

**TETRAFENİLPORFİRİN BAZLI
HİDROFOBİK
ADSORBAN GELİŞTİRİLMESİ**

**TURGAY TAY
Doktora Tezi**

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Aralık-2004**

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Proje No : 021020



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Turgay Tay'ın "Tetrafenilporfirin Bazlı Hidrofobik Adsorban Geliştirilmesi" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Doktora tezi, 10 Aralık 2004 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. Hayrettin TÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Lale ZOR	
Üye	: Prof. Dr. Önder ORHUN	
Üye	: Prof. Dr. Gözen BEREKET	
Üye	: Doç. Dr. Rıdvan SAY	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
15.12.2004..tarih ve 41/2...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET**Doktora Tezi****TETRAFENİLPORFİRİN BAZLI HİDROFOBİK
ADSORBAN GELİŞTİRİLMESİ****TURGAY TAY****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Doç.Dr. Hayrettin TÜRK****2004, 108 Sayfa**

Bu doktora tez çalışmasında hidrofobik etkileşim adsorbanı olarak kullanılmak üzere tetrafenilporfirin ligandı içeren bir polimerik adsorban hazırlanmış ve bu adsorbana bovin serum albumin (BSA) adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorbana tetrafenilporfirin ligandı katabilmek için polimerleşebilecek yapıya sahip 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin 3 aşamada sentezlenmiş ve adsorban 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (%1), akrilamid (%39) ve etilenglikoldimetakrilat (%60) monomerlerinden süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır.

Bovine serum albuminin bu adsorbana adsorpsiyonu proteinin başlangıç derişiminin, pH'ın, iyonik kuvvetin ve tuz türünün fonksiyonu olarak araştırılmıştır. Bu adsorbanın bovine serum albumine karşı çok yüksek adsorpsiyon kapasitesine (q_m) ve düşük ayrışma sabitine (K_d) sahip olduğu görülmüştür; örneğin 1,0 M lık Na_2SO_4 ve tamponlanmış çözeltilerde pH 4,0 de q_m 775 mg BSA/g-adsorban ve K_d $1,21 \times 10^{-2}$ mg/ml ve pH 7,0 de q_m 625 mg BSA/g-adsorban ve K_d 0,170 mg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca çözeltilinin iyonik kuvveti arttıkça adsorplanan BSA miktarı artmıştır. Adsorbanın yüksek adsorpsiyona temel katkının BSA ile adsorban arasındaki van der Waals kuvvetleri ve $\pi-\pi$ etkileşimlerinden geldiği belirlenmiştir. Adsorpsiyon sürecinin neredeyse tersinmez olduğu proteinin desorbe olmamasından anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Adsorpsiyon, Bovine Serum Albumin, BSA, Porfirin, Hidrofobik Etkileşim



ABSTRACT**Ph.D Thesis****PREPARATION OF HYDROPHOBIC ADSORBENT BASED ON
TETRAPHENYLPORPHYRIN****TURGAY TAY****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Hayrettin TÜRK****2004, 108 Pages**

In this study, a polymeric adsorbent with tetraphenylporphyrin ligand was prepared as an hydrophobic interaction adsorbent and the adsorption behaviour of bovine serum albumin (BSA) on this adsorbent was studied. As a polymerizable porphyrin, 5-(4-metacrylamidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin was synthesized in three steps. The polymeric adsorbent with tetraphenylporphyrin ligand was prepared from monomers 5-(4-metacrylamidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1%), acrylamide (39%), and cross-linking agent ethyleneglycoldimetacrylate (60%) using suspension polymerization technique.

The adsorption behavior of bovine serum albumin on this adsorbent was studied as a function of the initial BSA concentration, pH, ionic strength, and type of salt. Very high adsorption capacity (q_m) and low dissociation constant (K_d) for the adsorbent were observed i.e. 775 mg BSA/g adsorbent and 1.21×10^{-2} mg/mL at pH 4.0 and 625 mg BSA/g-adsorbent and 0.170 mg/mL at pH 7.0 in 1.0 M Na_2SO_4 and buffered solutions. In addition the amount of adsorbed BSA increased as the ionic strength of the solution increased. The adsorbent showed hydrophobic interaction adsorbent behavior and van der Waals forces and π - π interactions between BSA and PFA were the major factors for high adsorption capacity. The adsorption process was nearly irreversible on this adsorbent.

Keywords: Adsorption, Bovine Serum Albumin, BSA, Porphyrin, Hydrophobic Interaction

TEŞEKKÜR

“Tetrafenilporfirin Bazlı Hidrofobik Adsorban Geliştirilmesi” adlı tez çalışması Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde, Doç. Dr. Hayrettin TÜRK’ün danışmanlığında yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince yetişmemde büyük katkıları olan ve bu süre içerisinde bana yön veren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hayrettin TÜRK’e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tez çalışmamı sağlayan Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne ve Enstitü Müdürü Prof. Dr. Altuğ İFTAR’a, Fen Fakültesi Dekanlığına ve Dekan Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA’ya, Kimya Anabilim Dalı Başkanlığına ve Anabilim Dalı Başkanı ve Jüri üyem Sayın Prof. Dr. Lale ZOR’a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez konusu seçiminde yardımlarından ve Jürimde bulunma nezaketinden dolayı Sayın Doç. Dr. Rıdvan SAY’a teşekkür ederim.

Ayrıca Jürimde bulunma nezaketinde bulunan Sayın Prof. Dr. Önder ORHUN ve Sayın Prof. Dr. Gözen BEREKET Hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışması süresince yardımlarından dolayı Murat ERDEM, Yasemin ÇİMEN ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hiç şüphesiz, her çalışmanın arkasında gizli, manevi kahramanların da olduğu bir gerçektir. Tez süresi boyunca çabalarından ve göstermiş oldukları anlayışlarından dolayı eşime ve kızıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Porfirinler	1
1.1.1. Porfirinlerin Kimyası	4
1.1.2. Sentetik porfirinlerin sentez yöntemleri ve tarihçesi	5
1.1.3. Sentetik porfirinlerin kullanım yerleri	8
1.2. Proteinler	9
1.2.1. Protein miktarının spektrofotometrik belirlenmesi	11
1.2.1.1. A_{280} / A_{260} oranı (Warburg ve Christian)	11
1.2.1.2. Biüret yöntemi	12
1.2.1.3. Lowry yöntemi	12
1.2.1.4. Bradford yöntemi	13
1.2.2. Bovin serum albumin (BSA)	13
1.2.2.1. BSA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	14
1.2.3. Porfirin - biyomolekül etkileşim çalışmaları	17
1.3. Adsorpsiyon	18
1.3.1. Adsorpsiyonu etkileyen diğer etmenler	21
1.3.2. Hidrofobik etkileşim ile adsorpsiyon ve kromatografisi	22
1.3.2.1. Protein hidrofobisitesi ve hidrofobik etkileşimler.....	27
1.3.2.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde alıkonma mekanizması	29
1.3.2.3. HEK'ni etkileyen faktörler	31

1.3.2.4. HEK'de adsorpsiyona tuz türü ve derişiminin etkisi.....	32
1.3.2.5. HEAK'de adsorpsiyon üzerine pH etkisi	32
1.3.2.6. HEAK'de adsorpsiyon üzerine sıcaklığın etkisi	33
1.3.2.7. HEAK'de kullanılan sabit fazlar	33
1.4. Polimer Sentezi	36
1.4.1. Süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile polimer sentezi	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM	39
2.1. Kimyasal Maddeler ve Reaktifler	39
2.2. Analizler ve Aletli Analizler	39
2.3. Tetrafenilporfirin Ligandı Bağlanmış Mikroküreciklerin Sentezi	40
2.3.1. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi.....	40
2.3.1.1. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi.....	40
2.3.1.2. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi	42
2.3.1.3. 5 -(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi	43
2.3.2. Tetrafenilporfirin ligandlı polimerik mikroküreciklerin sentezi.....	44
2.4. BSA Adsorpsiyon Deneyleri.....	45
3. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	50
3.1. Tetrafenilporfirin İçeren Polimerik Mikrokürecik Hazırlama Şekilleri.....	50
3.1.1. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin Sentezi.....	56
3.1.1.1. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu.....	56
3.1.1.2. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu	62
3.1.1.3. 5-(4-Metakriamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu	68
3.1.2. Tetrafenilporfirin ligandlı polimerik mikroküreciklerin sentezi.....	74
3.2. Bovin Serum Albumin Adsorpsiyon Çalışmaları.....	82

3.2.1. Adsorpsiyona tuz derişiminin ve türünün etkisi.....	87
3.2.2. pH etkisi.....	89
3.2.3. Başlangıç BSA derişiminin adsorpsiyona etkisi.....	91
3.2.4. BSA adsorpsiyonuna adsorban miktarının etkisi.....	95
3.2.5. Adsorban türünün etkisi.....	97
3.3. BSA desorpsiyon deneyleri.....	98
3.4. Sonuç.....	99
KAYNAKLAR.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Bazı porfirin ve türevlerinin yapısı.....	3
1.2.	Porfirinlerin tipik UV-görünür bölge spektrumu.....	4
1.3.	Adler yöntemi ile 5,10,15,20-tetrafenilporfirin (H ₂ TPP) sentezi	6
1.4.	Lindsey yöntemiyle porfirin sentezi (X, X', Y, Y', Z: H, Halojen (Cl, F), CH ₃ gibi süstitüentler).....	7
1.5.	Proteinlerin Yapısı a) primer yapı, b) sekonder yapı, c) tersiyer yapı, d) kuaterner yapı.....	10
1.6.	Bovin serum albumin molekülündeki asidik, bazik ve nötral kısımlar görülmektedir. A) önden, B) arkadan, C) soldan ve D) sağdan görünüş. Yüzeylerdeki mavi renk bazik kalıntıları, kırmızı renk asidik kalıntıları ve sarı renk ise nötral kalıntıları vermektedir	15
1.7.	Bovin serum albuminin izomerik formları.....	16
1.8.	Proteindeki hidrofobik bölgelerin hidrofobik ligand ile etkileşiminin temsili gösterimi	23
1.9.	“Gerçek” hidrofobik etkileşim kromatografisi	24
1.10.	Alkil agaroz ve amino alkil agaroz	25
1.11.	Amfifil kromatografisi	25
1.12.	Yük transfer kromatografisinde protein-adsorban etkileşimi	26
1.13.	Yük transfer kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar.....	27
1.14.	HEAK’de kullanılan bazı ligandların şematik yapıları.....	35
2.1.	Bradford assay yöntemine göre çizilmiş BSA proteinin kalibrasyon eğrisi.....	46
2.2.	Bradford ajanı-BSA kompleksinin zamana bağlı UV-görünür bölge spektrumları (pH 4,0’de, [Na ₂ SO ₄] =1 M, 20 mM asetat tamponu, (0) 0 dak, (1) 10 dak, (2) 35 dak, (3) 70 dak, (4) 160 dak, (5) 270 dak, (6) 580 dak. ve (7) 2020 dak sonunda alınan spektrumlar).....	48
2.3.	pH 4,0 de protein adsorpsiyonu, BSA = 1,0 mg/ml, Adsorban =5 mg, V = 5 ml, [Na ₂ SO ₄] =1 M, 20 mM asetat tamponu,.....	49
3.1.	Tetrafenilporfirin ligand içeren yapılar hazırlanması için sentez yaklaşımları.....	53

3.2.	Vinil grubu içeren çeşitli tetrafenilporfirinler (monomerler).....	54
3.3.	Tetrafenilporfirin ligandı içeren monomerin retrosentezi.....	55
3.4.	Lindsey yöntemine göre tetrafenilporfirin sentezi.....	58
3.5.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu.....	59
3.6.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu.....	60
3.7.	5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin NMR spektrumu.....	61
3.8.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin indirgenme reaksiyonu ile eldesi.....	64
3.9.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu.....	65
3.10.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu.....	66
3.11.	5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin ¹ H NMR spektrumu.....	67
3.12.	5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi.....	70
3.13.	5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu.....	71
3.14.	5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu ...	72
3.15.	5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin NMR spektrumu...	73
3.16.	Kopolimer hazırlanmasında kullanılan süspansiyon polimerizasyonu sisteminin gösterimi.....	75
3.17.	Tetrafenilporfirin bağlanmış poliakrilamid küreciklerin sentezi.....	76
3.18.	Tetrafenilporfirin ligandı içeren akrilamid-EDMA kopolimerinin polimerik mikroküreciklerin FTIR spektrumu.....	78
3.19.	%1,0 Tetrafenilporfirin içeren polimerik mikroküreciklerin SEM fotoğrafları(a) Yüzey, (b) Mikroküreciklerin iç kısmı, (c) Yüzey (yakın plan).....	79
3.20.	Tetrafenilporfirin ligandı içermeyen EDMA içeren polimerik mikroküreciklerin SEM fotoğrafları.....	80
3.21.	Tetrafenilporfirin içeren polimerik mikroküreciklerin optik mikroskop fotoğrafları	81
3.22.	Hidrofobik karaktere sahip bazı amino asitler.....	82
3.23.	Apolar karakterlerdeki bir proteinin bir adsorban adsorpsiyonu	

sonucu daha az düzenli bir yapının oluşması.....	84
3.24. Tetrafenilporfirin ligandı içeren polimerik adsorbanın yapısı.....	85
3.25. Yük transfer kromatografisinde substratı ayırmayı sağlayan π - π etkileşimleri.....	86
3.26. BSA yüzeyindeki π bağlara sahip amino asit kalıntılarının porfirin halkasındaki ve fenil gruplarındaki π bağları ile π - π etkileşiminin şematik gösterimi.....	87
3.27. pH 7,0 de BSA adsorpsiyonuna Na_2SO_4 derişimine bağlılığı.....	88
3.28. Tuz yapısının pH 7,0 de BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	89
3.29. BSA adsorpsiyonunun pH'a bağlılığı.....	90
3.30. BSA adsorpsiyonunda maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH'a bağlılığı	91
3.31. pH 7.0 de, BSA adsorpsiyonunun başlangıç BSA derişimine bağlılığı....	93
3.32. pH 4,0 de BSA adsorpsiyonunun başlangıç BSA derişimine bağlılığı.....	94
3.33. BSA denge derişimine karşı (C_e/q_e) grafiği ve Langmuir izotermi.....	95
3.34. Adsorban miktarının BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	96
3.35. Adsorplanan BSA miktarının adsorban miktarı ile değişimi.....	97
3.36. Adsorban türünün BSA adsorpsiyonuna etkisi.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	BSA'deki amino asit içeriği.....	14
2.1.	pH 4 de yapılan bir çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi.....	49
3.1.	Hazırlanan mikroküreciklerin monomer bileşimi (mol%).....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: 2,2-Azobisisobütironitril
BNCT	: Boron nötron yakalama terapisi
BSA	: Bovin serum albumin
BSE	: Bulaşıcı süngerimsi ensefalopati
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
FeTDCSPP	: 5,10,15,20-Tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatodemir (III)
FeTDCSPPCl ₈	: 2,3,7,8,12,13,17,18-Oktakloro-5,10,15,20-tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatodemir
FTIR	: Fourier dönüşüm infrared spektroskopisi
H ₂ TPP	: 5,10,15,20-Tetrafenilporfirin
HEK	: Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
MnTDCPP	: 5,10,15,20-Tetrakis(2,6-diklorofenil) porfinatomangan
MnTDCSPP	: 5,10,15,20-Tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan
MnTDCSPPCl ₈	: 2,3,7,8,12,13,17,18-Oktakloro-5,10,15,20-tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan
MR	: Magnetik rezonans
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
PDT	: Fotodinamik terapi
PVA	: Poli(vinil alkol)
RNA	: Ribonükleik asit
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyoloji ve tıpta gözlenen hızlı gelişmeler sonucu biyomoleküllerin günlük yaşamda veya tedavinin birçok alanında kullanımları gereği doğmuştur. Bu nedenle son zamanlarda biyomoleküllerin biyolojik ekstraktlardan ayırılmaları ve saflaştırılması konusunda sayısız araştırma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Bu araştırmaların çoğunda ya biyolojik aktiviteye sahip makromoleküller ile etkileşecek özellikte, polimerler başta olmak üzere, adsorbanların hazırlanması amaçlanmış ya da ticari olarak pazarlanan adsorbanların belli bir biyomolekülün saflaştırılmasında veya bir yüzeye bağlanmasında etkinliği araştırılmıştır. Bu konulara ilişkin yazılmış çok sayıda kitap da mevcuttur.

Bu çalışmada bir polimerik matrikse bağlanmış tetrafenilporfirin ligandı ile bovin serum albumin (BSA) proteini arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Bu amaç için önce uygun bir tetraarilporfirin ligandı sentezlenmiş, ardından bu ligand bir polimerik matrikse süspansiyon polimerizasyonu ile dahil edilmiş ve son olarak bu adsorbana BSA'nın adsorpsiyonu araştırılmıştır. Porfirin doğanın sentezlediği bir yapı olup bugün çok sayıda sentetik türevi çeşitli amaçlar için sentezlenmiştir. Porfirin biyomolekül etkileşimlerine ilişkin çalışmalarda farklı süstitüsyonlu porfirinlerin daha çok kanser tedavisinde fotodinamik tedavi ajanı olarak kullanımı araştırılmıştır. Porfirinin biyomoleküller için bir adsorpsiyon ligandı olarak kullanımına ilişkin bir çalışma henüz literatürde yer almamıştır.

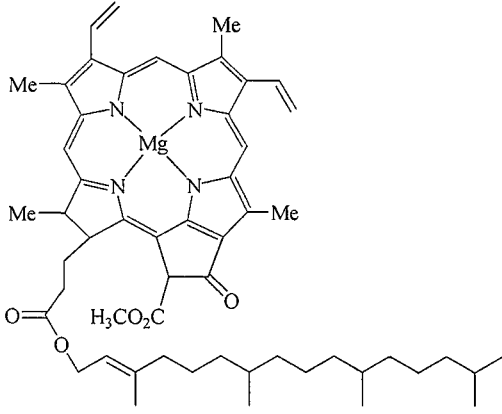
1.1. Porfirinler

Porfirinler ve aynı aileden olan tetrapirolik pigmentler doğada yaygın bir şekilde bulunur ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Heme, demir(II) protoporfirin-IX kompleksi, hemoglobinlerin ve miyoglobinlerin prostetik grubudur ve oksijen taşınmasından sorumlu olup, yaşam dokularında depolanır. Heme, aynı zamanda enzim peroksidazlarda da bulunabilir ve substratların hidrojen peroksit ile oksidasyonunu katalizler. Aynı zamanda heme içeren ilgili enzim, hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrılmasını katalizler. Diğer

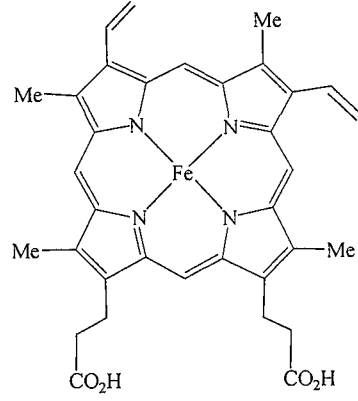
protein içeren heme, sitokromları kapsar ve elektron transfer zincirinde bir elektron taşınmasında görev yapar [1]. Klorofiller de bir doğal porfirindir ve yeşil bitkilerde bol miktarda bulunur. Klorofiller fotosentezde önemli rol oynarlar (Şekil 1.1).

Porfirinin basit yapısı, dört methine köprüsü ile bağlı dört pirol birimi içerir. Porfirin makro halkası 22π elektron içeren bir aromatik sistem olup herhangi bir delokalizasyonda sadece 18π elektronu içermektedir. Porfirin Hückel aromatik kuralına ($4n+2\pi$ elektronlar, $n=4$) uyar ve X ray kristolografisi ile yapısının düzlemsel olduğu belirlenmiştir. Porfirinlerin aromatik karakteri NMR spektrumlarında da görülebilir. Porfirin halka bakımından anisotropik etki olmasına rağmen, NMR sinyalleri paylaşılmamış mesoprotonları için (protonlar methine karbonları köprüsünde) düşük alanda (8–10 ppm) gösterir. Buna karşılık içerdeki azot atomlarındaki paylaşılmamış protonlar için sinyaller çok yüksek alanda (-2 ile -4 ppm) gelir.

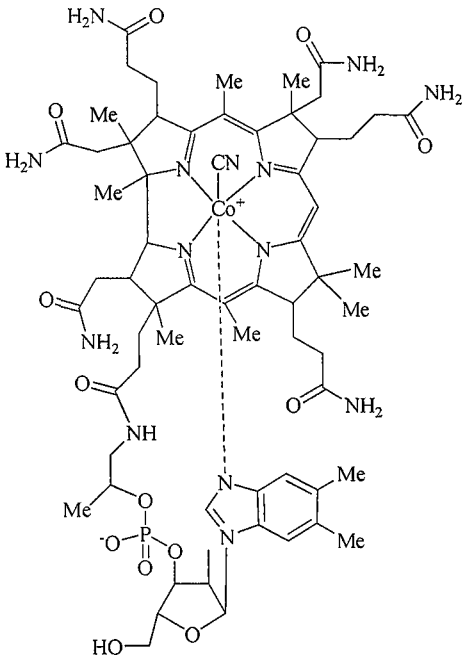
UV görünür bölge absorpsiyon spektrumunda oldukça yüksek konjügasyon sahip porfirin makro halkası, 400 nm civarında yoğun (sönüm katsayısı $> 2 \times 10^5$) absorpsiyon gösterir. Bunu daha yüksek dalga boylarında 450 – 700 nm’de birkaç zayıf Q absorpsiyon bandları takip eder (Şekil 1.2). Porfirin halkası üzerindeki çevresel sübstitüentlerin çeşitliliği genellikle absorpsiyon dalga boylarında ve yoğunluklarında az oranda değişikliklere sebep olur. Porfirin makro halkasının iç kısmındaki azot atomunun protonlanması veya porfirin boşluğunun içine metal bağlanması görünür bölge absorpsiyon spektrumunu değiştirir. Bu absorpsiyonlar porfirin üzerinde belirli özelliklerin incelenmesinde yardımcı olur.



