analizi

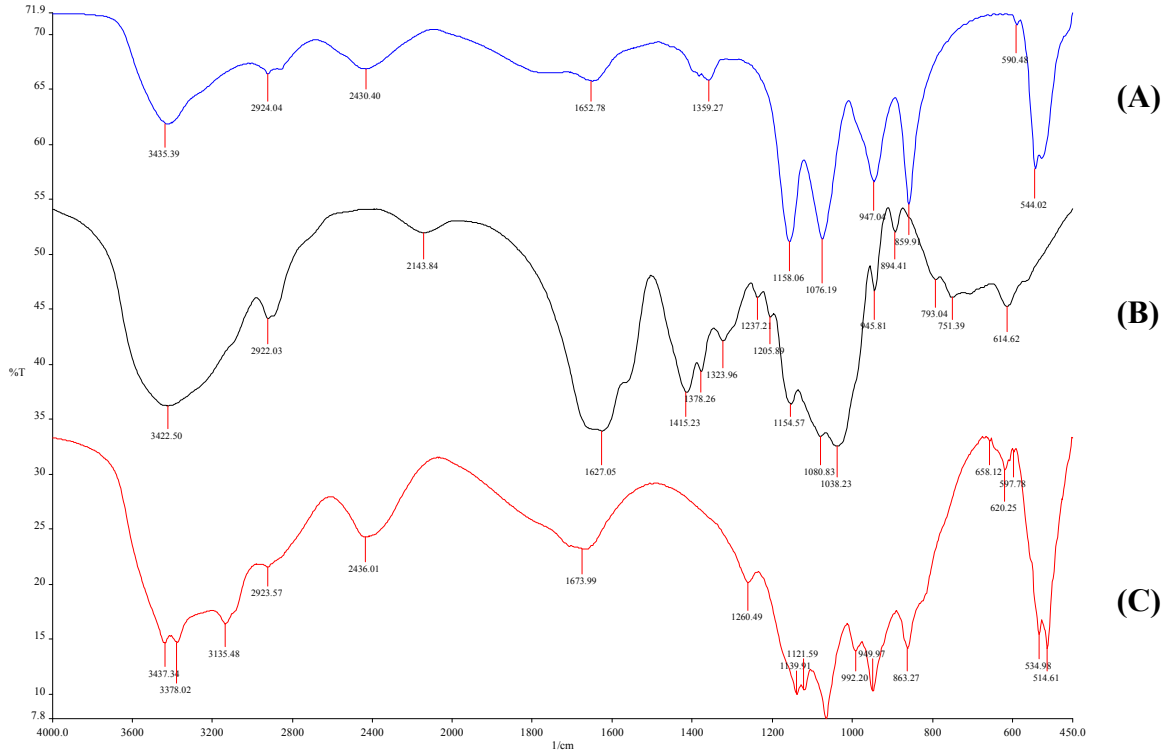
Ticari HAnın (Şekil 3.16-A) ve FPLC cihazında kolondan geçirilerek balık gözü örneklerinden elde edilen HA'nın (Şekil 3.16-B) ve *Streptococcus equi* tarafından üretilerek fermantasyon ortamından izole edilen HA'nın (Şekil 3.16-C) KBr tabletleri hazırlanarak FTIR spektrumları alınmıştır.

Ticari HAnın FTIR spektrumuna bakıldığında (Şekil 3.17-A); HA'nın karakteristik pikleri: Karbonil grubu (1622.03 cm^{-1}), C-H gerilmesi (2923.78 cm^{-1}), C-H eğilmesi (1324.45 cm^{-1}), C-O-C grubu (HA yapısının karakteristik O-köprüsündeki) (1153.66 cm^{-1}), N-H gerilmesi (3413.13 cm^{-1}) C-O eğilmesi (1036.02 cm^{-1}), C-C gerilmesi (2150.38 cm^{-1}) şeklinde sıralanabilir.