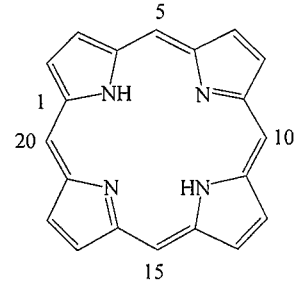
Klorofil a



Heme

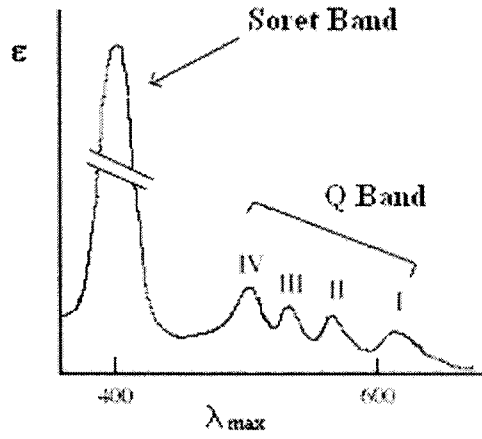


Vitamin B12



Porfirin

Şekil 1.1. Bazı porfirin ve türevlerinin yapısı



Şekil 1.2. Porphirinlerin tipik UV-görünür bölge spektrumu

Porfirin halkası, derişik asitte (örneğin H_2SO_4 de) çok kararlıdır ve kendi kendine asit veya baz olarak davranabilir. Güçlü bazlar (örneğin alkoksitler), porfirin halkası içindeki azot atomları üzerindeki protonları kopararak porfirinleri dianyon formuna dönüştürürler (pK_a 16 civarında). Diğer taraftan, ise bu protonlar asitle kolaylıkla protonlanabilirler (pK_b 9 civarında).

1.1.1. Porphirinlerin Kimyası

Porfirinler, aromatik bileşiklerin verdiği birçok tipik kimyasal reaksiyonları verirler. Örneğin elektrofilik süstitüsyon reaksiyonları porfirinlerde methine (meso) karbonları ve β pirolük karbonlar üzerinden yürür. Ayrıca belli süstitüentler ile porfirin molekülleri modifiye edilebilir. Bu da farklı türde porfirinlerin oluşmasına yol açar.

Porfirinlerin diğer önemli özelliği metallenebilme ve metal uzaklaştırlabilme yetenekleridir. Demir, çinko, bakır nikel gibi birçok metalin iyonu çeşitli metal tuzları kullanılarak porfirin boşluğuna yerleştirebilir. Metallerin uzaklaştırlması ise metalloporfirinler çeşitli derişimlerde kuvvetli asitlerle işleme sokularak başarılabilir.

İstenilen özelliklerdeki porfirinlerin elde edilmesinde iki genel yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi, doğal bir şekilde bulunan porfirinin (örneğin heme nin) modifikasyonu yoluyla, ikincisi de toplam sentez yoluyla. Doğal

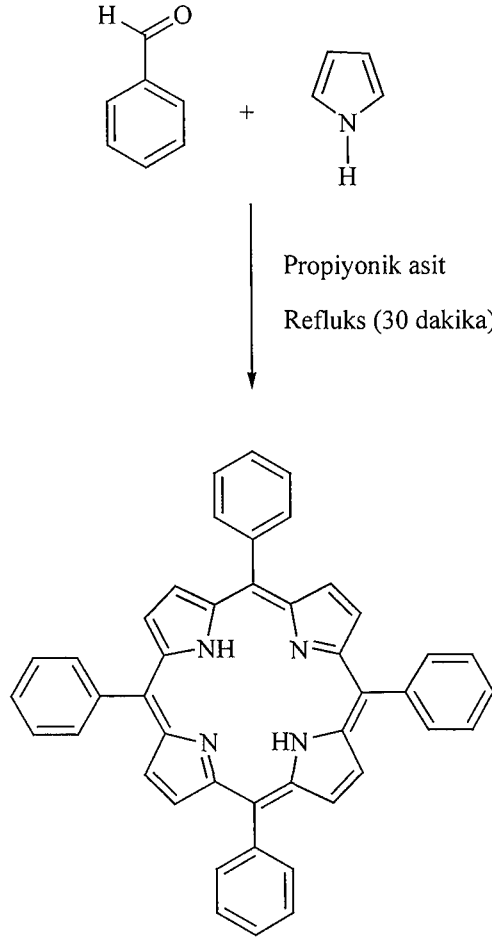
porfirinlerin modifikasyonu uygun ve kolay bir yöntem olmasına rağmen çevresel sübstitüentlerin seçimi üzerinde büyük sınırlamalara neden olur. Çünkü belli sübstitüentler kolaylıkla modifiye edilemezler. Birçok durumda böylesi sınırlamalar, toplam sentez yoluyla üstesinden gelinir. Toplam sentez gerekli sübstitüentlere sahip benzaldehit ve piroller ile sentezlenir.

1.1.2. Sentetik porfirinlerin sentez yöntemleri ve tarihçesi

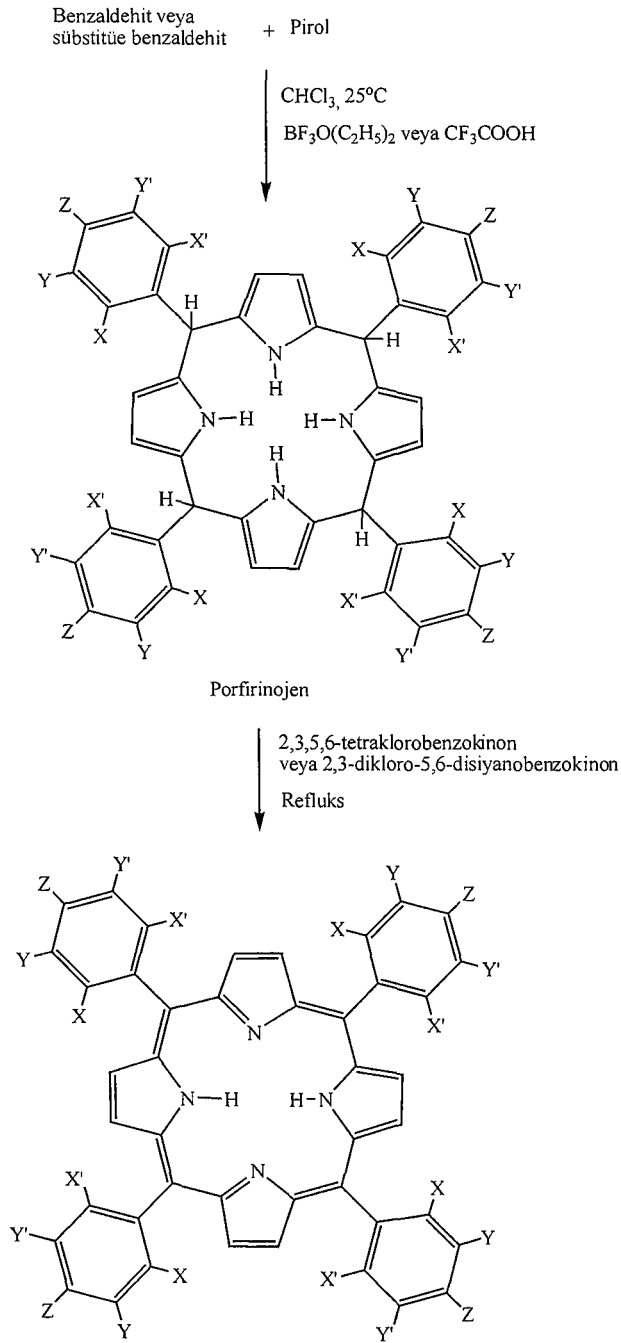
Porfirin sentezi ilk defa 1936 yılında Rothemund tarafından ağzı kapalı bir tüpte ve azot atmosferi altında pirol ile aldehit fonksiyonel grubuna sahip bazı bileşiklerin piridin-metanol çözeltisinde 90-95°C'de 30 saat ısıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir [2,3]. Aldehit olarak formaldehit, benzaldehit, bütiraldehit, furaldehit, asetaldehit ve propiyonaldehit kullanılmış ve verim kullanılan pirolün gramı başına yaklaşık 1 mg olmuştur. Bu yöntem uzun yıllar boyunca tek porfirin sentez yöntemi olarak kalmıştır. 1967 yılında Adler ve çalışma arkadaşları tarafından yeni bir yöntem geliştirilmiştir [4]. Bu yeni yöntemde pirol ve benzaldehit 30 dakika refluks halindeki propiyonik asitte reaksiyona sokularak %20 verimde 5,10,15,20-tetrafenilporfirin elde edilmiştir (Şekil 1.3). Reaksiyon sonucu oluşan porfirin, propiyonik asit oda sıcaklığına soğutulduğunda kristallenmiş ve ortamdan süzülerek alınmıştır. Ancak Adler ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemde iki önemli sorun vardır: Öncelikle, porfirinin reaksiyonda yan ürün olarak oluşması nedeniyle, propiyonik asitte kristallenmeyen porfirinlerin ortamdan ayrılması ve saflaştırılması bu yöntemde oldukça güç olmaktadır. Ayrıca porfirinlerin *meso* konumlarında bulunan aril gruplarının orto sübstitüent içermesi halinde bu yöntem ile verim % 1'in altında kalmaktadır [5].

Daha sonra 1987 yılında Lindsey ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen yeni bir sentez yöntemi ile Adler yöntemindeki sorunlar büyük oranda ortadan kaldırılmıştır [6-8]. Bu yöntemde, ilk olarak oda sıcaklığındaki kloroformda özellikle 2,6 konumlarında sübstitüent bulunduran arilaldehitler ile pirol az miktarda bor triflorüretat veya trifloroasetik asit katalizörlüğünde reaksiyona sokularak porfirinojen elde edilmiştir. Ardından reaksiyon ortamına

2,3-dikloro-5,6-disiyanobenzokinon veya 2,3,5,6-tetraklorobenzokinon gibi bir oksidant ilave edilerek porfirinojen, porfirine dönüştürülmüştür (Şekil 1.4). Reaksiyon, yaklaşık 10^{-2} M'lık seyreltik çözeltilerde gerçekleştirilmiş ve bu şekilde polipirilmetan şeklindeki açık yapıların oluşması engellenmiştir. Lindsey yöntemi ile süstitüentlerin konumları bakımından 30'dan daha fazla tür porfirin % 30-40 arasında verimle elde edilmiştir [6-8].



Şekil 1.3. Adler yöntemi ile 5,10,15,20-tetrafenilporfirin (H_2TPP) sentezi



Şekil 1.4. Lindsey yöntemiyle porfirin sentezi (X, X', Y, Y', Z: H, Halojen (Cl, F), CH₃ gibi süstitüentler)

1.1.3. Sentetik porfirinlerin kullanım yerleri

Porfirin tipi bileşiklerin, kanser tanımlamaları ve fotodinamik terapi (PDT) [9] ve aynı zamanda boron nötron yakalama terapisi (BNCT) [10] tedavisinde kullanılmak için ilaç duyarlılığı aktif bir şekilde araştırılmıştır. Son on yılda iki porfirin türevi PDT tedavisi için Amerikan gıda ve ilaç idaresi tarafından onaylanmış, çeşitli koşulların ve birçok diğer umut verici türevleri ön klinik ve klinik çalışmaları değerlendirilmiştir [11]. Bu araştırmalardan belirli porfirin türevlerinin, tümör dokularına seçici bir şekilde yerleşme yeteneğine sahip olduğu ve affinitelerinin olası sonucu olarak biyolojik membranlara taşındıkları bilinmektedir. Özellikle, pozitif yüklenmiş porfirinler örneğin meso-tetra(metilpiridil)porfirin ve meso-tetra(trimetilaminofenil)porfirinler potansiyel biyolojik grupların negatif yüklenmesiyle birlikte güçlü bir şekilde etkileşim gösterirler. Örneğin belirli proteinler, DNA ve RNA, PDT için fotoduyarlılığını etkilemektedir [11-15].

Bununla birlikte literatürde metallo porfirinlerin ve porfirinlerin oksidasyon katalizörü olarak kullanımına ilişkin çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu konudaki bir derleme B. Meunier tarafından yapılmıştır [16,17].

Harriman ve arkadaşları fotosentez olayını in vitro model bir sistemde gerçekleştirebilmek için suda çözünür mangan(III)porfirinlerin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını araştırmışlardır [18-21]. Çalıştıkları 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfinatomangan, 5,10,15,20-tetra(N-metil-4-piridil)porfinatomangan, 5,10,15,20-tetra(4-sülfonatofenil)porfinatomangan ve 5,10,15,20-tetra(4-karboksifenil)porfinatomanganın pH>10 iken hipoklorit ve sodyum persülfat ile oksitlenebildiğini ve oluşan oksitlenme ürününün kararlı olmadığını gözlemlemişlerdir. Daha sonraki çalışmalarında ise, bazik ortamda oksitlenmiş bu mangan porfirinlerin μ -okzo dimer şeklinde mangan(IV) porfirin olduğunu spektroskopik ve magnetik moment ölçümlerinden belirlemişlerdir. Ayrıca bu mangan porfirinlerin pH 14'de farklı oksidantlarla oksitlenmeleri sonucu her zaman aynı oksitlenmiş mangan porfirin yapısının oluştuğu görülmüştür.

Banfi ve çalışma arkadaşları mangan porfirin katalizörleri yardımıyla 0°C'de CH₂Cl₂-H₂O sisteminde NaOCl ile alken epoksidasyonunu çalışmışlar ve kullanılan katalizörlerin katalitik aktiviteleri ile yapısal kararlılıklarına ilişkin bulguları yayınlamışlardır [22]. Banfi ve grubunun hazırladığı ve aril grubu fenil, 2,4,6-trimetilfenil, 9-antrasenil, pentaflorofenil ve 2,6-diklorofenil olan 5 ayrı mangan porfirin içinde sadece 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diklorofenil) porfinatomangan (MnTDCPP) reaksiyon koşullarında hiç parçalanmaya uğramamış ve 5,10,15,20-tetrafenilporfinatomangan ile 5,10,15,20-tetrakis (pentaflorofenil)porfinatomangan birkaç dakika içinde tümüyle parçalanmışlardır. 5,10,15,20-Tetrakis(2,4,6-trimetilfenil)porfinatomanganın ise 20 dakikada %50'si parçalanmıştır [22].

Bu grubun daha sonraki yayınlarında cis-siklookten (CO) ile 1-dodokenin (1-DD) % 30'luk H₂O₂ ve NaOCl oksidantlar ile çeşitli Mn(III) porfirinler katalizörlüğünde CH₂Cl₂-H₂O sisteminde oksidasyonu sonuçları verilmiştir [23].

Ligninin enzimlerle yapılabilen parçalanmasını bir katalizör ile gerçekleştirmeye çalışan bir çalışmada suda çözünür FeTDCSPP, MnTDCSPP, FeTDCSPPCl₈ ve MnTDCSPPCl₈ kullanılmıştır [24]. Oksidant olarak kullanılan m-kloroperbenzoik asit, *tert*-butil hidroperoksit, hidrojen peroksit ve sodyum hipokloritin içinde bu metallo porfirinlerde en hızlı parçalanmaya H₂O₂ neden olmuştur.

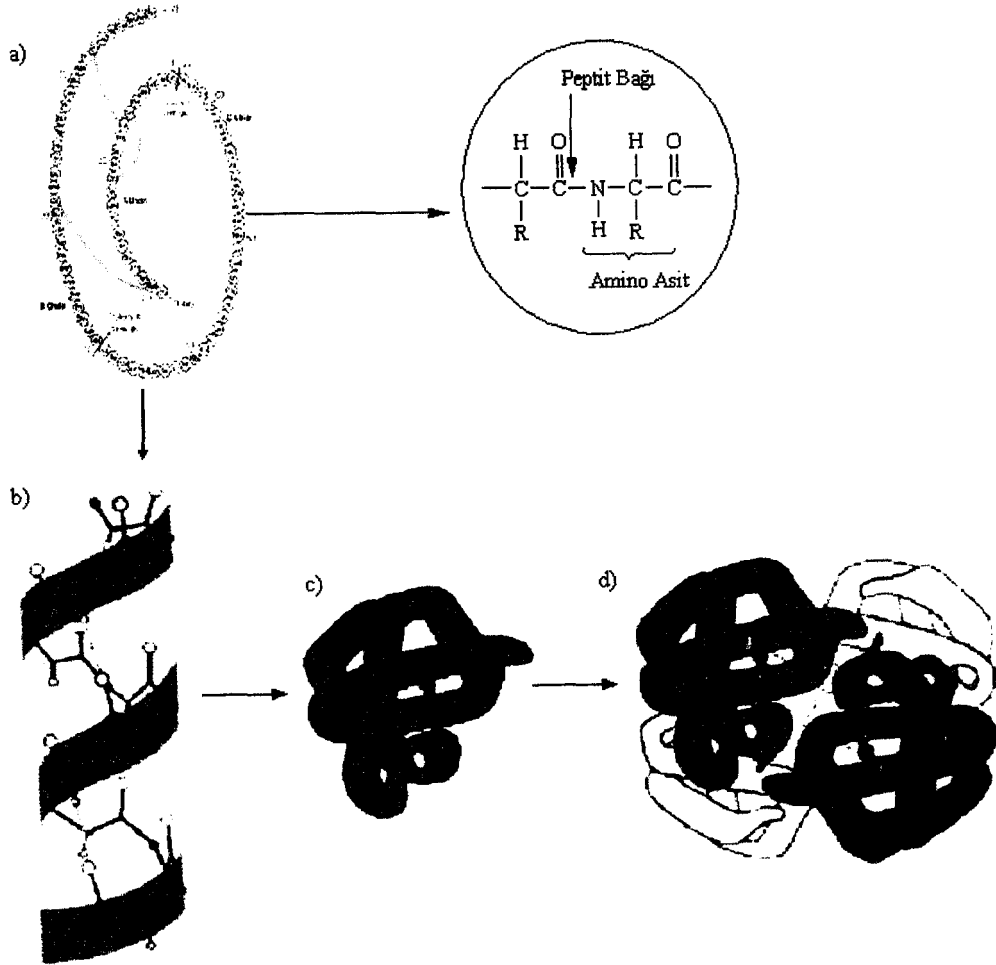
1.2. Proteinler

Proteinler canlı organizmalarda bulunan en önemli organik maddelerinden biri olup molekül ağırlıkları birkaç binden milyonlara kadar çıkabilir. Bütün canlılarda bulunan protein çeşitleri bir milyon kadardır. En basit bir bakteri hücresinde yaklaşık beş bin tür protein molekülü ve bir memeli hücresinde de on bin tür protein molekülü olduğu hesaplanmıştır. Proteinlerin yapı birimleri amino asitlerdir. Canlılarda, biyosentez yoluyla amino asitler birbirleri ile birleşerek protein moleküllerini yani polipeptit zincirlerini oluştururlar [25].

Bütün proteinler yirmi amino asitten meydana gelmiştir. Amino asitlerin tek başına bir biyolojik aktivitesi olmamasına rağmen polipeptit zincirlerine yapı

birimi olarak girerek oluşturdukları proteinlerin bir kısmı enzim aktivitesine, bir kısmı hormon aktivitesine, bir kısmı da antikor aktivitesine sahip olur ve diğer bir kısmı ise yapısal fonksiyon görürler. Proteinler yapılarındaki amino asit dizilişi, sayısı ve üç boyutlu yapıları bakımından farklılıklar gösterirler ve bu farklılıklar proteinlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler. Proteinlerin yapısında bulunan amino asitlerin sıralanışı kalıtsal olarak DNA molekülü tarafından belirlenir [26].

Amino asitlerin peptit bağlarıyla oluşturduğu polipeptit zincirler proteinin primer yapısını oluşturur (Şekil 1.5.a). Proteinlerin fonksiyonlarını eksiksiz yapmalarında proteinin sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarının etkisi çok önemlidir (Şekil 1.5.b,c,d) [26].



Şekil 1.5. Proteinlerin Yapısı a) primer yapı, b) sekonder yapı, c) tersiyer yapı, d) kuaterner yapı

1.2.1. Protein miktarının spektrofotometrik belirlenmesi

Bir çözeltildeki protein miktarının belirlenmesi, proteini ayırma ve saflaştırma işlemlerinin seçiminde ve belli aşamalardaki protein veriminin ve saflığının kontrolünde önemli yer tutar. Son zamanlarda protein miktarının belirlenmesinde yararlanılan yöntemler arasında, protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile proteinin reaksiyonu sonucu oluşan renkli bir bileşiğin görünür bölgede adsorpsiyonunun ölçülmesi sayılabilir. Protein derişiminin belirlenmesi için doğrudan veya dolaylı başka birçok yöntem de vardır. Bunlar arasında azot miktarının belirlenmesine dayalı ve dolaylı bir yöntem olan Kjeldahl yöntemi ile FTIR, türbidimetri, fluorimetri, refraktometri ve polarografi gibi doğrudan yöntemler sayılabilir. Primer yapısı bilinen bir proteinin amino asit analizi yardımıyla miktar tayinini yapmak da mümkündür [27].

UV-görünür bölge spektrofotometrik yöntemi ile protein miktar belirlenmesine ilişkin bazı prosedürler aşağıda kısaca verilmiştir:

1.2.1.1. A_{280} / A_{260} oranı (Warburg ve Christian)

Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle birçok protein 280 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir [28]. Bu özellikten yararlanılarak örnekteki protein miktarının yaklaşık olarak bulunması için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem çok duyarlı olmamakla beraber (duyarlılık 0,05-2,0mg/ml) kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle çok kullanılmaktadır. Ancak nükleik asit artıkları bulunan çözeltilerdeki protein miktar analizlerinde, nükleik asitlerinde 260 nm ve 280 nm de absorpsiyonları nedeniyle hatalı sonuçlar elde edilebilir. Bunun önüne geçmek için Warburg ve Christian tarafından geliştirilmiş bir seri hata düzeltme faktörü genel olarak tüm proteinler için kullanılmakta ve bu yöntemde ortaya çıkabilecek hata payı en aza indirgenmektedir. Bu nedenle saflık derecesi yüksek olan proteinlerin miktar belirlenmesinde kullanıma daha uygun bir yöntemdir.

1.2.1.2. Biüret yöntemi

Bu yöntemin de duyarlılığı düşük olmasına rağmen pratikliği nedeniyle geniş çapta kullanılmaktadır [29]. Analiz kullanılan belirteçte bulunan bakır iyonlarının peptit azotlarına bağlanması sonucu alkali çözeltide 540-560 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir kompleksin oluşumuna ve bu kompleksin absorbans şiddetinin ölçümüne dayanır. Bakır iyonlarının ana zincire bağlanması nedeniyle farklı amino asitlerin ölçümler üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.