Şekil 3.17-B'de balık gözünden izole edilen HA'nın FTIR spektrumuna bakıldığında yine HA'nın karakteristik pikleri karbonil grubu (1652.78 cm^{-1}), C-H gerilmesi (2924.04 cm^{-1}), C-O-C grubu (HA yapısının karakteristik O-köprüsündeki) (1158.06 cm^{-1}), N-H gerilmesi (3435.39 cm^{-1}), C-O eğilmesi (1076.19 cm^{-1}), C-C gerilmesi (2430.40 cm^{-1}), C-H eğilmesi (1359.27 cm^{-1}) şeklinde sıralanabilir.

Şekil 3.17-C'deki *Streptococcus equi* suşundan izole edilen HA'nın FTIR spektrumuna bakıldığında ise; HA'nın karakteristik pikleri karbonil grubu (1673.99 cm^{-1}), C-O-C grubu (HA yapısının karakteristik O-köprüsündeki) (1260.49 cm^{-1}), N-H gerilmesi (3135.48 cm^{-1}), C-O eğilmesi (1139.91 cm^{-1}), C-C gerilmesi (2436.40) görülmektedir, C-H gerilmesi (2923.57 cm^{-1}) şeklinde sıralanabilir.

Görüldüğü gibi; FTIR spektrumları karşılaştırıldığında balık gözünden izole ve *Streptococcus equi*'den izole HA, ticari HA ile aynı karakteristik piklere sahiptir.



Şekil 3.17. A) Ticari HA'nın FTIR spektrumu.

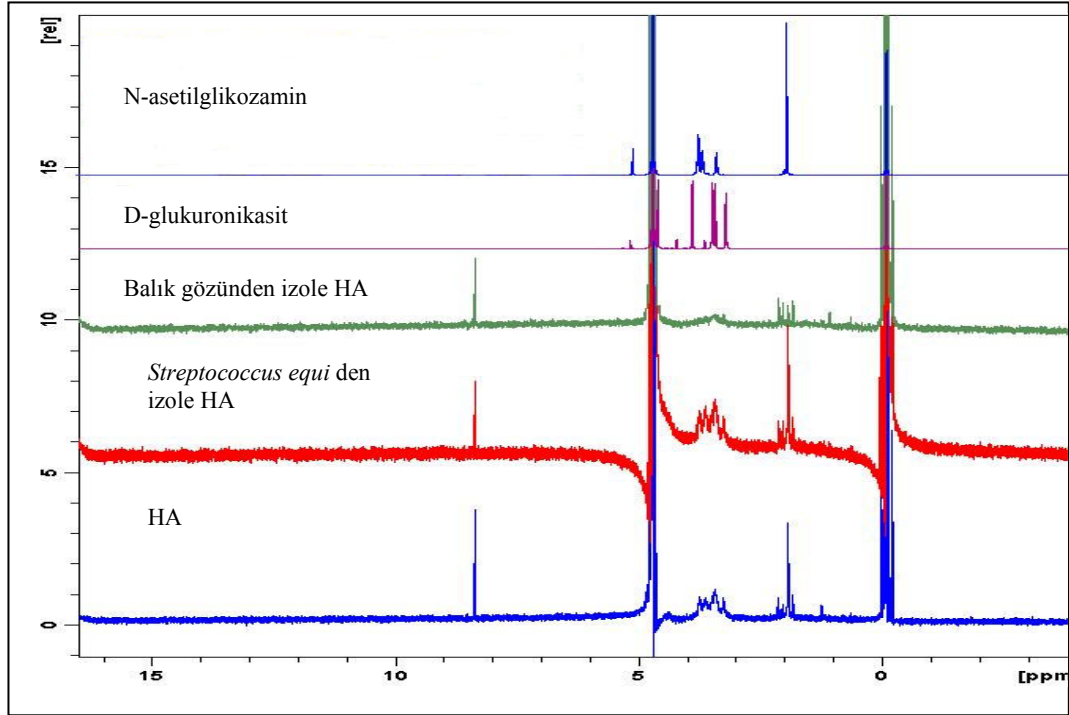
B) Balık gözü örneğinden izole edilen HA'nın FTIR spektrumu.

C) *Streptococcus equi* suşundan izole edilen HA'nın FTIR spektrumu.