1.2.1.3. Lowry yöntemi

Protein derişiminin bulunmasında en doğru metot asit hidrolizini takip eden amino asit analizi ile mümkündür. Bir çok yöntemde proteinlerdeki amino asit bileşimine duyarlı olduğundan proteinlerin kesin derişimi bulunamayabilir. Lowry ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntem, Folin-Ciocalteau belirteci olarak bilinen fosfomolibdotungustik asit çözeltisinin tirozin ve triptofan ile reaksiyona girerek mavi renkli bir kompleks oluşturması ve bu kompleksin absorbans şiddetinin ölçümü esasına dayanır [30]. Bu yöntemde alkali çözeltide ve oda sıcaklığında bakır ile protein arasında kompleks oluşumu ile başlar ve 5-10 dakika içinde tamamlanır. Bakırın varlığı bu yöntemin duyarlılığını artırmaktadır. Çünkü bakır ile yapılan kompleks, Folin belirtecindeki molibden ve tungsten ile birleşerek yeni bir kompleks oluşturur. Ortamda bulunan fenolik maddeler ise hatalara yol açabilir.

Bu yöntemle 0,01 mg protein/ml derişimin altında ölçüm yapılabilir ancak en iyi sonucu 0,01-1,0 mg/ml protein derişimi aralığında verir. Bu yöntemde kullanılan tamponlarda önemlidir, çünkü tris gibi primer aminler proteinlerin Lowry yöntemi ile analizinde hatalara yol açabilir veya bazı enzimleri inhibe edebilir.

1.2.1.4. Bradford yöntemi

Bradford yöntemi protein miktarının belirlenmesi çalışmalarının çoğunda tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem Lowry yöntemine göre daha hızlı, basit ve duyarlı olup Coomassie brilliant blue G250 boyasının proteine bağlanabilme özelliğine dayanır [31]. Bu yöntem, boyanın farklı derişimlerdeki proteinlere bağlanarak, değişik absorbans şiddetinde mavi renkli çözeltiler oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Bu yöntemin duyarlılık sınırları 0,2-1,4 mg/ml protein derişimidir. Boyaya protein bağlandığında boyanın anyonik mavi formu 590 nm de maksimum absorpsiyon verir ve absorpsiyon şiddetinden bağlanan protein miktarı bulunabilir.

Deneylerde standart protein olarak miktarı belirlenecek proteinin kendisi kullanılırsa en doğru sonuç alınır. Ancak böyle bir uygulama genellikle mümkün olmamaktadır. Standart olarak çoğunlukla bovin serum albumin kullanılır.

1.2.2. Bovin serum albumin (BSA)

Serum albumin araştırmacılar tarafından en çok çalışılan proteinlerden birisidir. Birçok araştırmacı serum albuminin diğer proteinlerle etkileşimini incelemişlerdir [32-34]. Albumin genellikle plazma albumini veya serum albumini olarak bilinir. Albuminlerin yapısına bakıldığında az miktarda triptofan ve metionin, yüksek miktarda sistin ve yüklü amino asitler, aspartik ve glutamik asit, lisin ve arginin bulunur. BSA de glisin ve izolösin miktarı proteindeki ortalama amino asit miktarından daha azdır [35] (Çizelge 1.1).

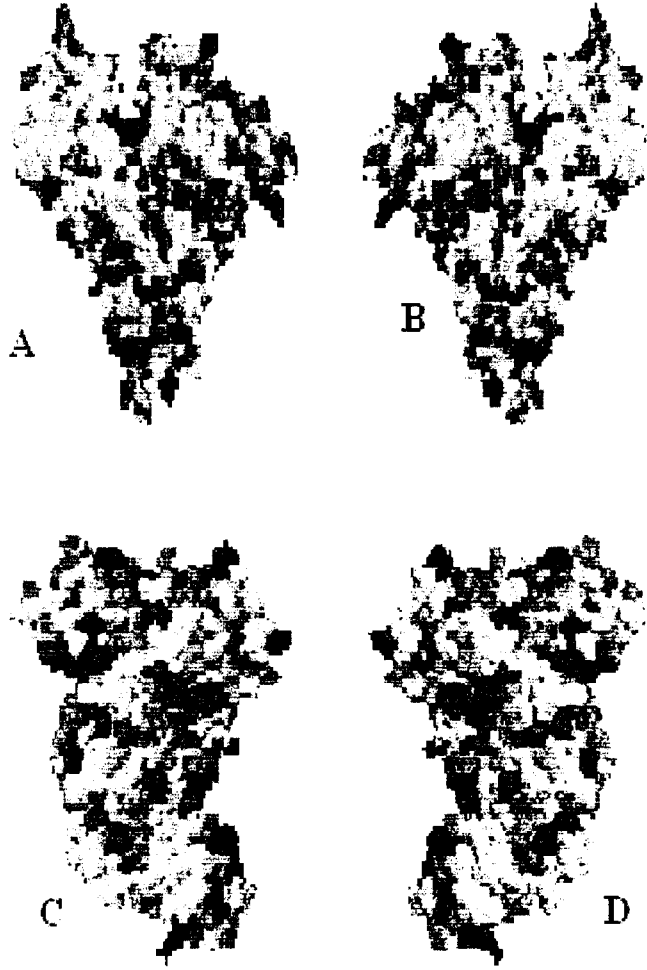
Çizelge 1.1. BSA'deki amino asit içeriği [36-39].

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

1.2.2.1. BSA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri

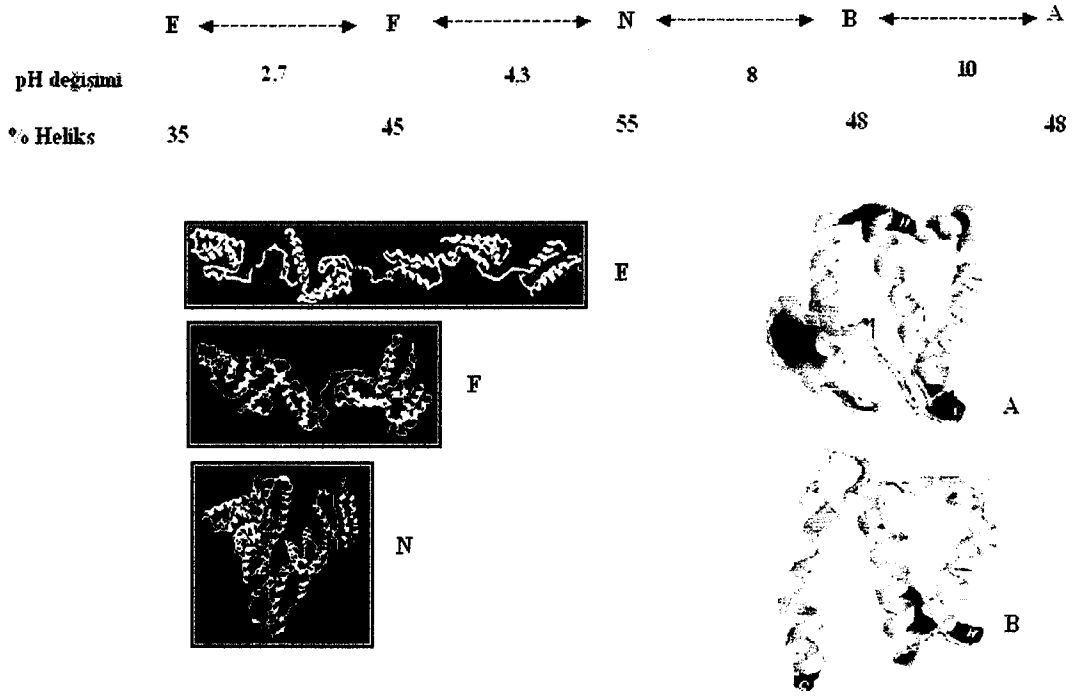
Albumin molekülünün primer yapısı tek yüklü olmayıp doğal pH değerinde bovin serum albuminin I, II ve III yapılarının net yükü -10 , -8 ve 0 olarak hesaplanmıştır [40]. Şekil 1.6'da BSA'nin yüzeyindeki yük dağılımının yanında BSA'nin tersiyer yapısında, primer yapı üzerindeki asimetric yük dağılımı açıkça görülmektedir.

Bir proteinin viskozitesi onun mol kütlesi, boyutu, hacmi, şekli, yüzey yükü ve kolay deformasyonu gibi karakteristik özelliklerine bağlıdır [41, 42]. Ayrıca bir proteinin viskozitesini pH, iyonik kuvvet, sıcaklık ve iyon tipi gibi dış etkilere etkiler [43]. Literatürde bovin serum albuminin viskozitesi $3,7-4,4$ ml/g olarak verilmiştir [40]. Kolthoff ve çalışma arkadaşları 1958 yılında bovin serum albumin için viskozite değerini ortamda bulunan disülfid bağlarının oluşturduğu oyukların artırdığını bildirmişlerdir [44]. BSA in mol kütlesi yaklaşık 69000 g dır. Proteinlerin, özellikle molekülün yüzeyinde veya yüzeye yakın bölgelerinde amino asitlerin R kalıntılarında bulunan çeşitli gruplar, ayrıca uç gruplarda bulunan terminal amino ve karboksil grupları ortamın pH'sına göre yüklü bir durumda bulunabilir. Proteinlerde bu yüklü grupların değerinin 0 olduğu pH değerine izoelektrik nokta denir. BSA nin izoelektrik noktasının (pI) $4,7$ olduğu literatürde verilmiştir [45].



Şekil 1.6. Bovin serum albumin molekülündeki asidik, bazik ve nötral kısımlar görülmektedir. A) önden, B) arkadan, C) soldan ve D) sağdan görünüş. Yüzeylerdeki mavi renk bazik kalıntıları, kırmızı renk asidik kalıntıları ve sarı renk ise nötral kalıntıları vermektedir [46]

Serum albuminin değişik pH değerlerindeki tersinir izomerlerine bakıldığında albuminin farklı izomerlere dönüştüğü görülmüştür (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Bovin serum albuminin izomerik formları [46,47]

N formunda F formuna geçilirken yapının çözüldüğü görülmektedir. F formuna baktığımızda viskozitede yükselme, daha düşük çözünürlük ve önemli oranda helisel yapısını kaybeder [48]. pH 4'den daha düşük değerlerde bovin serum albumin molekül içi kuvvetleri kaybederek doğal yapısında genişleme olur. pH 9,0'a baktığımız zaman ise albumin B formuna döner. Eğer pH 9'da albumin çözeltisi düşük iyonik şiddette ve 3°C de 3-4 gün tutulursa diğer bir izomerizmi olan A formuna döner.

Serum albumin ısıtıldığında iki farklı durum ortaya çıkar. Birinci durumda tersinir, ikinci durumda tersinmez yapı olur.

1.2.3. Porfirin - biyomolekül etkileşim çalışmaları

Biyomoleküller ve çeşitli destekler veya adsorbantlar arasındaki etkileşimler ile ilgili araştırmaların biyoteknoloji açısından önemi büyüktür ve bu araştırmalar ilgi çekmektedir. Biyomoleküller ve destekler arasındaki elektrostatik (iyon değişimi), hidrofobik ve afinite etkileşim kuvvetlerinden, biyomoleküllerin ayırımı saflaştırılması yanında biyomoleküllerin desteklere tersinmez adsorpsiyonunda da kullanılabilir [49,50].

Hidrofobik etkileşimlere, van der Waals kuvvetleri ve/veya π - π etkileşimleri sebep olur ve hidrofobik matrikslere bağlanmış hidrofobik ligandlar ile biyomoleküllerin hidrofobik kısımlarının etkileştirilerek proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması gerçekleştirilir [51-54]. Son yıllarda, proteinler ile hidrofobik ligandlar içeren destekler arasındaki hidrofobik etkileşimler deneysel ve teorik olarak araştırılmıştır. Artık çok sayıda protein ayırımı ve saflaştırılması için farklı hidrofobisiteye sahip ile birlikte adsorbant ve ligandlar ticari olarak pazarlanmaktadır.

Düzlemsel makroligandlar olan porfirinlerin ve metalloporfirinlerin, biyomoleküller ile etkileşimleri ve biyomoleküllerde toplanma yatkınlıkları bir çok çalışmanın konusu olmuştur [55- 66]. Porfirinlerin tümör hücrelerinde seçici bir şekilde birikmesi nedeniyle araştırmanın büyük bir kısmı porfirinlerin fotodinamik terapi, magnetik rezonans (MR) ve bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (BSE) terapide kullanılabilirlerinin üzerinedir [67]. Ayrıca porfirinlerin DNA'ya bağlanmaları ile ilgili çalışmalar, kanser çalışmaları açısından önemi büyüktür [63,66]. Özellikle kuaterner amonyum grupları taşıyan bazı katyonik suda çözünür porfirinler sulu çözeltide DNA ile güçlü bir şekilde etkileştikleri belirtilmiştir [58,68].

Bazı biyomoleküllerle birlikte human bovin serum albuminin porfirin ve porfirin benzeri bileşiklerle etkileşimi literatürde verilmiştir [59-61,65,69,70]. Borissevitch ve çalışma arkadaşları meso-tetrakis(4-N-metilpiridinyum)porfirin ve meso-tetrakis(4-sülfonatofenil)porfirinin human ve bovin serum albuminlere bağlanmasını incelemişlerdir. Chatterjee ve Srivastava bovin serum albuminin bir molekülüne meso-tetrakis[4-(karboksimetilenoksi)fenil]porfirin ve meso-

tetrakis[3-(karboksimetilenoksi)fenil]porfirinin 5-8 molekülünün bağlandığını bildirmişlerdir [60]. Suda çözünebilir bu porfirinler BSA'ye iki spesifik bağlandıkları noktada ve bu noktalar triptofan ve tirozin oldukları bildirilmiştir. İlginç bir şekilde bu porfirinler hidrofobik bir amino asit olan fenilalanine bağlanmamaktadırlar. Ding ve arkadaşları hidrofobik protoporfirin ve hidrofilik heptakarboksiporfirinini HAS'e bağlanmasını araştırmışlardır [61].

1.3. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, bir katı veya sıvının sınır yüzeyindeki bir katı, sıvı veya gazın derişimin artması veya azalması olayına denir ve derişimin artması halinde pozitif, azalması halinde ise negatif adsorpsiyon olarak ifade edilir. Pozitif adsorpsiyona, amonyağın kömür üzerine adsorpsiyonu ve negatif adsorpsiyona ise çözücünün adsorplandığı durumlar örnek gösterilebilir [71].

Katı yüzeyinde bir maddeden belli miktar o maddeye adsorplanması, katı yüzeyine bağlı olmakla birlikte ortamın sıcaklığına ve maddenin basıncına veya derişimine de bağlıdır. Yüksek derecede gözenekli katı maddelerin yani adsorbanların adsorpsiyon gücü de yüzey alanındaki artış nedeniyle yüksektir. Adsorpsiyonu oluşturan fiziksel kuvvetler değişik şekilde ortaya çıkan çekim kuvvetleridir [72].

Moleküller ve atomlar adsorban yüzeylerine iki yolla tutunabilirler. Adsorban ile adsorplanan arasında var olan van der Waals etkileşim kuvvetlerinin etkin olduğu adsorpsiyona fiziksel adsorpsiyon denir ve van der Waals etkileşimleri zayıf etkileşimlerdir. [73]. Adsorpsiyon kendiliğinden gerçekleştiğinden yani istemli olduğundan bu esnadaki serbest enerji (entalpi) değişimi yani adsorpsiyon serbest enerjisi ($\Delta G_{\text{adsorpsiyon}}$) eksi işaretlidir. Diğer taraftan, gaz ya da sıvı ortamda daha düzensiz veya kaotik yapıda olan moleküller veya atomlar katı yüzeyine adsorplandıklarında daha düzenli bir yapı oluşturduklarında adsorpsiyon sırasındaki entropi değişimi eksi işaretlidir yani adsorpsiyon entropisi ($\Delta S_{\text{adsorpsiyon}}$) azalır. Adsorpsiyon serbest enerjisi ve adsorpsiyon entropisinin bir adsorpsiyon sürecinde eksi işaretli olması, Eşitlik 1.1 gereğince

$$\Delta H = \Delta G + T \Delta S \quad (1.1)$$

adsorpsiyon sırasındaki entalpi değişiminin yani adsorpsiyon entalpisinin ($\Delta H_{\text{adsorpsiyon}}$) de eksi olmasını gerektirmektedir. Adsorpsiyon ısısı olarak da bilinen adsorpsiyon entalpisinin eksi işaretili olması adsorpsiyon olayının ısı salan yani ekzotermik bir olay olduğunu göstermektedir. Adsorpsiyon ısısının -20 kJmol^{-1} civarında olduğu adsorpsiyona, fiziksel adsorpsiyon veya fizisorpsiyon denir. -200 kJmol^{-1} civarında ısı açığa çıkaran etkileşimler sonucu gerçekleşen adsorpsiyonlara ise kimyasal adsorpsiyon denir [74]. Kimyasal adsorpsiyonda, moleküller veya atomlar genellikle bir kovalent bağ oluşumuyla yüzeye bağlanırlar ve substrat yüzeyinde, koordinasyon sayılarını maksimuma çıkaracak yerler bulmaya çalışırlar. Kimyasal olarak adsorplanmış bir molekül, yüzey atomlarının doymamış değerliklerini karşılamak üzere parçalanabilirler ve kimyasal adsorpsiyonun başka bir deyişle kemisorpsiyonun bir sonucu olarak yüzeyde bu moleküllerden oluşan parçaların var olması, katı yüzeylerin reaksiyonları katalizlemesinin de bir sebebidir [73].

Fiziksel adsorpsiyon genel olarak düşük sıcaklıklarda, kimyasal adsorpsiyon ise yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Sıcaklık arttıkça, fiziksel adsorpsiyon azaldığı için, adsorpsiyon önce azalmakta ve daha sonra kimyasal adsorpsiyonun gerçekleşmesiyle sıcaklıkla birlikte tekrar artmaya başlamaktadır.

Adsorpsiyon olayında, adsorbanın kütlesindeki artma ölçülerek adsorplanan madde miktarına geçilebilir. Büyük ölçüde adsorban ve adsorplanan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olan adsorplanan madde miktarı, gaz ve buhar adsorpsiyonlarında sıcaklık, basınç ve hacim değişkenlerinden birbirinden bağımsız olan herhangi ikisine de bağlıdır. Çözeltilerden adsorpsiyon sırasında adsorplanan madde miktarı ise çözeltinin derişimine bağlıdır.

Adsorban ve adsorplanan madde yanında sıcaklık da sabit tutulduğunda gaz fazından adsorpsiyon yalnızca basınca, çözeltiden adsorpsiyon ise yalnızca derişime bağlıdır. Bu nedenle, adsorplanan madde miktarının basınçla ya da derişimle değişimini veren çizgilere adsorpsiyon izotermi denir.

Adsorban ve adsorplanan madde yanında basınç da sabit tutulduğunda adsorplanan madde miktarı sadece sıcaklığa bağlı olmaktadır. Bu durumda, adsorplanan madde miktarının sıcaklıkla değişimini veren çizgilere adsorpsiyon izobarı denir.

Metaller ve plastikler de dahil olmak üzere bir kristal yapıya sahip olsun veya olmasın tüm katılar az yada çok adsorplama gücüne sahiptirler. Adsorplama gücü yüksek olan doğal katılara kömürler, zeolitler, çeşitli metal filizleri, yapay katılara ise aktif kömür, yapay zeolitler, silikajeller, metal oksitler, katalizörler örnek verilebilir.

Adsorplama gücü yüksek olan katılar deniz süngerini andıran gözenekli bir yapıya sahiptirler. Katıların içinde ve yüzeyinde bulunan boşluk, oyuk, kanal ve çatlaklara genel olarak gözenek denir. Gözenek büyüklüğü 2 nm'den küçük olanlara mikrogözenek, 2 nm ile 50 nm arasında olanlara mezogözenek ve 50 nm'den büyük olanlara ise makrogözenek denir.

Adsorpsiyonda, bir adsorbanın adsorplama kapasitesi o adsorbanın etkinliği konusunda önemli bir göstergedir. Bir gram adsorban yüzeyinin moleküllerce tek tabaka olarak yani monomoleküler olarak kaplanabilmesi için gerekli madde miktarına tek tabaka kapasitesi denir ve genellikle n_m/molg^{-1} ya da $v_m/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ birimi cinsinden verilir. Bu tabakanın alanı adsorbanın bir gramının sahip olduğu alana eşit olarak alınır. Adsorplanan bir molekülün kapladığı alan a ile gösterilirse tek tabakanın ve dolayısıyla bir gram adsorbanın sahip olduğu yüzey alanı (A),

$$A = n.L.a \quad (1.2)$$

bağıntısından bulunur. Burada n , adsorplanan maddenin mol sayısı, L , Avagadro sabitidir ve bulunan A değerine özgül yüzey alanı denir. Molekül alanları literatürden bulunabildiği gibi kinetik gaz kuramından türetilen bağıntılardan da hesaplanabilir. Örneğin, bir azot molekülünün kapladığı alan

$$a = 1,096(M/L\rho)^{2/3} \quad (1.3)$$

bağıntısı kullanılarak bulunabilir. Buradaki M , azot gazının mol kütleini, L , Avagadro sabitini, ρ , azot molekülünün yoğunluğunu gösterir.

Adsorbanın örtülü yüzey kesri olarak Eşitlik 1.4'de

$$\theta = n/n_m = v/v_m \quad (1.4)$$

tanımlanan çıplak yüzey kesri $(1 - \theta)$ olur. Yüzey tek tabaka ile kaplandığında $\theta = 1$ olacağı açıktır. Buradaki n (mol g^{-1}) bir gram adsorbana tutunan maddenin molar miktarı ve v ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) normal koşullarda indirgenmiş hacim denir.

Çok tabakalı adsorpsiyondaki tabaka sayısı yaklaşık olarak n/n_m oranından, bir tabakanın kalınlığı yaklaşık olarak σ çarpışma çapına eşit olduğu varsayılarak adsorpsiyon tabakalarının toplam kalınlığı (t), Eşitlik 1.5'den bulunur [74].

$$t = (n/n_m) \sigma \quad (1.5)$$

eşitliği yardımıyla bulunur.

1.3.1. Adsorpsiyonu etkileyen diğer etmenler

Adsorpsiyon, genellikle adsorban ve adsorplanan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Sıcaklık ve adsorplanan maddenin basıncı ve derişimi yanında adsorban ile adsorplanan arasındaki kimyasal benzerlik de adsorpsiyon derecesini etkilemektedir. Su, silikat üzerine kuvvetle adsorplanmakta, çünkü su molekülleri silisyum atomlarının koordinasyon tabakasına girerek aynı zamanda yüzeydeki oksijen atomları ile hidrojen bağları yapabilmektedir. Aktif kömür, benzeni ve aromatik hidrokarbonları ve diğer organik buharları, suyu adsorpladığından çok daha büyük bir kuvvetle adsorplayabilmektedirler. Genel olarak, birçok $-\text{OH}$ grubu içeren polar mineral adsorplayıcılar, nişasta, selüloz gibi organik maddeler, su ve polar buharları tercihen adsorpladıkları halde, aktif kömür gibi polar olmayan adsorplayıcılar organik buharları daha kuvvetli adsorplarlar.

Kaynama noktası yüksek olan bir sıvı buharının molekülleri, kaynama noktası daha düşük bir sıvı buharının moleküllerinden daha büyük moleküller arası çekim kuvvetlerine sahiptir. Dolayısıyla kaynama noktası büyüdükçe adsorpsiyon da artacaktır. Bu durum, gözenekleri buhar moleküllerini alacak kadar büyük olan bütün adsorplayıcılar için doğrudur.

1.3.2. Hidrofobik etkileşim ile adsorpsiyon ve kromatografi

Hidrofobik etkileşimler sonucu gerçekleşen adsorpsiyon olgusundan yararlanarak özellikle biyomoleküllerin ayırma ve saflaştırılmasında yararlanan bir teknik olan hidrofobik etkileşim kromatografisi gerçekleştirilmiştir.

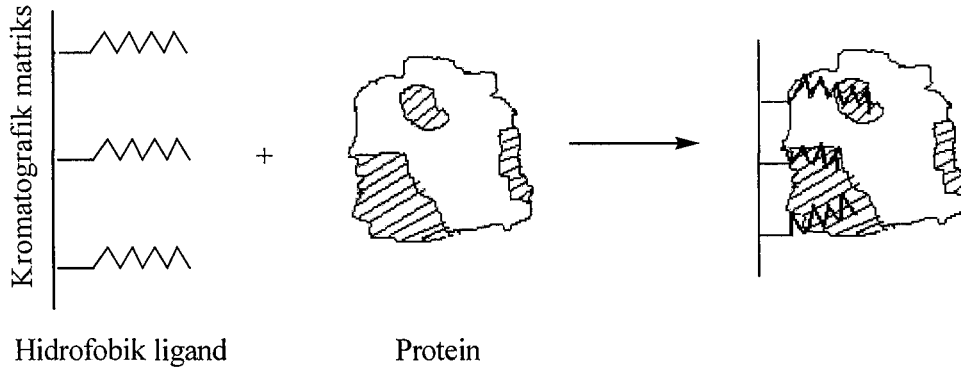
Hidrofobik etkileşim kromatografisi, afinite kromatografisinin uygulamalarından biridir. Gerçekte hidrofobik etkileşim, afinite kromatografisinde karşılaşılan problemlerden birini oluştursa da, aynı zamanda bu etkileşimler bir çok biyomolekülün saflaştırılması içinde bir çözüm olmuştur. Birçok biyomolekül biyoseçici özellikli adsorbanların istenilmese de hidrofobik kısımlarına adsorbanırlar, bu da ayırmada sorun yaratır. Şekil 1.8’de proteinlerde bulunan hidrofobik kısımların hidrofobik ligand ile etkileşimi gösterilmiştir.

Tiselius, aminoasit ve proteinlerin yüksek derişimdeki bazik fosfatlarda nötral katı desteklere bağlandığını göstermiştir ve “salting-out kromatografisi” terimini ilk kullanan kişidir [75]. Ardından, bu kromatografik yöntem için büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Shaltiel ve Er-el bu yöntemi, hidrofobik kromatografi veya hidrofobik afinite kromatografisi olarak tanımlamıştır [76]. Hjerten, zayıf hidrofobik karbonhidrat jel matrikslere proteinlerin tuz aracılığıyla ayrılmalarını anlatabilmek için hidrofobik etkileşim kromatografisi ismini kullanmıştır [77]. Porath ve arkadaşları, bir tampon çözeltisine sodyum klorür veya sodyum fosfat eklenmesiyle, hidrofobik adsorpsiyonun kuvvetlendiğini bulmuşlardır [78]. Bu araştırmacılar, yüksek derişimdeki tuz varlığında gerçekleşen çözünen-adsorban etkileşimlerinin diğer tipleri ve hidrofobik etkileşim kromatografisi için alternatif bir ifade olarak tuz-destekli adsorpsiyon veya tuz-destekli adsorpsiyon kromatografisi isimlerini önermiştir [79]. Böylece Porath, Berna ve arkadaşları tuz-destekli adsorpsiyon kromatografisindeki bu kromatografik teknikleri [80,81]:

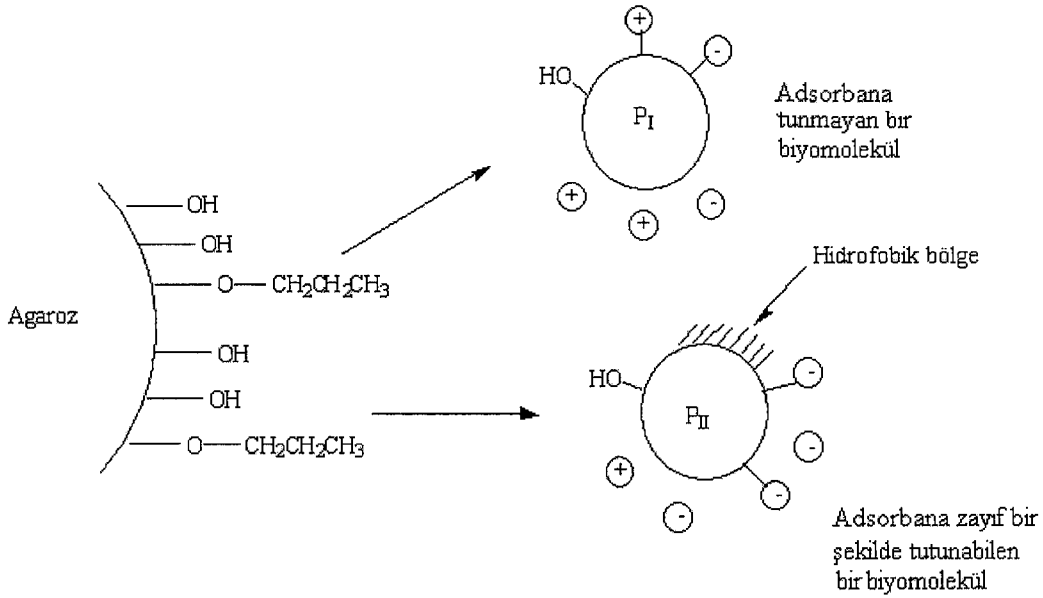
- Tiyofilik adsorpsiyon kromatografisi
- Elektron donör-akseptör kromatografisi
- Hidrofobik etkileşim kromatografisi

olarak yeniden gruplandırmışlardır.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi “gerçek” hidrofobik etkileşim kromatografisi ve “amfifilik” kromatografi olarak iki sınıfa ayrılabilir. İlk sınıfta ayrımlar, desteğe bağlanmış hidrofobik yapılar veya gruplar aracılığıyla gerçekleşir. Diğerinde ise destekte hem hidrofobik hem de hidrofilik yapılar veya gruplar birlikte bulunur. Gerçek hidrofobik kromatografi ile ilgili şematik gösterim Şekil 1.9’de verilmiştir.



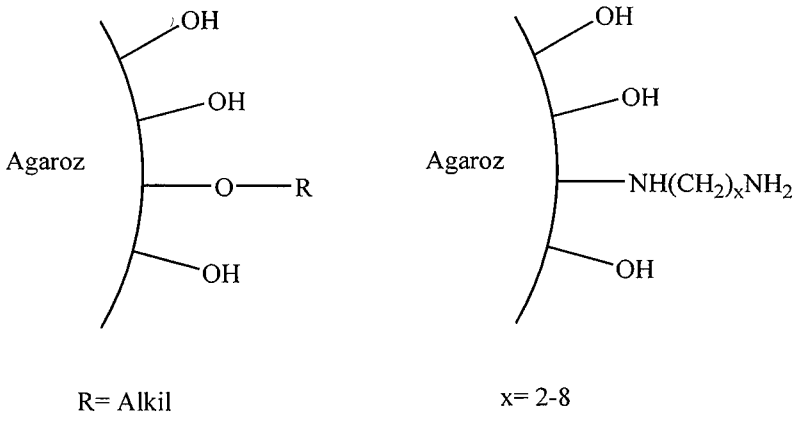
Şekil 1.8. Proteindeki hidrofobik bölgelerin hidrofobik ligand ile etkileşiminin temsili gösterimi
[82]



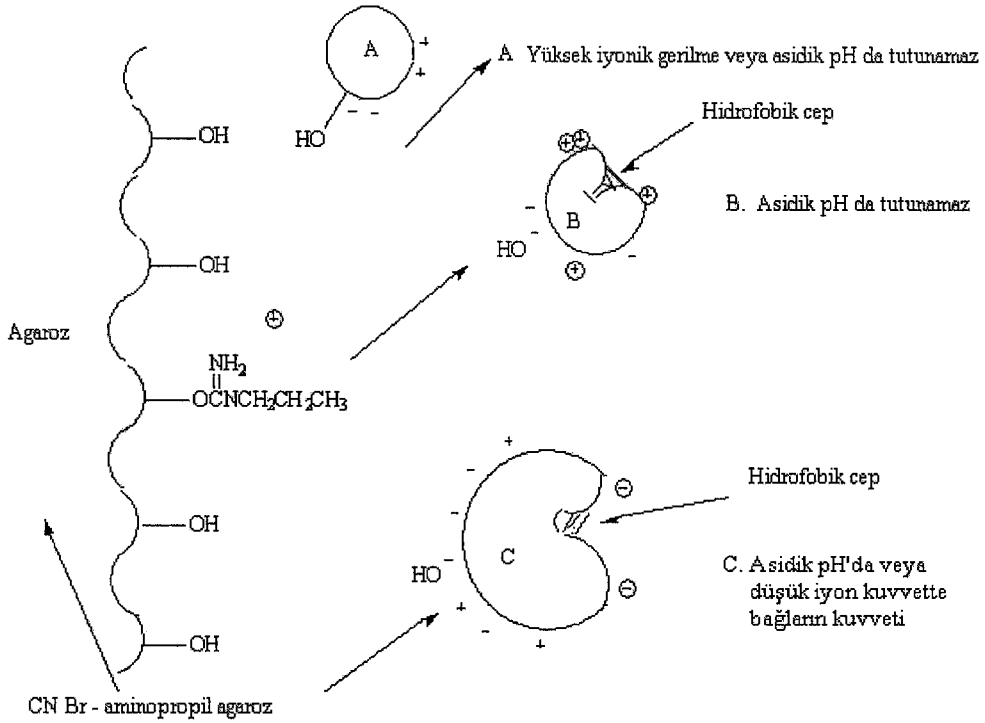
Şekil 1.9. “Gerçek” hidrofobik etkileşim kromatografisi [83]

Şekil 1.9’e göre yüzeyinde hidrofobik bölgelere sahip biyomolekül (P_{II}) adsorban yüzeyine adsorplanır buna karşılık yüzeyinde hidrofobik bölgeler bulunmayan P_I biyomolekül adsorban yüzeyine adsorplanmaz. Bu hidrofobik etkileşim sayesinde iki biyomolekül birbirinden ayrılabilir. Bu amaç için alkil agaroz ve aminoalkil agarozlar uygun kromatografik malzemelerdir (Şekil 1.10).

Buna karşılık iç bölgesi hidrofobik yapıda olmasına rağmen yüzeyi ağırlıklı olarak negatif veya negatif yüklerle yüklenmiş bir biyomolekül “gerçek” hidrofobik kromatografi materyaline adsorplanamaz dolayısıyla ayırımı veya saflaştırılması gerçekleştirilemez. Bu tür biyomoleküllerin siyanobromür izoüre fonksiyonel grupları taşıyan agaroz gibi adsorbanlar kullanılarak ayırımları veya saflaştırılmaları gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.11). Bu amfifilik hidrofobik kromatografi materyali, siyanobromür ile aktifleştirilmiş agaroz ile uygun primer aminin örneğin propilaminin reaksiyonundan elde edilir. Asidik ortamda çalışıldığında yapı amfifilik özellik gösterir.



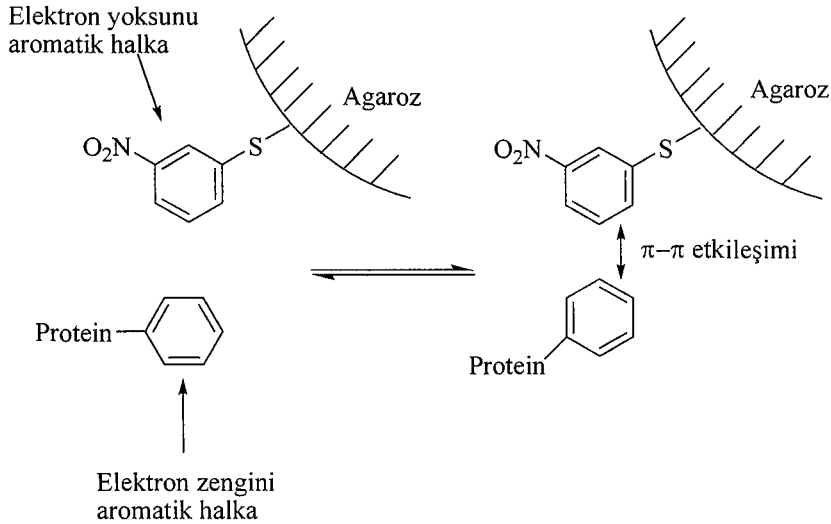
Şekil 1.10. Alkil agaroz ve amino alkil agaroz [83]



Şekil 1.11. Amfifil kromatografisi [83]

Bunlarla birlikte hidrofobik etkileşim kromatografisinin üçüncü bir sınıfı olarak da kabul edilebilecek ve “yük-transfer” ya da “ π - π ” kromatografisi olarak da adlandırılan bir kromatografi daha vardır. Burada alkilhidrofobik ligand yerine tercihen elektron çekici substitüent içeren bir aromatik ligand kullanılmaktadır

(Şekil 1.12). Bu tür kromatografi için dinitrofenil agaroz, fenil agaroz, benzoillenmiş selüloz veya agaroz, nitrofenillenmiş cam kullanılmıştır [77,84,85]. Akriflavin, akridin sarısı, tritil grup, pentaklorofenol, malahit yeşili gibi ligandlarda yük transfer kromatografisinde kullanılan ligandlardır (Şekil 1.13).

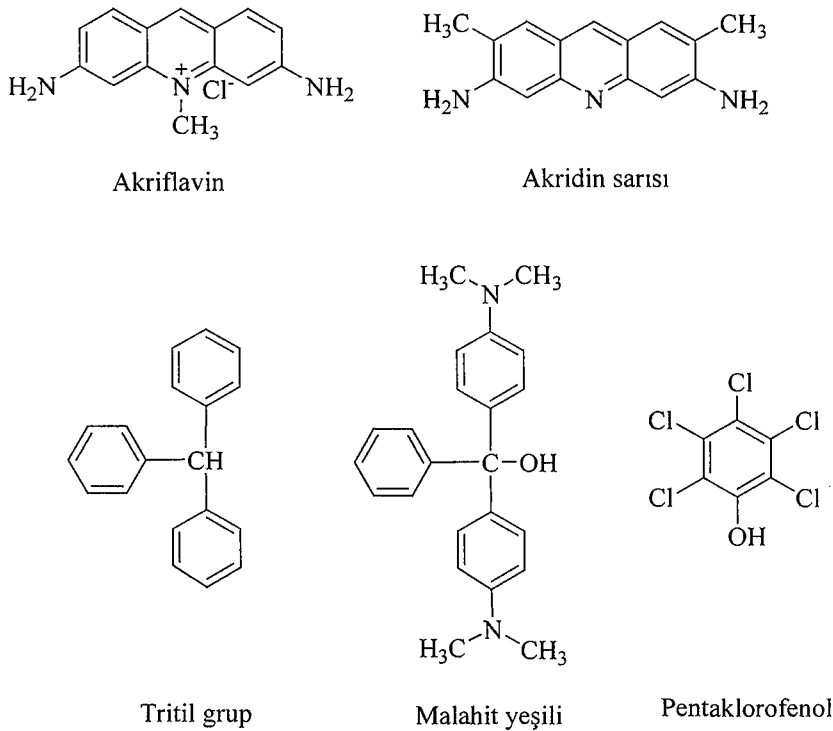


Şekil 1.12. Yük transfer kromatografisinde protein-adsorban etkileşimi [83]

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinleri hidrofobisitelerine dayanarak hidrofobik ligandlar aracılığıyla ayırımını sağlar. Hareketli fazda yüksek tuz derişimi adsorpsiyonu artırır ve taşıyıcı fazın tuz derişiminin azaltılmasıyla eluasyon sağlanır [79,86].

Van Oss ve arkadaşları kompleks mekanizma içermesine rağmen, hidrofobik etkileşimlere en büyük katkıda bulunan faktörün van der Waals kuvvetleri olduğunu belirtmişlerdir [87]. Van der Waals kuvvetlerinin neden olduğu etkileşimlerin afinite, iyon değişimi ve ters-faz kromatografisinde olan etkileşimlerden daha zayıf olması nedeniyle adsorpsiyon-desorpsiyon sürecinde biyomoleküllerde yapısal hasarlar minimum düzeyde olur ve biyolojik aktiviteleri büyük oranda korunur. Ters-faz kromatografisinde kullanılan adsorbanlar HEK de kullanılan adsorbana göre daha apolar karakterlidir. Bu yüzden hidrofobik karakterli proteinler bir ters-faz adsorbanına daha kuvvetli adsorplanırlar. Adsorplanan proteinlerin desorpsiyonu için apolar çözücüler kullanılır ve buda proteinin denatürasyonuna neden olur. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ise

desorpsiyon daha polar ve daha az denatürasyon yapan ortamlarda çalışılan ve proteinlerin hidrofobik özelliklerinin kullanıldığı alternatif bir tekniktir [88].



Şekil 1.13. Yük transfer kromatografisinde kullanılan bazı ligandlar

Son yıllarda, hidrofobik etkileşim kromatografisinde önemli gelişmeler olmuş ve bugün endüstriyel ölçekli protein saflaştırmanın yanısıra laboratuvar ölçekli güçlü bir ayırma tekniği oluşturulmuştur. Bu kromatografi için sabit fazın çeşitliliğinin gelişimi ile serum proteinler, nükleer proteinler, hormonlar, recombinant proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında uygulamalarının kapsamı da artmıştır [89].

1.3.2.1. Protein hidrofobisitesi ve hidrofobik etkileşimler

Hidrofobisite, apolar bir bileşikle su gibi polar bir çevre arasındaki itmedir. Bu terim, genellikle apolar çözünen madde etrafında su moleküllerinin sıralanmasını içeren belli molekül modellerini belirtmek için kullanılır [90]. Apolar bileşikler suya konulduğu zaman, hidrofobik grupları çevreleyen su

moleküllerinin sıralanmasının derecesindeki yüksek artış entropideki azalma ile gözlenir ($\Delta S < 0$). $T\Delta S$ değeri ile entalpi değişikliği karşılaştırıldığında Eşitlik 1.1'e göre, serbest enerjide pozitif değişiklik olur ($\Delta G > 0$) ve bu nedenle bu süreç kendiliğinden oluşmaz yani istemsizdir. Diğer yandan apolar birleşikler suya konulduğunda hidrofobik etkileşimlerden dolayı kendiliğinden bir araya gelirler. Birleşmemiş hidrofobik gruplar etrafında sıralanmış su moleküllerinin, düzenlenmemiş su molekülleri ile yer değiştirmesinden dolayı entropide bir artış gözlenir. Bu serbest enerji değişiminin eksi olduğunu ve sistemin termodinamik olarak uygun olduğunu gösterir. Bir başka deyişle, iki veya daha fazla hidrofobik molekül arasındaki etkileşim kendiliğinden olur ve temelde entropi değişimiyle belirlenir.

Hidrofobik etkileşimler biyolojik sistemlerde çok önemlidir. Proteinlerin katlanmasında ve yapı kararlılığında en baskın kuvvetlerdir ve antibadi-antijen reaksiyonları, enzim-substrat reaksiyonları, biyolojik membranların çift tabaka yağ yapılarının bakımı, korunması gibi diğer biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Bu süreçler hidrofobik etkilerle, kalorimetrik verilerin termodinamik analizlerine göre, oda sıcaklığında önemli entropi ve ısı kapasitesi değişimleriyle oluşurlar [87].