3.5.1.2. NMR Analizi

Ticari HA, balık gözü ve *Streptococcus equi* suşu kullanılarak üretilen ve fermantasyon ortamından izole edilen HA'nın ve HA'yı oluşturan birimler olan D-glukuronik asidin ve N-asetilglukozaminin D₂O da çözülerek ¹H-NMR analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına (Şekil 3.18) göre ¹H-NMR spektrumunda HA'nın yapısını oluşturan D-glukuronik asit ve N-asetil glukozaminin karakteristik pikleri aynen HA'nın ¹H-NMR spektrumunda da görülmüştür. Buna göre; 1,75-2 ppm arasında görülen pikler HA'nın yapısındaki (Şekil 1.1.) N-asetil glukozamin kısmındaki CH₃'den, 3-4 ppm arasındaki pikler D-glukuronik asit ve N-asetil glukozamindeki şeker (glukoz) halkasında bulunan CH₂ ve CH'dan ve 8,4 ppm'de görülen pik ise çözücüden kaynaklanan piktir. Spektrumlarda balık gözünden elde edilen HA spektrumunun pik şiddetinin diğerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, balık gözünden elde edilen HA derişiminin diğer

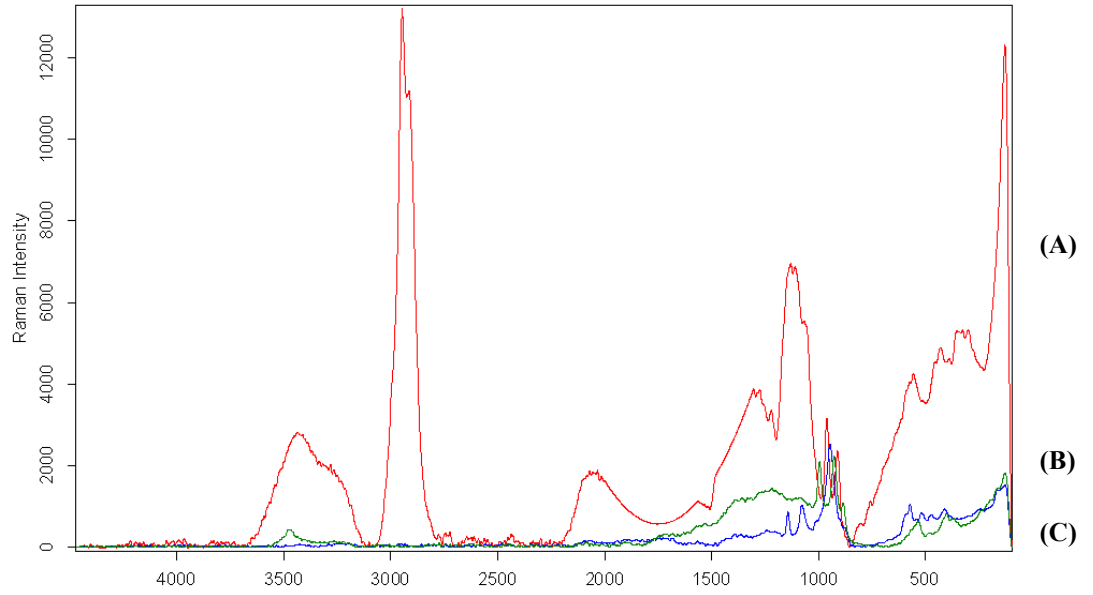
biyolojik örnek olan *Streptococcus equi* suşu kullanılarak üretilen ve izole edilen HA derişiminden daha az olmasıdır.



Şekil 3.18. Ticari HA, balık gözü ve *Streptococcus equi* tarafından üretilerek fermantasyon ortamından izole edilen HA, D-glukuronik asit ve N-asetilglukozaminin ¹H-NMR analiz sonuçları.