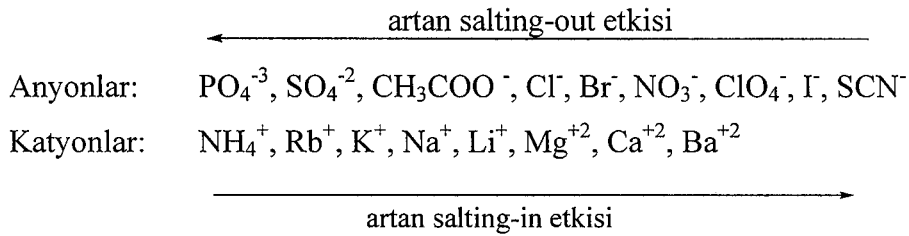
Protein katlanmada hidrofobik etkileşimlerin önemi ilk kez Kauzman tarafından belirtilmiştir [91]. Bundan sonra, spektroskopiyeye ve yüksek ayırmalı diferansiyel taramalı kalorimetri deneylerine dayanan protein çalışmaları, proteinlerin kararlılığı üzerine farklı tuz türlerinin etkilerini ve hidrofobik etkileşimlerin önemini göstermek için yapılmıştır [92-94]. Lizozim, serum albumin gibi çoğu proteinlerin iç kısımları hidrofobik karakterde olmasına karşılık yüzeylerinde de fenilalanin, triptofan, valin gibi apolar amino asitlerin bulunduğu gösterilmiştir [95]. Bir proteinin hidrofobisite derecesi gömülü ve görünen amino asitlerin hidrofobisiteilerinin toplamına bağlıdır. Farklı yaklaşımlara dayanan birçok amino asit hidrofobisite ölçüsü vardır. Nozaki ve Tanford suda ve artan derişimdeki organik çözücülerde ayrı amino asitlerin çözünürlüklerini ölçmüşler [96] ve amino asitler için etanol veya dioksandanda suya serbest enerji transferine dayanan hidrofobisite ölçüsünü oluşturmuşlardır. Bir diğer yaklaşım ise X-ray difraksiyon verilerinden belirlenen proteinlerin sayısından amino asit yan

gruplarının yüzey yerleşimleri ve proteinde gömülü olan amino asitlerin kesri gibi çalışmalara dayanır [97]. Eisenberg ve McLachlan arginin, glutamik asit, lizin gibi ampifilik amino asitler için, her bir atomun hidrofobitesine dayanan bir ölçü önermişlerdir [98]. Wilce ve arkadaşları, ters faz HPLC'de amino asit ve peptitlerin alıkonma zamanlarına ait bir çalışma yayınlamışlardır [99,100].

Hidrofobik aminoasitlerin sayısı, proteinde farklı dağılımları ve hidrofobiteseleri her protein için karakteristiktir. Bundan dolayı, hidrofobik desteklerle veya matrikslerle spesifik ayırma yapılabilir [101]. Bu yüzden, proteinlerin hidrofobiteselerindeki farklılıklar, biyomoleküllerin hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmasıyla fraksiyonlanabilmesini sağlar.

1.3.2.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde alıkonma mekanizması

Hidrofobik etkileşimler üzerine farklı tuzların etkileri sulu çözeltilerden proteinleri çöktürmek için Hofmeister (liotropik) serileriyle ayındır.



Serinin başlangıcındaki tuzlar, hidrofobik etkileşimleri ve protein çökmesini (salting-out etkisi) artırır ve antikaotropik diye isimlendirilirler. Bunlar su düzenleyici olarak ele alınırken serinin sonundaki tuzlar aksine (salting-in veya kaotropik iyonlar) sıvı suyun yapısını rastgele hale getirirler ve bu nedenle hidrofobik etkileşim kuvvetleri azalır [102].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde proteinlerin alıkonma mekanizması oldukça fazla çalışılmış fakat önerilen hiçbir teori genel kabul görmemiştir [86,103-107].

Melander ve arkadaşları [86] hidrofobik etkileşim kromatografisinde alıkonma ve protein çözünürlüğü (salting-out) üzerine nötral tuzların etkileri için

Sinanoğlu ve Abdalnur'un kavite teorisine dayanan termodinamik modeli önermişler [108], her iki süreçteki benzerlikleri göstermişler ve salting-out'teki protein-protein ilişkileri veya hidrofobik etkileşim kromatografisindeki protein-ligand ilişkileri ile tuz derişimi arasındaki miktar ilişkisini belirlemişlerdir. Bu modele göre, çözünen bağlanmasının serbest enerji değişimi, çözünen madde solvasyon prosesleriyle ilgilidir. Solvasyon prosesinde ilk önce, çözünen molekülle aynı boyutlu çözücü içinde bir oyuk (kavite) oluşumunu ele almışlardır. Ardından, çözünenlerin oyuğa girdiğini ve elektrostatik ve van der Waals kuvvetleri ile oyuk çevresiyle etkileştiklerini öne sürmüşlerdir.

HEK'de, sabit fazda oyuk (kavite) oluşumunun enerjisi (ΔG°_{oyuk}) tuz derişiminden yüzey gerilimine ve çözünen molekülünün yüzey alanına (A) bağlıdır (Eşitlik 1.6).

$$\Delta G^{\circ}_{oyuk} = -\Delta A\sigma m + \text{sabit} \quad (1.6)$$

m , molal tuz derişimi, σ , molal yüzey gerilim artışı diye adlandırılan her bir tuzun karakteristik sabitidir.

HEK'de kapasite (alikonma) faktörü k' , çözünen bağlanmasında azalmaya neden olan tuzun elektrostatik etkisinden dolayı tuz derişiminin artmasıyla başlangıçta azalır. Tuz derişimindeki daha fazla artmalarla hidrofobik etkileşimler baskın hale geçer ve k' artar. Yeterli tuz derişiminde $\log k'$ nın tuz molalitesine bağımlılığı

$$\log k' = \Delta A\sigma m + C \quad (1.7)$$

bağıntısıyla verilir ve doğrusal bir değişim gösterir.

Bu nedenle araştırmacılar, HEK'de alikonmaya tuzun etkisini belirlemede, tuz molalitesi ve tuzun molal yüzey artışı en önemli parametreler olarak ele almışlardır. Sabit fazdaki tuz derişiminin artması veya tuzun molal yüzeyinin artması, HEK'de proteinlerin alikonmalarının artmasıyla yüzey gerilimini artırır.

1.3.2.3. HEK'ni etkileyen faktörler

Spesifik uygulamalarda bir kromatografik prosesin başarısını değerlendirmek için sabit faz ve akışkan faz gibi iki temel element dikkate alınır.

Sabit faz ligand tipi, ligand zincirinin uzunluğu, ligand yoğunluğu ve matriksin veya desteğin türüne göre çeşitlilik gösterebilir. HEK için en çok kullanılan ligandlar uç amino gruplu veya doğrusal zincir alkanlardır. Fenil grubu (ve diğer aromatik gruplar) hidrofobik ve aromatik (π - π) etkileşimleri birlikte göstermelerinden dolayı ligand olarak kullanılırlar. Matriks üzerinde süstitüsyon derecesinde, n-alkan ligandlar hidrofobisite ölçeğinde beklenildiği gibi bir seri oluşturur [109]. Hidrofobisite ve etkileşim kuvveti n-alkil zincir uzunluğunun artmasıyla artmakta ancak bu adsorpsiyon seçiciliğinde azalmaya neden olabilmektedir.

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

Lin ve arkadaşları, iki proteinin (tripsinojen ve α -chy-matripsinojen) adsorpsiyon entalpileri için sabit ligand yoğunluğunda CM-oktil-sepharoz ile elde edilen değerlerin CM-butil-sepharozla elde edilen değerlerden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [107]. Ligand zincir uzunluğunun artmasından dolayı adsorpsiyon entalpisinde oluşan farkı, adsorbanın dehidrasyonu için gereken ısı farkları ile kanıtlanmıştır.

Bir HEK adsorbanındaki ligandın süstitüsyon derecesindeki artış, protein ve ligand arasındaki etkileşim sayısını arttırdığından HEK adsorbanının protein bağlama kapasitesinde artışa neden olur [110]. Bazen bu durumlarda, proteinin desorpsiyonu için sert eluasyon koşullarının (organik çözücüler, deterjanlar veya kaotropik ajanlar) kullanılmasından dolayı bağlanan proteinlerin denatürasyonsuz eluasyonu zor olabilmektedir. Ligand yoğunluğu ile protein alıkonması ilişkisinde, protein yüzey hidrofobisitesi en etkili faktör olarak ele alınmasına rağmen bu ilişki proteinin boyutuna da bağlıdır. Jennissen ve Heilmeyer, kritik alkil grup yoğunluğunda, hidrofobik agaroz proteinlerin adsorpsiyonunun

oluşturduğunu ve bunun desteğini hidrofobitesine bağlı olduğunu kanıtlamışlardır [84].

HEK de en çok kullanılan destekler hidrofilik karbonhidratlar (çapraz bağlı agaroz), silika veya sentetik kopolimer malzemelerdir. Aynı tür ligand kullanarak sabit fazın seçiciliği farklı tip desteklerle değiştirilebilmektedir.

1.3.2.4. HEK’de adsorpsiyona tuz türü ve derişiminin etkisi

Yukarıda belirtildiği gibi protein alıkonmasına tuz bileşiminin etkisi lyotropik seride verilen tuz sırasını takip eder. Sodyum, potasyum ve amonyum sülfatlar gibi tuzlar, yüksek salting-out veya molal yüzey gerilimi artırma etkilerinden dolayı, protein-ligand etkileşimlerini artıran en etkili tuzlardır. Ancak magnezyum sülfat ve magnezyum klorür suyun yüzey gerilimini artırmalarına rağmen yukarıda belirtilen tuzlar gibi protein alıkonmasını artırmazlar. Bu durum protein alıkonmasındaki tuz bileşim etkisinin çok kompleks bir durum olduğunu gösterir.

Aynı zamanda tuz derişimi protein adsorpsiyonunun seçiciliğini etkiler ve bu etki sabit faza ve tuz tamponuna bağlıdır ve farklıdır [111]. HEK’de denge tamponu üzerine yüksek tuz derişimi kullanımı ligand-protein hidrofobik etkileşimlerini arttırır ve sonuç olarak da protein alıkonmasını artırır. Adsorplanmış proteinler eluentteki tuz derişiminin azaltılmasıyla adım adım eluasyonla ayrılır.

1.3.2.5. HEK’de adsorpsiyon üzerine pH etkisi

Hareketli fazın pH’ı HEK’de protein alıkonmasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir [112]. Genelde pH deki artış (9-10 üzeri), protein yükündeki değişime ve hidrofilisinde artmaya neden olduğundan proteinlerle hidrofobik ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimler pH artışı ile azalır. Ancak Hjerten ve arkadaşları düşük pH’da lizozim ve sitokrom-c gibi temel proteinlerin hidrofobik ligandlara zayıfça bağlandığını gözlemişlerdir [113].

1.3.2.6. HEK’de adsorpsiyon üzerine sıcaklığın etkisi

HEK’de sıcaklığın artması protein alıkonmasını artırır ve düşük sıcaklıkta genellikle protein eluasyonu oluşur. Aslında, HEK önceden de belirtildiği gibi entropi sürücülü bir süreçtir. ΔH küçük pozitif veya negatif değerlerde olabildiğinden dolayı $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ eşitliğine göre ΔG pozitif entropi değişimiyle kontrol edilir.

Ancak sıcaklığın sulu çözeltilerde proteinlerin çözünürlüklerini ve farklı proteinlerin konformasyonel durumuna etkilerinden dolayı protein alıkonmasında zıt davranışlar oluşabilir. HEK’de sıcaklığın rolünün çok basit olmasına rağmen bu parametre denatürasyon olmaksızın uygun şartlar altında proteinlerin ayırma ve eluasyonu için zayıf etkileşimleri oluşturmak için kullanılabilirler [88].

1.3.2.7. HEK’de kullanılan sabit fazlar

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde agaroz en çok kullanılan destektir, ancak selüloz, dekstran ve silikada destek olarak kullanılmıştır.

İlk HEK amaçlı adsorbanlar alifatik ve aromatik aminlerin siyonojen bromür metoduyla çapraz bağlanmış agarozla bağlanmasının sonucu elde edilmiştir ve hem hidrofobik hem de iyonik karakter sergilerler [112,114-116]. Böylece bu sabit fazlarla kromatografik ayırma proteinlerle sabit faz arasındaki hem elektrostatik hem de hidrofobik etkileşimlerle olur.

İlk gerçek anlamda HEK adsorbanları apolar amino asitlerin inert bir matrikse bağlanması ile elde edilmiştir [117]. Porath ve arkadaşları, Hjerten ve arkadaşları ise yüksüz hidrofobik adsorbanları ilk sentezleyenler olmuşlardır [78,110]. Hjerten bugün oktil ve fenil sepharoz jellerinin ticari olarak üretiminde kullanılan bu grupları glisidil eterlere (epoksit, oksiran fonksiyonel grupları ile) bağlama yöntemini geliştirmiştir. Bu şekilde üretilen jeller nötraldir ve insan plazması proteinleri ile temelde hidrofobik etkileşimler gösterirler [110].

Bir başka yüksüz adsorban ise agarozun bisepoksit (1,4-bütandiol diglisidileter) ile aktivasyonu ve ardından buna alkilmerkaptan ile bağlanması ile sentezlenmiştir. Bir diğer sentez yönteminde ise agaroz

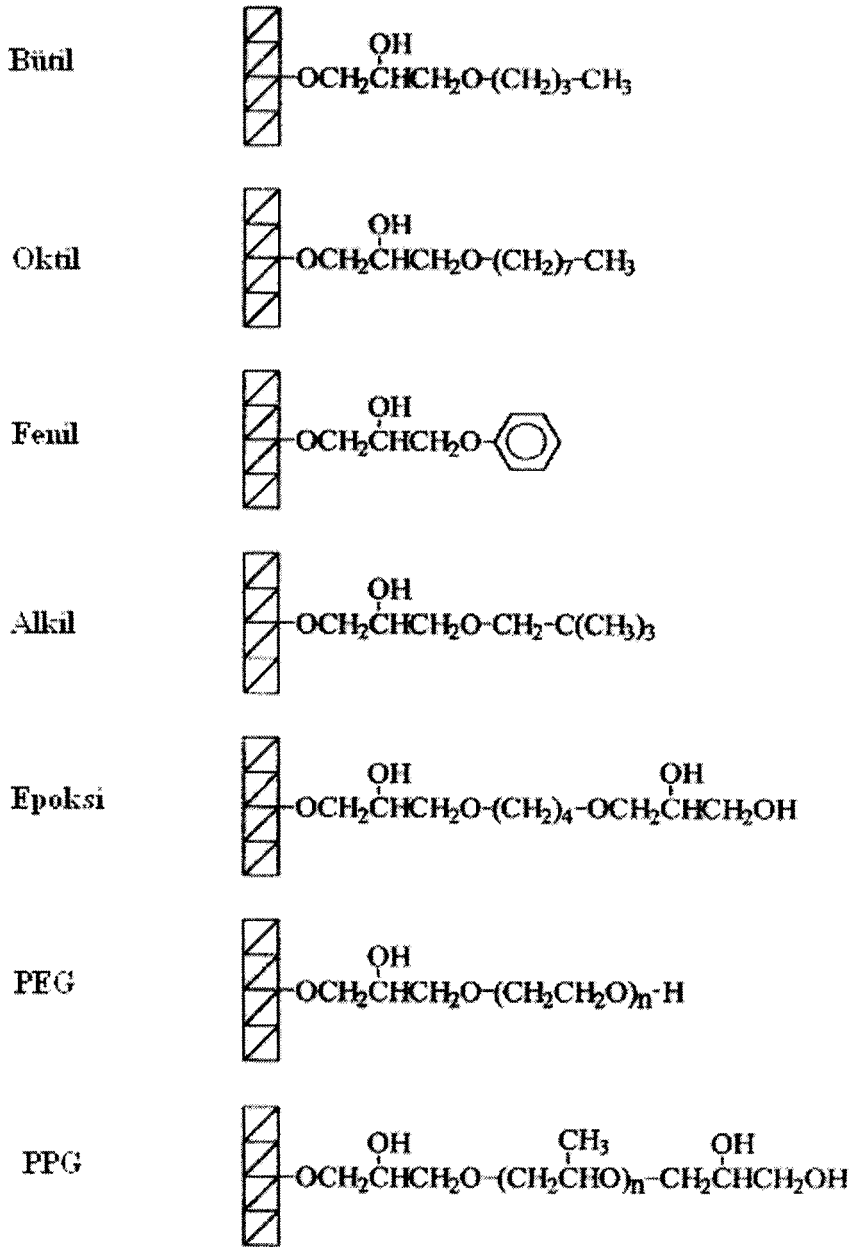
glisidoksipropiltrimetoksisilan ile aktive edilmiş ve bu yapı ile alkol reaksiyona sokulmuştur [113]. Bu son iki yöntem ile proteinlere daha kolay ulaşabilecek ara kollu ligandları olan yüksüz adsorban üretilenmiştir.

Yüksek basınçta kullanılacak HEK adsorbanları için polimerik silika temelli rijit destekler hazırlanmış ve bunlar bütil, fenil, polieter gruplarıyla modifiye edilmişlerdir. Kato ve arkadaşları bugün ticari olarak pazarlanan TSK-gel, Phenyl-5PW ve TSK-gel Eter-5PW ticari isimli hidrofobik polimer bazlı jelleri hazırlamışlardır [118]. Gooding ve arkadaşları metil, hidroksipropil, propil, benzil veya pentil gruplarını içeren silika bazlı hidrofobik sabit fazları sentezlemişlerdir [119].

Hjerten ve arkadaşları HPLC nde kullanılmak üzere rijit yüksek çapraz bağlı agaroz temelli HEK adsorbanı sentezlemişlerdir [113]. Ayrıca rijit 2-hidroksietil metakrilat etilen dimetakrilat kopolimerleri HEK-HPLC uygulamalarında kullanılmıştır [120].

Bugün farklı özellikte bir çok HEK adsorbanı ticari olarak satılmakta ve bunların bir kısmını içeren liste Queros'un derlemesinde verilmiştir [121]

Daha öncede belirtildiği gibi HEK'de en çok kullanılan ligandlar, düz zincirli alkanlar ve basit aromatik gruplardır. Bunlara örnekler Şekil 1.14 de verilmiştir. Yinede bu hidrofobik ligandlar proteinlerin tersinmez adsorpsiyonuna neden olabilmekte veya proteinlerin eluasyonları sırasında denatüre olmalarına yol açabilecek kuvvetli hidrofobik etkileşimler oluşturabilmektedir.



Şekil 1.14. HEK’de kullanılan bazı ligandların şematik yapıları

1.4. Polimer Sentezi

Polimerler çok sayıda aynı veya farklı atomik grupların kimyasal bağlarla, az yada çok düzenli biçimde bağlanarak oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı yapılardır.

Polimerik yapıyı yani polimerik zinciri oluşturabilmek için gerekli kovalent bağlar monomer yapısına bağlı olarak ya katılma polimerizasyonu ile ya da basamaklı polimerizasyon ile oluşturulabilir. Bu sentez yöntemleri kullanılarak polimerler proses açısından dört şekilde üretilebilir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- a) Kütle (yığın veya blok) polimerizasyonu
- b) Çözelti polimerizasyonu
- c) Süspansiyon polimerizasyonu
- d) Emülsiyon polimerizasyonu

1.4.1. Süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile polimer sentezi

Bu polimerizasyon yöntemi endüstride kesikli veya sürekli sistemlerde büyük miktarlarda polimer üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polimerizasyon sonucu polimerizasyon koşullarına bağlı olarak 10 µm ile 10 mm aralığında, gözenekli veya gözeneksiz partiküller elde edilir. Polimer taneciklerinin küresel yapısı nedeniyle süspansiyon polimerizasyonuna boncuk ya da inci polimerizasyonu da denir. Süspansiyon polimerizasyonun da iki faz vardır. Bu fazlardan biri monomer fazı diğeri dağıtma veya devamlı fazıdır. Dağıtma fazı olarak genellikle su kullanılır.

Bir polimer süspansiyon polimerizasyonu ile üretilecek ise dikkat edilmesi gereken ilk özellik monomerin dağıtma fazındaki çözünürlüğüdür. Monomerin, dağıtma fazındaki çözünürlüğünün çok düşük olması gerekir. Bu amaçla hidrofilik monomerler için dağıtma fazı olarak yağ ve petrol eteri gibi hidrofobik sıvılar kullanılır. Reaksiyon ortamı süspansiyon olacak şekilde sürekli karıştırılır. Dağıtma ortamında çözünen süspansiyon stabilizörleri ve emülsifiye edicilerle süspansiyonun kararlılığı desteklenir. Reaksiyon başlatıcısı olarak monomer

damlacıkları içinde yani organik ortamda çözünen bir başlatıcı seçilir ve böylece polimerizasyon, monomer damlacıkları içinde başlar. Polimerizasyon reaksiyonunun hızı ortamın sıcaklığı artırılarak artırılır ve monomer damlacıklarının küresel polimer tanecikleri haline dönüşmesi sağlanır. Süspansiyon polimerizasyonunda sistem parametrelerinin ayarlanması ile istenilen boyutlarda polimer tanecikleri eldesi gerçekleştirilebilir.

Süspansiyon polimerizasyon prosesi temel olarak uygun bir ortam içinde yürütülen kütle polimerizasyonundan başka bir şey değildir. Her monomer damlacığı yeterli başlatıcı içerir ve ısıtılınca diğerlerinden bağımsız olarak polimerleşirler. Burada reaksiyon hızı kütle polimerizasyonuna göre daha hızlıdır. Sonlanma ve zincir transferi yavaş olduğundan daha büyük molekül ağırlıklarına ulaşılır. Kütle prosesine göre bu prosesin en önemli avantajı düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolünün mükemmel olmasıdır. Ayrıca dağıtma ortamı olarak kullanılan su ucuzdur ve suyun patlama, yanma ve toksisite gibi yan etkileri yoktur.

Süspansiyon polimerizasyonunda polimerizasyon esnasında dikkat edilmesi gereken en önemli husus polimer yığılmasını (topaklanmasını) önlemektir. Süspansiyon polimerizasyonunda yığılma ve birleşmeyi önlemek için alınması gerekli ilk önlem polimerizasyon esnasında yeterli ve düzenli karıştırma hızı sağlanmasıdır. Düzenli karıştırma sadece yığılmayı önlemez, aynı zamanda tanecik boy ve boy dağılımını belirler. Ayrıca iyi karıştırma ile iyi sıcaklık kontrolü yapılabilir ve böylece polimerik mikrokürelerin molekül ağırlığı da daha iyi ayarlanabilir.

Ek olarak süspansiyon polimerizasyonunda yığılma ve birleşmeyi engelleyebilmek ve polimerizasyon basamağını kontrol etmek için ortama stabilizörler ve benzeri katkı maddeleri de ilave edilir. İlk zamanlar süspansiyon stabilizörleri olarak suda çözünen yüksek molekül ağırlıklı polimerler (polivinilalkol PVA) kullanılmıştır. PVA monomer su ara yüzeyini azaltarak süspansiyonu karalı hale getirir. Bu stabilizörlere sonradan yeni yüzey aktif maddeler ilave edilmiştir. Günümüzde jelatin, stiren-malaik asit anhidrit tuzu, talk, kaolin, bentonit, baryum, kalsiyum ve magnezyum karbonatlar, şilikatlar,

fosfat ve sülfatlar, alüminyum hidroksit gibi birçok madde değişik ortamlarda dağıtıcı ve stabilizör olarak kullanılmaktadır.

Ortama tuz (NaCl) ilavesinin de, monomer çözünürlüğünü azaltarak daha küçük boyda polimer taneciklerinin elde edilmesine yol açtığı bulunmuştur. Ancak fazla tuz miktarı süspansiyonu bozmaktadır [122].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Benzaldehit (Merck), 4-nitrobenzaldehit (Merck), pirol (Merck), metakriloil klorür (Merck), akrilamid (Merck), etilen glikoldimetakrilat (EDMA, Merck), bovin serum albumin (BSA, Sigma), Bradford reaktifi (Sigma), kalay klorür dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck), 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon (Merck), bortrifloretarat (Sigma), HNO_3 (%65'lik, Riedel), propiyonik asit (Riedel), N,N-dimetil formamid (Riedel), piridin (Merck), HCl (%37'lik, Riedel), NH_4OH (%26'lik, Riedel), metanol (Aldrich), diklorometan (Riedel), kloroform (Riedel), tetrahidrofuran (THF, Riedel), Na_2SO_4 (Riedel), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), etil alkol (Carlo Erba), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Riedel) ve NaCl (Riedel) satın alınarak deneylerde kullanılmıştır. Preparatif amaçlı ince tabaka kromatografisi için 5-40 μm parçacık boyutlu silika jel 60 GF₂₅₄ (Merck) ile kaplanmış 20x20 cm boyutunda cam plakalar kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan diğer çözücüler ve kimyasal maddeler analitik saflıkta olup çözeltiler saf su veya deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

2.2. Analizler ve Aletli Analizler

Monomerlerin ve adsorplanmayan BSA miktar analizi için görünür bölge spektrumları Shimadzu UV 2101 PC UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometresi ile alınmıştır. Hazırlanan monomerlerin, tetrafenilporfirin ligandı içeren polimerik mikrokürelerin ve bu ligandı içermeyen polimerik mikrokürelerin FTIR spektrumları JASCO FT/IR-300E cihazı ile alınmıştır. Alınan bütün spektrumlara 5 noktali temel çizgi düzeltmesi uygulanmıştır. Proton NMR spektrumları Bruker DPX-400 400 MHz High Performance Digital FT-NMR Spektrometre (TÜBİTAK) cihazı ile alınmıştır. Polimerik mikrokürelerin yüzey görüntüleri için CAM SCAN S4 taramalı elektron mikroskopu (A.Ü. Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü) kullanılmıştır. Işık mikroskopu fotoğrafları LEICA DM L52 mikroskopu ve fotoğraflarda Canon Power Shot S50 dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır. pH ölçümleri Orion 420 A model pH ion

metre ile yapılmıştır. Reaksiyonlar manyetik ısıtıcı (IKA RTC) ve/veya kuş yuvası (Thermolyne, Type 45500 Input Control) kullanılarak yürütülmüştür. Deneylerde süzme işlemleri 4 numaralı Gooch krozesi kullanılarak yapılmış ve deneylerde laboratuvarında bulunan diğer araç ve gereçler kullanılmıştır.

2.3. Tetrafenilporfirin Ligandı Bağlanmış Mikrokürelerin Sentezi

2.3.1. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi

2.3.1.1. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi

5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin gerekli miktarda sentezini gerçekleştirebilmek için literatürdeki çalışmalardan yararlanılarak 3 yöntem sırayla denenmiştir. Birinci ve ikinci olarak denenilen yöntemler sonucu 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin istenilen miktarlarda sentezlenememiştir. Bu üç yöntem aşağıda verilmiştir.

Yöntem 1: 5,10,15,20-Tetrafenilporfirinin (H_2TPP) yapısındaki fenil gruplarının derişik HNO_3 ile nitrolanması 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi için denenilen ilk yöntem olmuştur. Literatürde bu porfirinin bu yöntemle sentezi için dumanlı HNO_3 kullanılmaktadır [123]. Bu çalışmada H_2TPP (200 mg, 0,325 mmol) 50 ml kloroformda çözülmüş ve ortamın sıcaklığı buz banyosu ile $0-5^\circ C$ ye indirildikten sonra derişik HNO_3 (0,34 g, 5,4 mmol) ortama damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği ince tabaka kromatografisi ile izlenmiş ve 3 saatlik reaksiyon süresi sonunda H_2TPP 'de herhangi bir nitrolanmanın gerçekleşmediği gözlenmiştir. Nitrolama reaksiyonu oda sıcaklığında ve daha yüksek sıcaklıklarda yürütüldüğünde ise nitrolama gerçekleşmiş ancak reaksiyonun hızlı yürümesi nedeniyle ürün tek nitrolu yapıdan çok iki, üç, dört nitrolu yapılardan oluşmuştur. Tek nitrolu yapı veriminin %1'den düşük gerçekleşmesi nedeniyle 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi için bir başka yöntem başvurulmuştur.

Yöntem 2: 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezini gerçekleştirmek için denenilen ikinci yöntem Adler yöntemi olmuştur [4]. Üç boyunlu dibi yuvarlak 250 ml lik deney balonundaki 80 ml propiyonik asite ilk önce 3:1 mol oranında benzaldehit (2,53 g, 24 mmol) ve 4-nitrobenzaldehit (1,21

g, 8 mmol) konmuş ve karışım refluks haline getirilmiştir. Propiyonik asitin normal kaynama sıcaklığı 141°C'dir. Daha sonra refluks halindeki çözeltiliye 10 ml propiyonik asitte hazırlanmış pirol (2,15 g, 32 mmol) çözeltisi damla damla 30 dakika sürede ilave edilmiş ve karışımın 30 dakika daha refluks olması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan karışımdan kristallenerek ayrılan farklı sayıda nitro grubu içeren ve nitrolanmamış altı tip porfirin ile bazı safsızlıklar 4 nolu Gooch krozesinden süzülerek ortamdaki kalıntı alınmıştır. Daha sonra krozedeki kalıntı metanol ile birkaç kez yıkanmış, sonra sıcak su ile berrak çözeltiliye kadar yıkamaya devam edilerek safsızlıklardan mümkün olduğu kadar arındırılmaya çalışılmıştır. Krozede geriye kalan kalıntı vakum etüvünde 40 °C de kurutulduktan sonra kloroform da çözülmüş ve tekrar süzülerek bu kez kloroformda çözünmeyen safsızlıklardan arındırılmıştır. Süzüntünün çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan kalıntıdaki altı farklı yapıda porfirin ile bir miktar safsızlık 20x20 cm boyutunda silika jel kaplı plakalar ve yürütücü olarak kloroform kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi ile birbirlerinden ayrılmışlardır. Sentezi hedeflenen 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirine ait ve en yüksek ikinci R_f değerine sahip band plakadan kazınarak alınmıştır. Silikaya adsorplanmış 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin kloroform ile yıkanarak silikadan arındırılmış, çözücü uçurulduktan sonra 80 °C de etüvde kurutulmuştur. Bu yöntemle elde edilen 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin miktarının da çok az olduğu ve veriminin %1'den düşük olduğu görülmüştür.

Yöntem 3: Lindsey yöntemi [6] izlenerek yapılan 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezinde iki boyunlu dibi yuvarlak 500 mililitrelik bir deney balonuna yeni distillenmiş CHCl₃ (200 ml) konulduktan sonra sırayla balona 3:1 mol oranında benzaldehit (506 mg, 4,8 mmol), 4-nitrobenzaldehit (242 mg, 1,6 mmol) ile pirol (0,428 g, 6,4 mmol) ve bortriflorüretat (0,30 g, 2,1 mmol) ilave edilmiştir. Çözelti önce iki saat oda sıcaklığında azot atmosferi altında karıştırılmış, ardından su banyosunda 40°C ye kadar ısıtılıp 5 saat daha karıştırıldıktan sonra kendi halinde bir gece bırakılmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan porfirinojeni porfirine dönüştürmek için çözeltiliye 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon (1,25 g, 5,08 mmol) ilave edilmiş ve karışım bir saat refluks

edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuş karışımdan alınan örneğin ince tabaka kromatografisi ile yapılan kontrolünde 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin olduğu görülmüştür. Reaksiyon karışımındaki çözücü kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra geriye kalan katı madde az miktarda metanolde çözülerek Gooch krozesinden süzölmüştür. Krozede kalan madde sıcak su ile üç kez yıkanmış, tekrar kloroformda çözülerek Gooch krozesinden alınmıştır. Bu şekilde metanol ve kloroformda çözünmeyen safsızlıklar ürün porfirinlerden ayrılmıştır. Elde edilen farklı sayıda ve konumda nitro grubu içeren ve nitro grubu içermeyen porfirinlerden hedeflenen 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin saf olarak eldesi yöntem 2 de anlatılan şekilde İTK ile yapılmıştır. Elde edilen mononitrolu porfirinin 25 mg geldiği ve verimin %2,5 olduğu bulunmuş ve spektral değerlerinin literatürdeki verilere uyduğu gözlenmiştir. Daha sonra bu yöntem kullanılarak altı kez daha 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi gerçekleştirilmiştir. R_f değeri (silikajel, $CHCl_3$) 0,8, UV (λ_{max} , $CHCl_3$) 422nm, 514nm, 553nm, 592nm ve 649nm; IR (KBr, cm^{-1}) 3423 (NH gerilme), 3037-2921 (aromatik CH), 1720-1579 (NO_2 asimetric gerilme); 1471- 1328 (NO_2 simetric gerilme); 1H NMR ($CDCl_3$, δ ppm) -2,7 (s, 2H, pirol NH), 7,8 (m, 9H, m/p-fenil), 8,26 (d, 6H, o-fenil), 8,42 (d, 2H, nitrofenil), 8,66 (d, 2H, nitrofenil), 8,76 (d, 2H, β pirol, 3 ve 7 CH), 8,80 (s, 4H, β pirol, 12, 13, 17 ve 18 CH), 8,95 (d, 2H, β pirol, 2 ve 8 CH).

2.3.1.2. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin sentezi

Sentez, kısım 2.3.1.1 de sentezlenmiş olan 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirindeki nitro grubunun amin grubuna indirgenmesi ile gerçekleştirilmiş ve bunun için literatürde verilen bir yöntemden yararlanılmıştır [124]. Dibi yuvarlak iki boyunlu bir deney balonuna oda sıcaklığında 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (100 mg, 0,152 mmol) ve HCl (%20 lik, 25 ml) konulmuştur. Ardından balona $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,5 g) ilave edilmiş ve karışım 25 dakika su banyosunda $40^\circ C$ de karıştırılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan karışıma 10 ml derişik NH_4OH ilave edilerek ortamda bulunan HCl asit nötrleştirilmiştir. İndirgenmiş porfirin sulu ortamdaki kloroform ile ekstre edilmiş ve ekstraksiyon

işlemi birkaç kez tekrar edilmiştir. Ekstratın çözücüsü kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra geriye kalan katı seyreltik NH_4OH ve su ile birkaç kez yıkanmıştır. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin saflaştırılması preparatif ince tabaka kromatografisi ile 20x20 cm boyutunda silika jel kaplı cam plakalar ve kloroform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İTK plakasında 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirine ait band plakadan kazınarak alınmış ardından silikaya adsorplanmış bu porfirin kloroform ile yıkanarak silika jelden ayrılmıştır. Çözücü kloroform rotary evaporatörde uçurulmuş ve kalan madde 80 °C de etüvde kurutulmuştur. Tartılan 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin 80 mg geldiği ve verimin %84 olduğu bulunmuştur. Yeteri kadar 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin elde etmek için indirgenme reaksiyonu birkaç kez tekrar edilmiştir. R_f değeri (silikajel, CHCl_3) 0,45; UV (λ_{max} , CHCl_3) 421nm, 516nm, 553nm, 591nm, 644nm; IR (KBr, cm^{-1}) 3453 (NH gerilme, pirol), 3369, 3315 (NH_2 gerilmesi), 3035, 2915 (aromatik CH gerilme), 1602 (NH_2 bükülme); ^1H NMR (CDCl_3 δ ppm) -2,7 (s, 2H, pirol NH), 4,0 (s, 2H, NH_2), 6,9 (d, 2H, aminofenil), 7,78 (m, 9H, m/p-fenil), 8,0 (m, 2H, aminofenil), 8,24 (d, 6H, o-fenil), 8,7 (m, 6H, β pirol) ve 8,85 (m, 2H, β pirol).

2.3.1.3. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi

Kısım 2.3.1.2 de elde edilen 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirine monomer özelliği kazandırmak için metakriloil klorür ile reaksiyona sokularak 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin hazırlanmıştır. Bu reaksiyon literatürde verilen yöntemle benzer şekilde yapılmıştır [124]. Dibi yuvarlak 100 ml lik iki boyunlu bir deney balonuna 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (150 mg, 0,239 mmol), tetrahidrofuran (10 ml) ve piridin (2 ml) konulduktan sonra ortamın sıcaklığı bir buz banyosu yardımıyla 0-5°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney balonundaki çözeltiye metakriloil klorür (1 ml) damla damla bu sıcaklık aralığında 30 dakika sürede ilave edilmiş ve daha sonra deney balonu oda sıcaklığında iki saat daha karıştırılmıştır. Çözücü rotary evaporatöründe uçurulduktan sonra balona 100 ml kloroform ilave edilmiş ve reaksiyon sırasında ortamda oluşan HCl asit ortama seyreltik NH_4OH (50 ml) ilave edilerek

nötralleştirilmiştir. Ayırma hunisi yardımı ile ürünü içeren kloroform faz ayrılmış ve kloroform ile ekstraksiyon iki kez daha tekrarlanmıştır. Kloroform rotary evaporatöründe uçurulduktan sonra 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin preparatif ince tabaka kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin 140 mg gelmiş ve verimin %91 olduğu bulunmuştur. R_f değeri (silikajel, CHCl_3) 0,40; UV (λ_{max} , CHCl_3) 423nm, 516nm, 553nm, 592nm, 650nm; IR (KBr, cm^{-1}) 3315 (NH gerilme sekonder amid), 3037 (aromatik CH gerilme), 2933 (alifatik CH gerilme), 1670 (C=O gerilme), 1590 (NH bükülme), 1508 (vinilik C=C); ^1H NMR (CDCl_3 , δ ppm) -2,7 (s, 2H, pirol NH), 5,5-6,0 (m, 5H vinil), 7,8 (d, 9H, m/p-fenil), 8,0 (m, 2H, 4-amidofenil), 8,3 (d, 6H, o-fenil), 8,7 (m, 6H, β pirol) ve 8,8 (m, 6H, β pirol).

2.3.2. Tetrafenilporfirin ligandlı polimerik mikrokürelerin sentezi

Tetrafenilporfirin ligandı içeren gözenekli polimerik mikrokürelerin sentezi için iki farklı süspansiyon polimerizasyon reçetesi kullanılmış ve bileşimi farklı birçok mikroküre sentezlenmiştir.

Polimerizasyon 1: Bu polimerizasyon için literatürde verilen yöntemlerden yararlanılmıştır [17,124-129]. 100 ml'lik iki boyunlu deney balonuna saf su (50 ml) ve stabilizatör poli(vinil alkol) (PVA, 0,2 g) ilave edilmiş ve bu karışım PVA tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Ardından karıştırılmakta olan bu ortama sırasıyla gözenek yapıcı olarak toluen (10 ml), 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (73,4 mg, 0,1 mmol), akrilamid (0,28 g, 3,9 mmol) ve çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldimetakrilat (EDMA, 1,19 g, 6,0 mmol) ilave edilmiş ve oluşan süspansiyon azot gazı atmosferi altında 65°C ye ısıtılmıştır. Sıcaklık bu değere ulaştınca ortama 2,2-azobisisobütironitril (AIBN, 0,1 g) ilave edilerek polimerizasyon başlatılmıştır. Polimerizasyon süresince karışım 600 devir/dakikada 4 saat karıştırılmış ve ardından ortam sıcaklığı 90°C ye çıkarılarak 2 saat daha karıştırılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan karışımda dağıtma ortamı dekantasyon yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra polimerik mikroküreler üç kez 100 ml lik saf su ile yıkanmıştır. Yıkamaya etanol-su karışımı (%50 v/v) ve etanol ile

devam edilmiştir. Polimerleşmemiş tetrafenilporfirini mikrokürelerden uzaklaştırmak için mikroküreler 24 saat kloroformda bekletilmiş ve kloroform mikrokürelerden süzülerek uzaklaştırılmıştır. Son olarak mikroküreler sırasıyla etanol, etanol-su (%50 v/v) ve su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan polimerik mikroküreler vakum etüvünde 60°C de kurutulmuştur. Elde edilen farklı çaptaki mikroküreler belirli 125-150 µm aralığında elekten elenerek adsorpsiyon deneyinde kullanılmıştır.

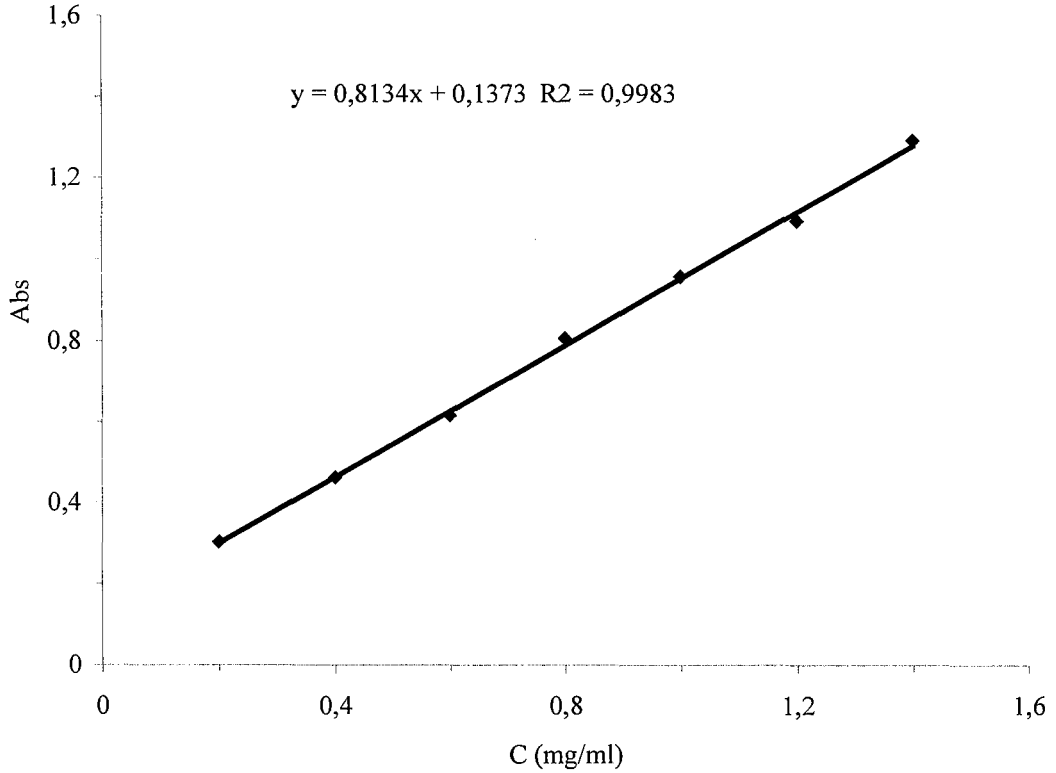
Polimerizasyon 2: Bu yöntemde stabilizör olarak PVA yerine NaCl-MgCl₂ tuz karışımı kullanılmış [130], polimerizasyon ve polimerik mikrokürelerin saflaştırılması polimerizasyon 1'deki gibi yapılmıştır. Ayrıca farklı miktarlarda 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin monomeri ile EDMA polimerleştirilerek de polimerik mikroküreler hazırlanmıştır.

2.4. BSA Adsorpsiyon Deneyleri

Adsorpsiyon deneyleri için model protein olarak bovin serum albumin (BSA) seçilmiştir. Adsorpsiyon deneyleri pH 6-8 de 20 mM sodyum fosfat tamponunda ve pH 4-5 de 20 mM sodyum asetat tamponu ile çalışılmıştır. Deneyler kapaklı test tüpü içinde toplam 5 ml çözeltide, 5 mg adsorban, 0,2-2,5 mg/ml BSA, 0-2 M Na₂SO₄, 20 mM tampon içerecek şekilde oda sıcaklığında karıştırılarak yürütülmüştür. Aksi belirtilmedikçe deneylerde adsorban olarak % 1 mol oranında tetrafenilporfirin içeren adsorban kullanılmıştır. Adsorpsiyon süreci sonunda test tüpü santrifüj edilerek adsorban çöktürülmüş adsorbana bağlanmamış protein derişimini belirleyebilmek için üstte kalan çözeltiden 100 µl alınarak üzerine 3.0 ml Bradford ajanı ilave edilmiştir. Ajan ile BSA arasında kompleks oluşumu için 10 dakika beklendikten sonra çözeltinin 590 nm dalga boyunda adsorpsiyonu ölçülmüştür [31]. BSA-Bradford kompleksi için hazırlanmış absorbans-derişim kalibrasyon grafiği kullanılarak çözeltideki BSA derişimi, ardından BSA miktarı hesaplanmıştır. Adsorplanmış protein miktarı proteinin başlangıçtaki miktarından bağlanmamış protein miktarı çıkarılarak bulunmuştur.