3.5.1.3. Raman Spektrumu

Ticari HA, balık gözü ve *Streptococcus equi* suşu kullanılarak üretilen ve fermantasyon ortamından izole edilen HA'nın Raman spektrumu alınarak diğer bir karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Şekil 3.19'daki Raman Spektrumundaki çakışık pikler değerlendirildiğinde HA yapısındaki karakteristik piklerin; 1200 cm⁻¹ (C-H bandı), 1400 cm⁻¹ (C-N bandı), 3400 cm⁻¹ (N-H bandı), 1000 cm⁻¹ (C=O bandı) olarak geldiği görülmektedir.



Şekil 3.19. A) Ticari HA'nın Raman Spektrumu.

B) *Streptococcus equi* tarafından üretilerek fermantasyon ortamından izole edilen HA'nın Raman Spektrumu.

C) Balık gözünden izole edilen HA'nın Raman Spektrumu.

Sonuç olarak; biyoyumluluğu, non-immunojenik özelliği ve kendiliğinden parçalanabilen özelliklerinden dolayı klinik, medikal ve kozmetik alanlarında oldukça geniş bir uygulama alanı bulunan HA, yapısındaki D-glukuronik asit ucundan kriyojel içerisine tutturulmuş, D-glukuronik asit boşlukları bulunan MIP'lerle balık gözü ve *Streptococcus equi* biyolojik örneklerinden izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. D-glukuronik asit boşlukları içeren MIP'lerin HA ya seçiciliğinin fazla olması ve tekrar tekrar kullanılabilir özellikleri ile kriyojellerin birbirine bağlantılı süper makro gözenekli, sağlam, elastik ve herhangi bir deformasyon olmadan tekrar tekrar kullanılabilir özellikte olan yapısı birleştirildiğinde ortaya çıkan kriyojel gözeneklerine MIP tutturulmuş yapı, HA ayırımı ve saflaştırılması için ucuz, kolay hazırlanabilir ve uzun ömürlü etkili bir malzemedir. Enzimle HA'yı kesmeden ve yapıyı parçalamadan HA'nın izolasyonu, ilk defa kriyojel sistemleriyle gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Babac, C. Yavuz, H., Galaev, Y. I., Pişkin, E., Denizli, A. (2006), *Reactive and Functional Polymers*, **66**, 1263 – 1271.
- Byrne, M. E., Park, K., Peppas, N. A. (2002), *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 149 –161
- Chapuis, F. Pichon, V. ve Hennion, M. C. (2004), *LC.GC Europe*, **17 (7)**, 408-417.
- Cormack, P. A. G. ve Elorza A. Z. (2004), *Journal Chromatography B*, **804**, 173-182.
- De Andrés Santos M. I., Velasco-Martín A., Hernández-Velasco E., Martín-Gil J., Martín-Gil F. J. (1994), *Thermochim Acta*, **242**, 153–160.
- Denizli, A., Garipcan, B., Karabakan, A., Say, R. Ve Emir, S., Patır, S. (2003), *Separation and Purification Technology*, **30**, 3-10.
- Diltemiz S. E. (2006) , *DNA 'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Dmitrienko, S.G., Irkha, V.V. ve Kuznetsova, A.Y. (2004), *J. Anal. Chem.*, **59**, 808-817.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu S.X. ve Wang, N. (2002), *Analyst*, **127**, 1427–1432.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekşık, N., Öktemer, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E. (2001), *Denel Organik Kimya*, A.Ü.F.F. Yayınları, Ankara.
- Galaev, Y. I., “Macroporous hydrogels, CRYOGELS New Materials for Biotechnology.” Department of Biotechnology, Lund University, AB. *Trends in Biotechnology*, (2003), **21**, 445-451.
- Haupt K. (2003), *Imprinted polymers - Tailor-made mimics of antibodies and receptors. Chem. Commun.* **2**, 171-178
- Haupt K. (2003), *Imprinted polymers - The next generation. Anal. Chem.* **75**, 376A-383A.
- Haupt, K., Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K. (2002), *Biochromatography*, **419**, 419-431.