Adsorplanan BSA miktarının belirlenmesine yönelik tipik bir çalışma şu şekilde yapılmıştır:

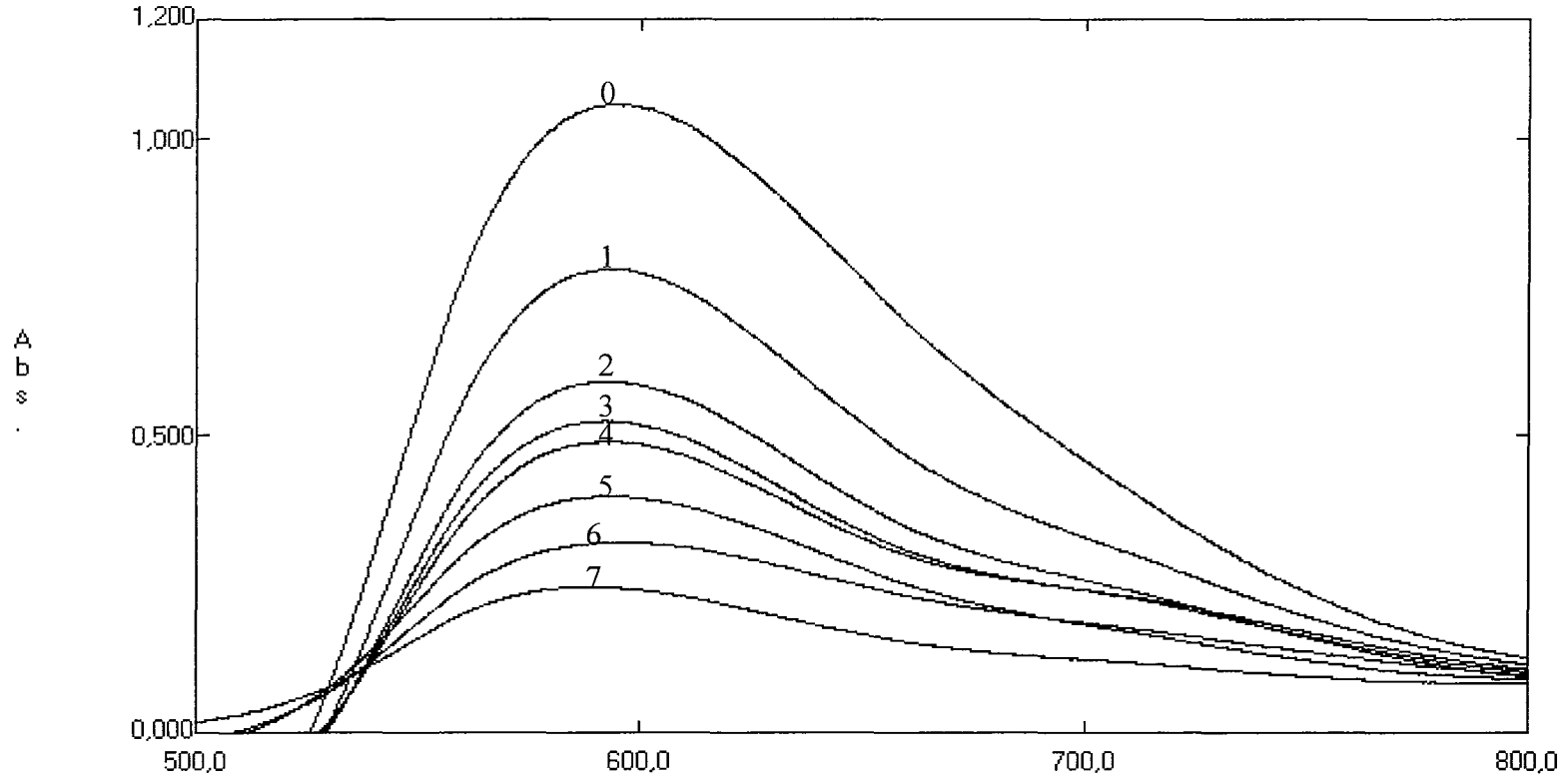
Adsorpsiyon deneylerine başlamadan önce Bradford yöntemine göre BSA derişim-adsorbans kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Şekil 2.1.'de Bradford assay yöntemine göre BSA için elde edilmiş kalibrasyon doğrusu görülmektedir.



Şekil 2.1. Bradford assay yöntemine göre çizilmiş BSA proteinin kalibrasyon eğrisi

pH'ı 4,0 olan 5 ml'lik bir çözelti, adsorban (5 mg), BSA (1 mg/ml), asetat tamponu (20 mM) ve Na₂SO₄ (1,0 M) kullanılarak test tüpünde hazırlanmış ve oda sıcaklığında karıştırılmaya başlanmıştır. Belirli zaman aralıklarında deney tüpü santrifüj edilerek adsorbanın çökmesi sağlanmış ve üste kalan sıvı fazdan 0,1 ml'lik çözelti alınmıştır. Ardından bu sıvı 3 ml'lik Bradford ajanı içine konulmuş ve karıştırılmıştır. On dakika beklendikten sonra bu çözeltinin görünür bölge spektrumları alınmış ve adsorplanmadan kalan protein miktarı kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunmuştur. Şekil 2.2 de farklı zamanlarda BSA-Bradford kompleksinin görünür bölge spektrumları görülmektedir. Başlangıç derişiminden ortamda kalan protein miktarı çıkarılarak adsorplanan protein miktarı bulunmuş

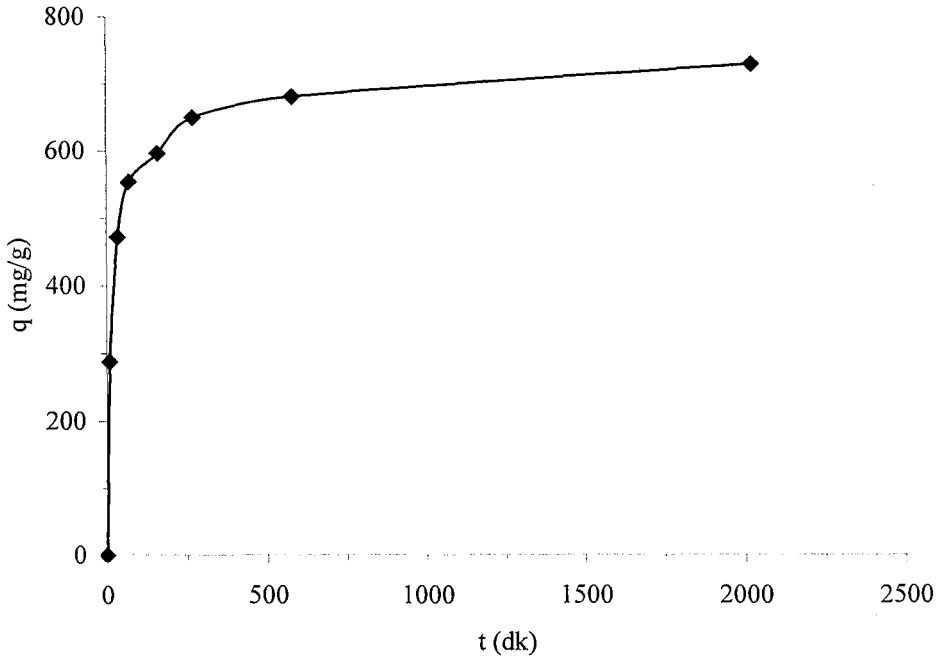
ve pH 4 için elde edilen veriler Çizelge 2.1 de verilmiştir. Şekil 2.3 de ise elde edilen 2020 dakika sonraki zaman-adsorpsiyon miktarı grafiği görülmektedir.



Şekil 2.2. Bradford ajanı-BSA kompleksinin zamana bağlı UV-görünür bölge spektrumları (pH 4,0'de, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ M}$, 20 mM asetat tamponu, (0) 0 dak, (1) 10 dak, (2) 35 dak, (3) 70 dak, (4) 160 dak, (5) 270 dak, (6) 580 dak. ve (7) 2020 dak sonunda alınan spektrumlar)

Çizelge 2.1. pH 4 de yapılan bir çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi, (BSA^{*} = 1,0 mg/ml, Adsorban =5 mg, V = 5 ml, [Na₂SO₄] =1 M, 20 mM asetat tamponu)

Sıra	t(dk)	Abs	Çözeltide kalan BSA (mg/ml)	q(mg BSA/g adsorban)
0	0	1,038	1,000	0
1	10	0,691	0,712	288
2	35	0,470	0,528	472
3	70	0,373	0,447	553
4	160	0,321	0,404	596
5	270	0,256	0,350	650
6	580	0,219	0,319	681
7	2020	0,163	0,270	730



Şekil 2.3. pH 4,0 de protein adsorpsiyonu, BSA = 1,0 mg/ml, Adsorban =5 mg, V = 5 ml, [Na₂SO₄] =1 M, 20 mM asetat tamponu,

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada oldukça hidrofobik bir yapıya ve yoğun bir konjugasyona sahip tetrafenilporfirin ile bovin serum albumin arasındaki hidrofobik etkileşimden yararlanarak bu proteinin tetrafenilporfirin ligandı içeren bir polimerik matrikse adsorpsiyonu araştırılmıştır. Porfirinlerin ve tetraarilporfirinlerin biyomoleküller ile etkileşimleri oldukça uzun bir süredir araştırılmakta olup temelde porfirinlerin dokularda birikmesi özelliğinden dolayı bunların fotodinamik terapi ajanı olarak kullanımları denenmiştir ve denenmeye devam edilmektedir [67]. Bu çalışmalar porfirin temelli yapıların biyomoleküller ile kuvvetli bir şekilde etkileştiğini göstermektedir. Diğer taraftan adsorban ile biyomolekül arasındaki hidrofobik etkileşimlerden yararlanarak biyomoleküllerin ayrılması, saflaştırılması amacı ile bir kromatografik teknik olan hidrofobik etkileşim kromatografisi oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [121]. Bu kromatografik teknik için çok sayıda adsorban ticari olarak pazarlanmaktadır. Bu çalışma BSA ile tetrafenilporfirinin hem hidrofobik hem de π - π etkileşimlerine girmesi sonucu kuvvetli bir adsorpsiyonun gerçekleşeceği düşüncesi ile yapılmıştır.

3.1. Tetrafenilporfirin İçeren Polimerik Mikroküre Hazırlama Şekilleri

Tetrafenilporfirin ligand içeren matriksler hazırlamak için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bunlardan başlıcaları şu şekilde sıralanabilir ve bu yöntemler şematik olarak Şekil 3.1 de verilmiştir:

- a) Tetrafenilporfirin ligandı iyonik yapıda hazırlanarak zıt yüklü iyonik gruplara sahip matrikslere iyonik olarak bağlanabilir.
- b) Tetrafenilporfirin ligandı matrikslere (polimerik mikrokürelere) polimerizasyon sonrası kovalent olarak bağlanabilir.
- c) Polimerleşebilen yapıya sahip tetrafenilporfirin (monomer) sentezlenip ve komonomerler ile birlikte polimerleştirilerek porfirin yapısı mikrokürelere dahil edilebilir.

d) Tetrafenilporfirin polimer küreciğini oluşturan çapraz bağlı polimer zincirler arasına (yapıya) hapsedilebilir.

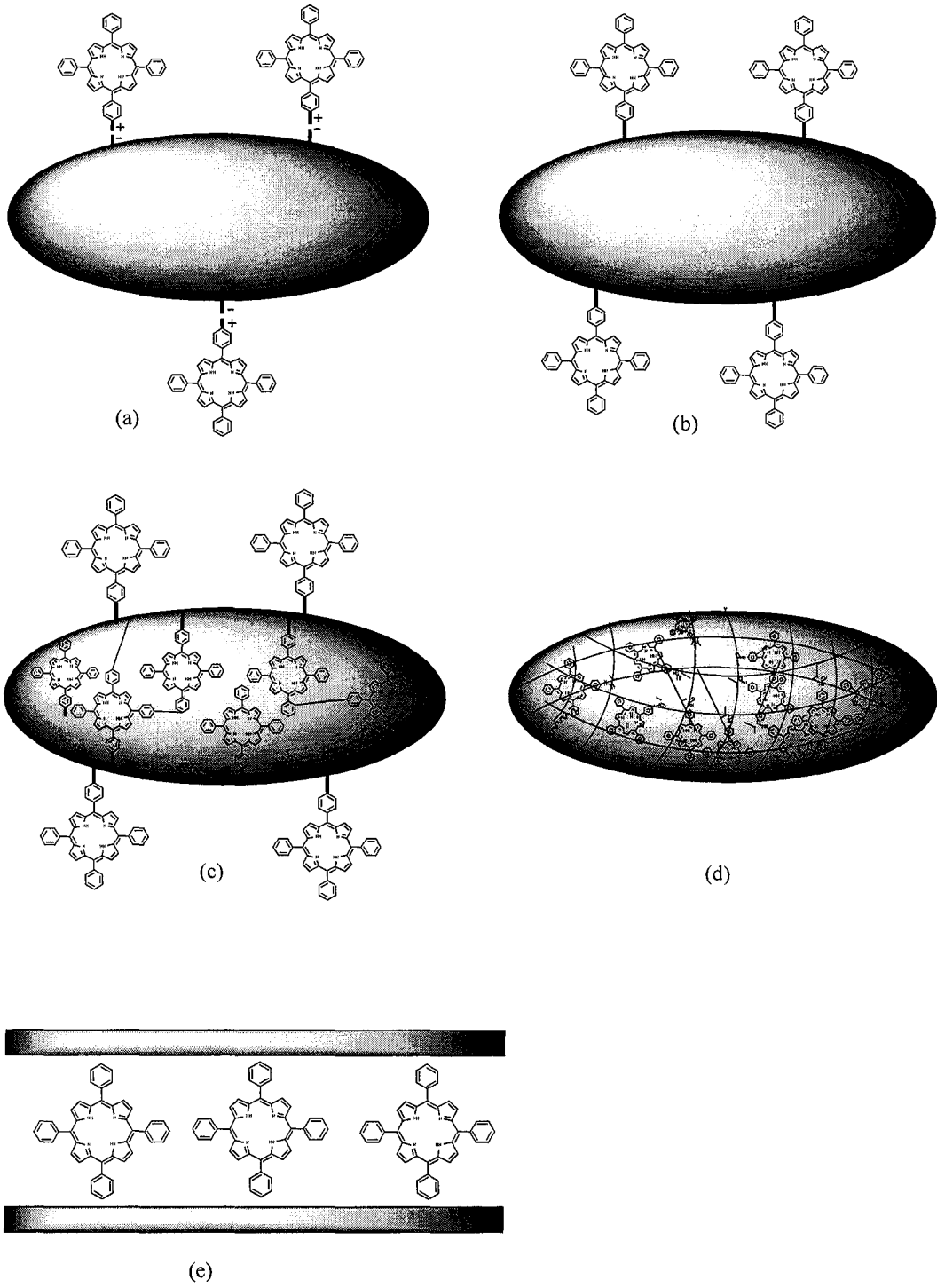
e) Tetrafenilporfirin uygun aralığa sahip iki tabaka arasına yerleştirilebilir.

Bu yöntemlerin her biri ile polimerik yapıya veya katı bir desteğe porfirin dahil etme çalışmaları literatürde yer almaktadır [17, 128, 131-134].

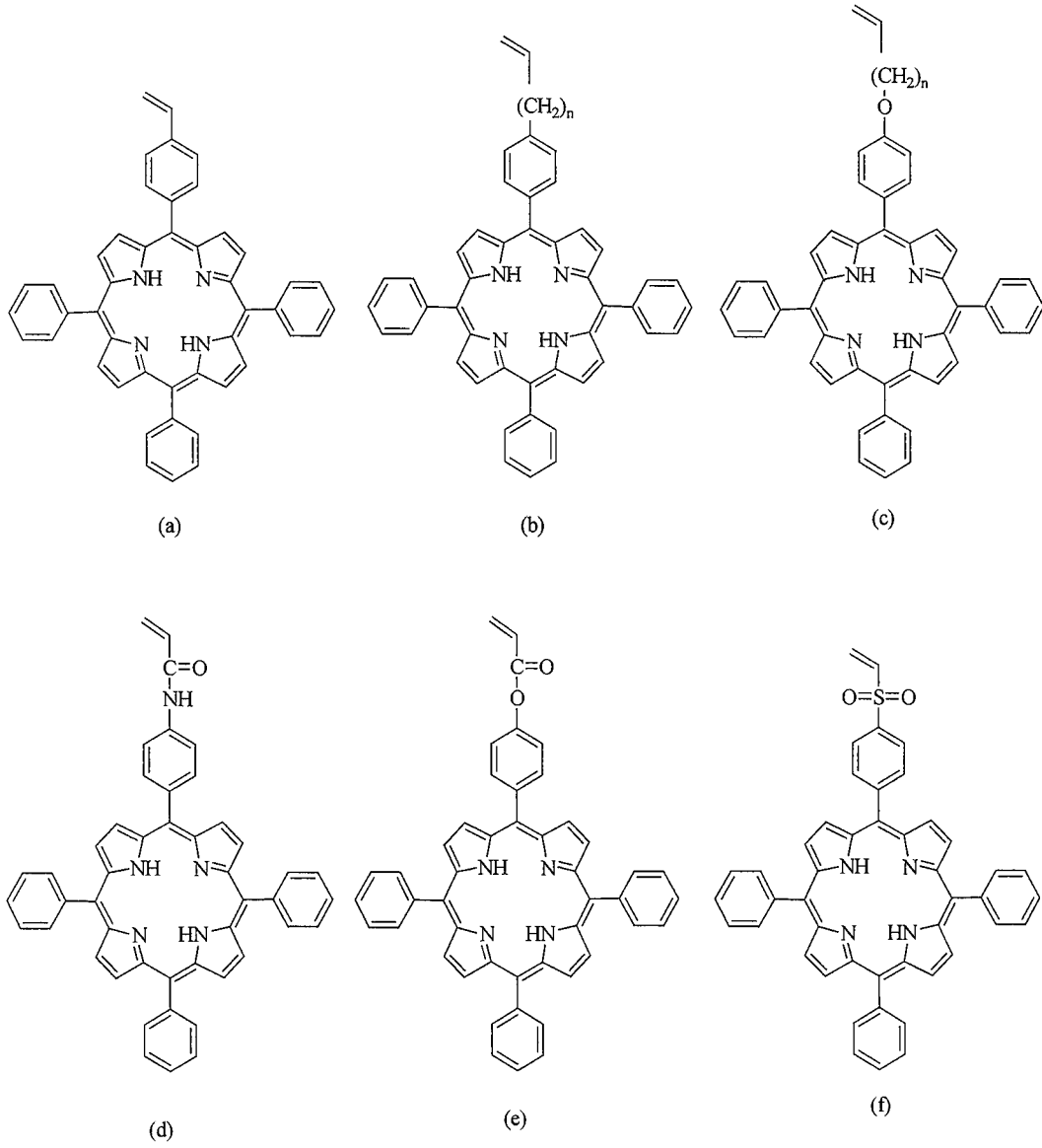
Bu çalışmada protein adsorpsiyonu için protein ile polimerik adsorban arasında oluşacak hidrofobik kuvvetlerden ve π - π etkileşimlerinden yararlanılması planlandığından, yukarıda sayılan tetrafenilporfirini polimerik yapıya veya bir katı desteğe bağlama yöntemlerinden üçüncüsü seçilmiştir (Şekil 3.1.c). Bu yaklaşımla tetrafenilporfirin polimer matrikse polimerleşme sürecinde dahil olacağından bu ligand polimer matriksin yüzeyinde ve iç kısımlarında homojen olarak dağılmış olacaktır. Buna karşılık porfirinin iyonik karakterde olması ve polimer matrikse elektrostatik (iyonik) olarak bağlanması (Şekil 3.1.a) durumunda protein adsorpsiyonunda iyonik tetrafenilporfirin ve matriks ile protein arasında elektrostatik kuvvetlerin de rol oynaması söz konusu olacaktır. Tetrafenilporfirinin polimerizasyon sonrası polimere kovalent bağlanması ise sadece polimer yüzeyinin porfirin taşıması sonucunu verecektir (Şekil 3.1.b). Tetrafenilporfirinin polimerik yapı içine hapsedilmesi ise sentez zorlukları olan bir yoldur ve tetrafenilporfirinin yapıdan sızması olasılığı vardır (Şekil 3.1.d). Tetrafenilporfirini iki tabaka arasına yerleştirme ise kil benzeri yapılara uygulanabilmekte olup polimerik sistemlere uygulanmamaktadır (Şekil 3.1.e).

Tetrafenilporfirini polimerleşme sırasında oluşan polimer zincirlerine katabilmek için tetrafenilporfirin yapısının vinil grubu veya grupları içeren (monomerik) bir yapıya sahip olması gerekir. Vinil grubu çeşitli şekillerde porfirin halkasına bağlanabilir: Örneğin vinil grubu doğrudan tetrafenilporfirinin fenil halkasına bağlanabileceği gibi amid, ester, eter, metin, sülfon grupları yardımıyla da polimerleşebilen bir tetrafenilporfirin elde edilebilir. Bu yapılara örnekler Şekil 3.2 de verilmiştir ve bu çalışmada polimerleşebilen bir tetrafenilporfirin yapısı (monomer) oluşturmak için vinil grubunun amid bağı ile tetrafenilporfirine bağlanması seçeneği seçilmiştir. Amid bağı bir asit fonksiyonelliği taşıyan vinil monomeri ile amino grubu taşıyan bir tetrafenilporfirin arasında kolaylıkla oluşturulabilir. Bu düşünceyle bu çalışma

için polimerleşebilen 5-(4-metakrilamido)-10,15,20-trifenilporfirin sentezlenmiştir (Şekil 3.3.a) ve sentez için retrosentetik yaklaşım Şekil 3.3 de verilmiştir. Bu amaçla önce 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezlenmiş (Şekil 3.3.c), ardından bu porfirindeki nitro grubu indirgenerek 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (Şekil 3.3.b) elde edilmiştir. Son aşamada metakriloil klorür ile 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin reaksiyona sokularak 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin elde edilmiştir (Şekil 3.3.a). Böylece polimerik mikrokürelerin hazırlanması için polimerleşebilen bir tetrafenilporfirin yapı (monomer) elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Tetrafenilporfirin ligand içeren yapılar hazırlanması için sentez yaklaşımları



Şekil 3.2. Vinil grubu içeren çeşitli tetrafenilporfirinler (monomerler)

3.1.1. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi

3.1.1.1. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

İki farklı yaklaşımla 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (Şekil 3.3.c) elde etmek mümkündür.