- Hollar , C. M., Law , A.J.R., Dalgleish, D. G., Medrano , J. F. ve Brown, R. J. (1991), *Journal of Dairy Science*, **74**, 3308-3313.
- Huang, W., Chen, S., Chen, T. (2008), *Biochemical Engineering Journal*, **40**, 460-46.
- Iavazzo C, Athanasiou S, Pitsouni E, Falagas M. E. (2007), *European Urology*, **51**, 1537-1540.
- Idziak, L., Benrebouh, A. ve Deschamps, F. (2001), *Anal. Chim. Acta*, **435**, 137–140.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T. (2004), *Anal. Chim. Acta.*, **504**, 131–135.
- Ji-Lai G., Fu-Chun G., Ge-Ming Z., Guo-Li S. and Ru-Qin Y. (2003), *Talanta*, **61**, 447-453.
- Katz, A., Davis, M.E. (1999), *Macromolecules*, 32, 4113-4121.
- Kendall, F. I., Heidelberger, M., Dawson, M. H. (1937), *J. Biol. Chem.*, **118**, 61-69.
- Kim, S., Yamamoto, T., Endo, A., Ohmori, T., Nakaiwa, M. (2006), *Microporous and Mesoporous Materials*, **96**, 191 – 196.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H. (2002), *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, WILEY-VCH, New York.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K. (1997), *Anal. Chem.*, **69**, 345 A-349 A.
- Kunz, C. ve Lonnerdal, B. (1989), *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 464-470.
- Lago, G., Oruna, L., Cremata, J. A., Perez, C., Coto, G., Lauzan, E., Kennedy, J. F. (2005), *Carbohydrate polymers*, **62**, 321-326.
- Lozinsky, I. V., Galaev, Y. I., Plieva, M. F., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B. (2003), *Trends in Biotechnology*, **21**, 445-451.
- Luo, H., Li, N.B., Lio, S.P. (2005), *Biosensors and Bioelectronics*, **45**, 81-86.
- Magalhães, M. R., Silva Jr., N.J., Ulhoa, C. J. (2008), *Toxicon*, **51**, 1060-1067.
- Maleki, A., Kjoniksen, A.L., Nystrom, B. (2007), *Carbohydrate Research*, **342** (18), 2776-2792.

- Mallik, S., Plunkett, S.D., Dhal, P.K., Johnson, R.D., Pack, D.W., Shnek D.R. ve Arnold, F.H. (1994), *New Journal of Chemistry*, **18**, 299-304.
- Meyer, K., Palmer, J.W. (1934), *J. Biol. Chem.*, **34**, 607-629.
- Mosbach, K. ve Arshady, R. (1981), *Makromol. Chem.*, **182**, 687–692
- Özcan, A. (2007), *Biyomoleküller İçin Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Peng, H., Liang, C., Zhou, A., Zhang, Y., Xie, Q. and Yao, S. (2000), *Anal. Chim. Acta.*, **423**, 221–228.
- Puhl W., Scharf P. (1997), *Ann Rheum Dis*, **56 (7)**,637–640.
- Sarikaya, Y. (1993), *Fizikokimya*, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T., Denizli, A. (2003), *Anal. Chem.,Acta.*, **480**, 251-258.
- Say, R., Garipcan, B., Emir, S., Patır, S., Denizli, A. (2002), *Macromol. Mater. Eng.*, **287**, 539-545.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K. (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5853–5860.
- Shu X. Z., Liu Y., Palumbo F. S., Luo Y., Prestwich G.D. (2004), *Biomaterials*, **25**, 1339-1348.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K. (1993), *Nature*, **361**, 645–647.
- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W. ve Sahran, A. (1977), *Makromol Chem.*, **178**, 2817-2825.
- Yao, K., Shen, S., Yun, J., Wang, L., He, X., Yu, X. (2006), *Chemical Engineering Science*, **61**, 6701 – 6708.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K. ve Tanaka, N. (1998), *Anal. Chem.*, **70**, 386–389.
- Yu, H. ve Stephanopoulos, G. (2008), *Metabolic Engineering*, **10 (1)**, 24-32.
- Zhong, N. Byun, H.S. ve Bittman, R. (2001), *Tetrahedron Letters*, **42**, 1839-1841.