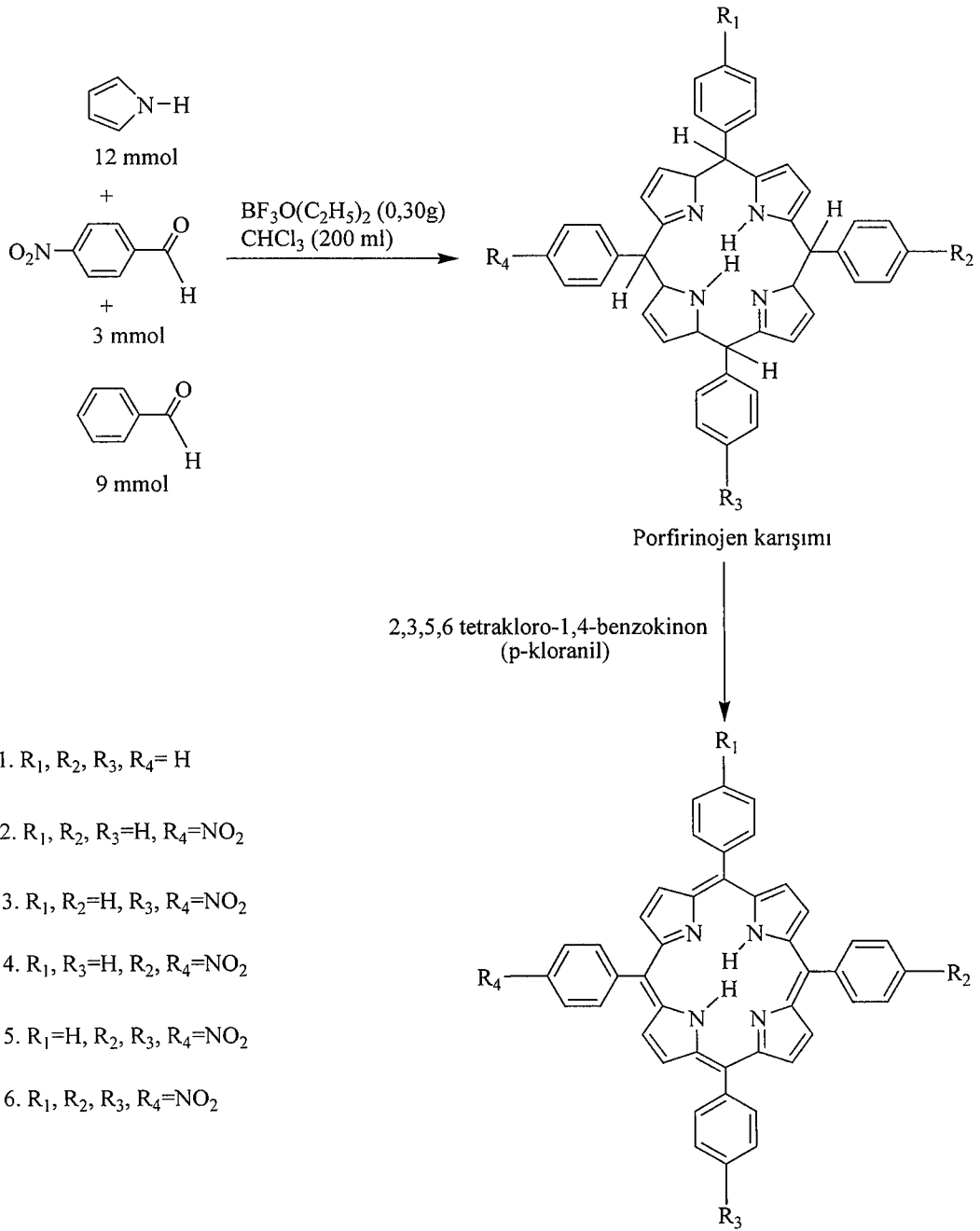
a) 5,10,15,20-Tetrafenilporfirin sentezlenip ardından bu yapıda bulunan 4 fenil grubundan birisi kontrollü bir şekilde aromatik substitüsyon reaksiyonu ile nitrolanarak 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin elde edilebilir. Bu yaklaşımın kullanıldığı bir çalışma literatürde bulunmaktadır [123].

b) Porfirin sentezindeki gerekli olan gruplardan biri aldehit grubudur. 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi için 3:1 mol oranında benzaldehit-nitrobenzaldehit karışımı kullanılarak hedeflenen porfirin sentezlenebilir [4,6]. Ancak bu şekilde sentez nitro grubu açısından oluşan porfirinlerde istatistiksel bir dağılıma neden olur.

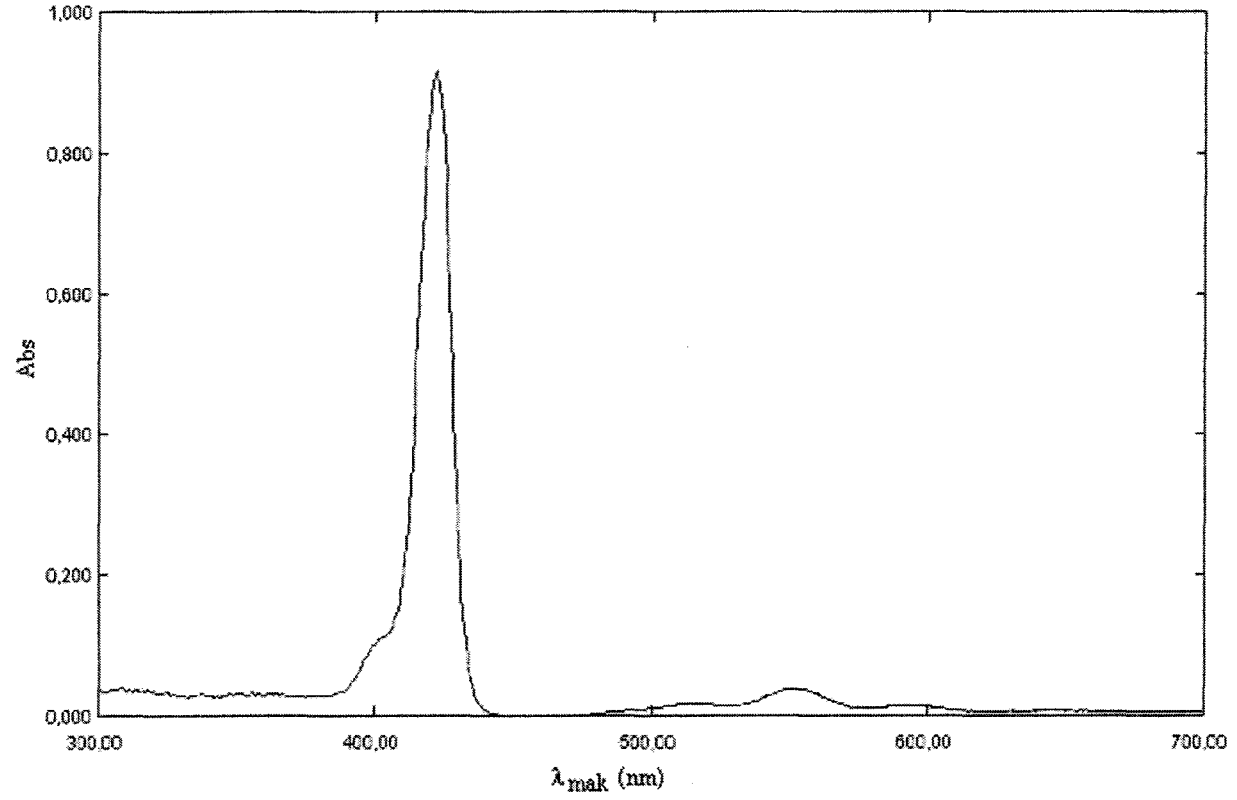
Bu çalışmada önce nitrolama ile 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin eldesi denenmiş ve başarılı olunamamıştır. Literatürdeki çalışma dumanlı nitrik asit ile yapılmasına karşılık bu çalışmada derişik nitrik asit kullanılmıştır. 5,10,15,20-Tetrafenilporfirin nitrolanması için 0°C de yürütülen reaksiyon gerçekleşmemiş, oda sıcaklığında yürütülen reaksiyonda ise tetrafenilporfirindeki fenil gruplarının birden fazlası nitrolanmıştır.

5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin diğer yaklaşımla sentezinde Lindsey ve çalışma arkadaşlarının geliştirdikleri porfirin sentez yöntemi kullanılmıştır [6]. Stokiyometrik miktarda pirol, 3:1 mol oranında benzaldehit ve 4-nitrobenzaldehit bortrifloroeterat katalizörlüğünde kloroformda azot gazı altında manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat karıştırılmış ardından çözelti 40°C ye ısıtılmış ve 5 saat daha karıştırılmıştır (Şekil 3.4). Bu reaksiyon sonucu oluşan porfirinojen reaksiyon ortamına 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon oksidantı ilave edilerek porfirin yapısına dönüştürülmüştür (Şekil 3.4). Karışımdan alınan örneğin ince tabaka kromatografisi ile elde edilen kromatogramından 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin diğer nitrolu ve nitrosuz porfirinlerle birlikte oluştuğu anlaşılmıştır. Bu şekilde bir sentez, istatistiksel bir dağılımla 6 farklı türde porfirin verir (Şekil 3.4). Ancak başlangıçta benzaldehit ve nitrobenzaldehit mol oranının

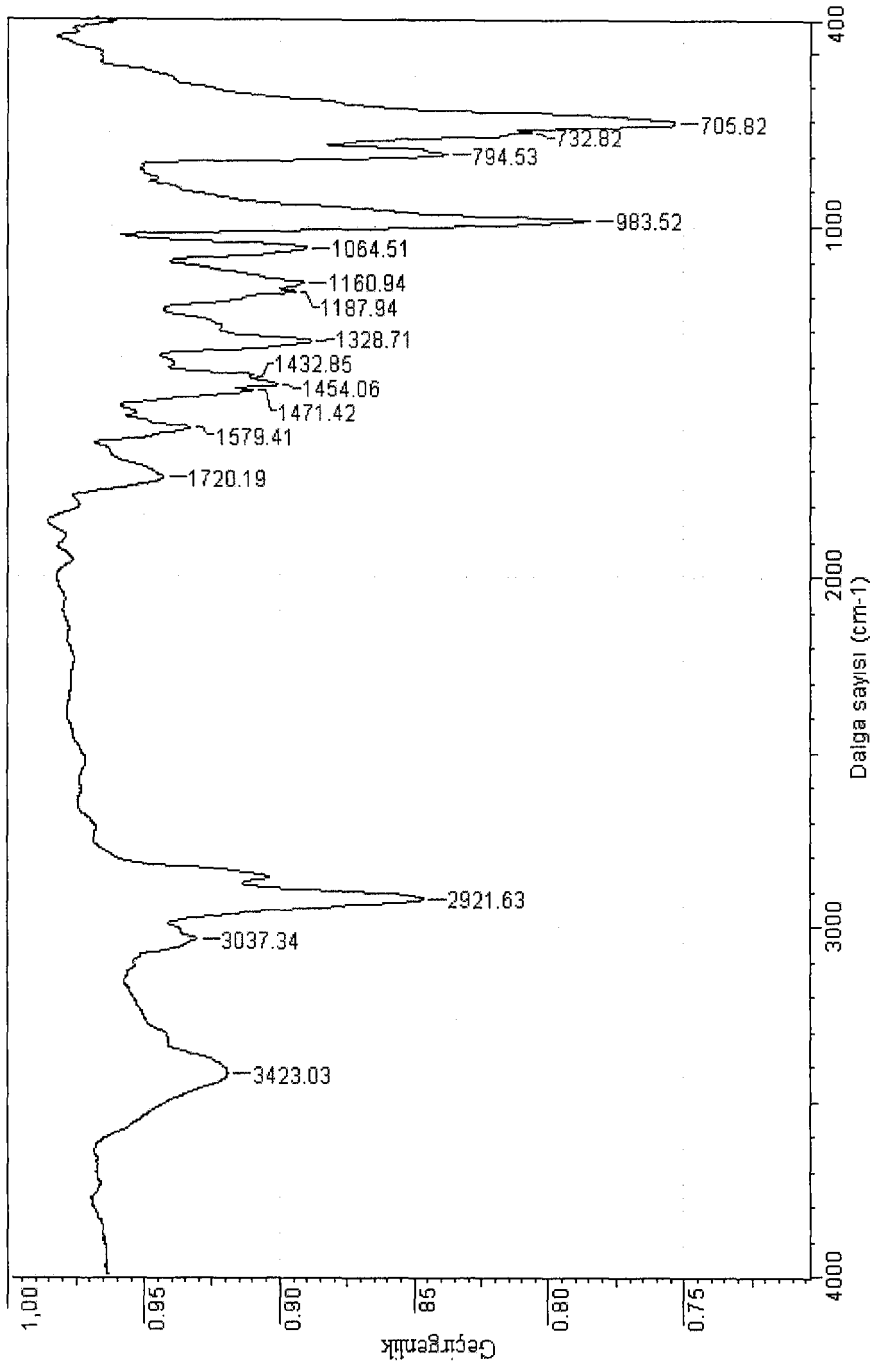
3:1 şeklinde ayarlanmış olması nedeniyle ve kromatogramdaki spotların koyuluğundan da anlaşıldığı gibi reaksiyon sonucu ağırlıklı olarak hiç nitro grubu içermeyen 5,10,15,20-tetrafenilporfirin (Şekil 3.4, yapı 1) ve 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin (Şekil 3.4, yapı 2) oluşmuştur. Daha sonra 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin kloroform yürütücüsü kullanılarak preparatif İTK ile saflaştırılmış ve elde edilen ürün veriminin %2,5 olduğu bulunmuştur. Bu porfirinin R_f değerinin, FTIR, UV ve NMR spektrumların literatürde verilenlerle uyumlu olduğu görülmüştür. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin kloroform ile yürütüldüğünde R_f değeri 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin R_f değerine göre daha düşük olmuştur. Bu da yapıdaki NO_2 grubunun yapıyı daha polar yapması nedeniyle yapının silika ile daha kuvvetli etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. UV-görünür bölge spektrumunda ise $-\text{NO}_2$ grubu elektron çeken bir grup olduğundan 5,10,15,20-tetrafenilporfirine göre bu porfirinin Soret pikinin maksimumunun dalga boyunda batokromik etki yapmıştır (Şekil 3.5). 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin Soret bandının maksimumu 422 nm de gelirken 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin Soret bandının maksimumu 419 nm de gelmektedir. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumuna bakıldığında 1720-1579 ve 1454-1328 cm^{-1} de NO_2 grubuna ait pikler görülmektedir (Şekil 3.6) [135,136]. Bu pikler 5,10,15,20-tetrafenilporfirinin FTIR spektrumunda bulunmamaktadır. Ayrıca 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin yapısının mononitro bir yapı olması nedeniyle simetri kaybolduğundan ^1H NMR spektrumunda aromatik protonlara ait bölgede simetrik bir yapı olan H_2TPP 'in ^1H NMR spektrumuna göre daha fazla sayıda pik görülmüştür (Şekil 3.7). 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin ^1H NMR spektrumunda -2,7 ppm'deki pik porfirindeki 2 adet N-H protonuna ait olup porfirin halkasının en karakteristik ^1H NMR piklerinden biridir.



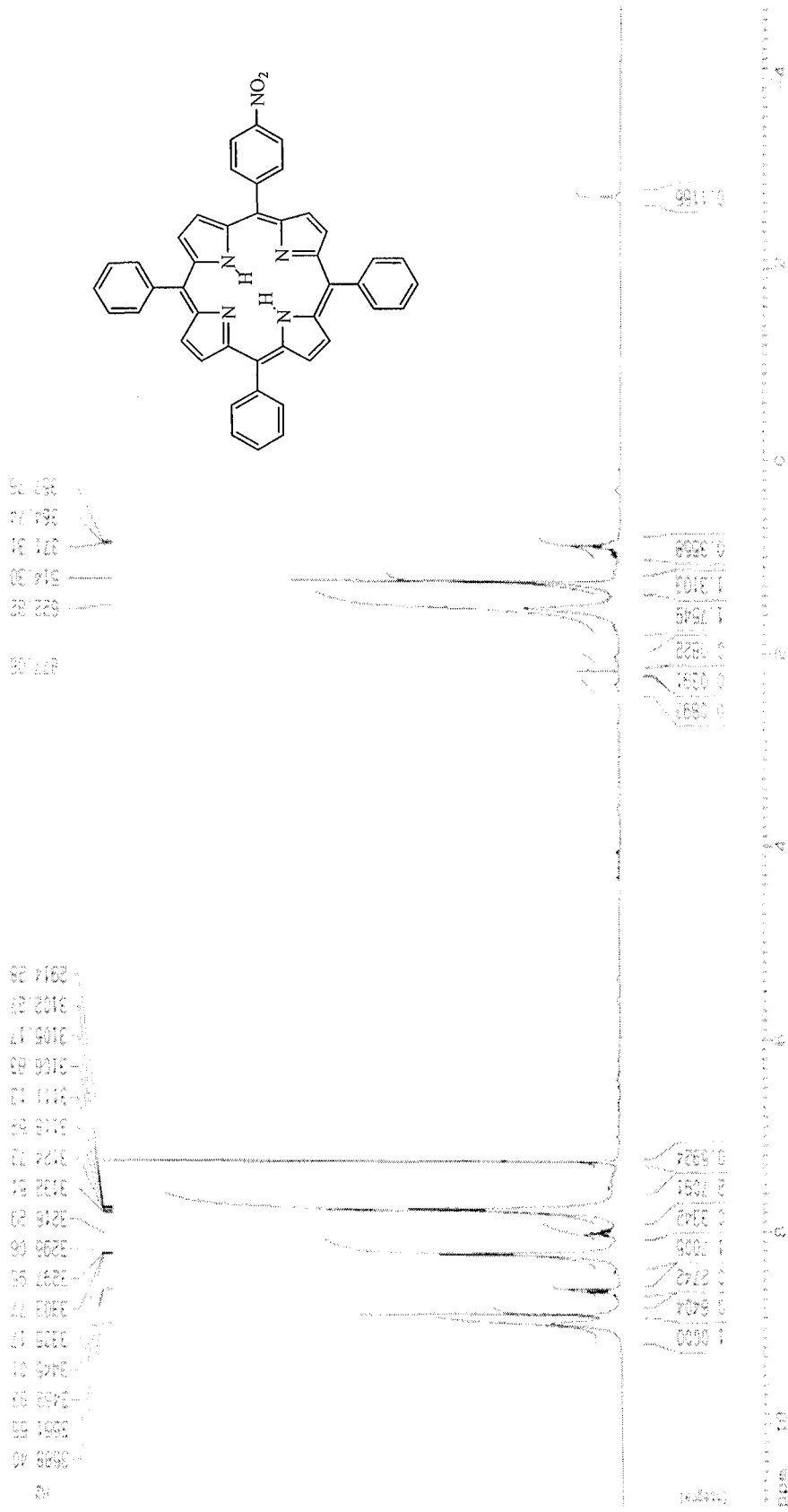
Şekil 3.4. Lindsey yöntemine göre tetrafenilporfirin sentezi



Şekil 3.5. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu



Şekil 3.6. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin FTIR spektrumu

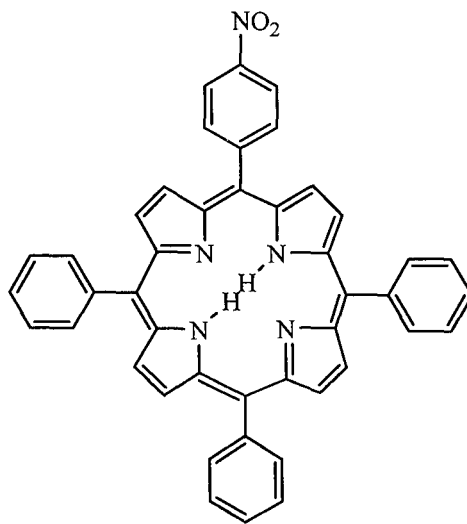


Şekil 3.7. 5-(4-Nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin ¹H NMR spektrumu

3.1.1.2. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

Sentezlenen 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirindeki nitro grubu literatürde verilen bir yöntemle benzer bir yöntemle primer amin grubuna indirgenmiştir [124]. İndirgenme ajanı olarak kalay(II) klorür kullanılmıştır (Şekil 3.8). Oluşan 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin saflaştırılması preperatif ince tabaka kromatografisi ile yapılmış ve verimin %84 olduğu bulunmuştur. Elde edilen amino gruplu porfirinin R_f değeri ve UV-görünür bölge (Şekil 3.9), FTIR (Şekil 3.10) ve ^1H NMR (Şekil 3.11) spektrumlarının literatürdekilerle uyduğu görülmüştür [124]. Elde edilen 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin silikajel üzerinde ince tabaka kromatografisinde kloroform yürütücü kullanıldığında R_f değeri 0,45 bulunmuştur. Bu porfirinin indirgenmemiş hali olan nitrolu yapının aynı koşullarda R_f değeri 0,80'dir. NH_2 grubunun İTK'daki silika sabit faz ile H-bağı yapabilmesi ve polaritesinin NO_2 grubuna göre daha az olması nedeniyle 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin R_f değerinin nitrolu yapının R_f değerine göre daha küçük olması beklenir ve bu sonuç elde edilmiştir. Her iki porfirinin görünür bölge spektrumları karşılaştırıldığında aralarında çok bir fark olmadığı ve sadece 1 nm lik maviye kaymanın gerçekleştiği görülmüştür. Tetraarilporfirinlerin görünür bölge spektrumlarının, özellikle Soret bandının dalga boyunun, aril halkasındaki substitüentlere göre pek değişmediği bilinmektedir. Buna karşılık tetraarilporfirinlere metal bağlanması ve/veya β -pirol konumlarının halojenlendirilmesi durumlarında Soret bandının dalga boyunda büyük kaymalar görülür. Genelde bağlanan metale bağlı olarak Soret bandının maksimumu değişik dalga boylarında gözlenir ve spektrumda yeni bandlar oluşur. Mononitrolu porfirinin aminli porfirine indirgenmesi sadece fenil grubunda substitüsyon değişikliğine yol açtığından iki yapının görünür bölge spektrumlarının benzer olması beklenen bir sonuçtur. Mononitrolu yapı ile monoaminli yapının FTIR spektrumlarının karşılaştırıldığında NO_2 grubuna ait piklerin monoaminli porfirin yapısına ait FTIR spektrumda görülmemesi ve NH_2 grubuna ait piklerin spektrumda ortaya çıkması beklenir. Özellikle primer ve sekonder amin gruplarının FTIR spektrumlarında diğer fonksiyonel gruplarınkilerden kolaylıkla ayırt edilebilen pikleri vardır. Aromatik primer

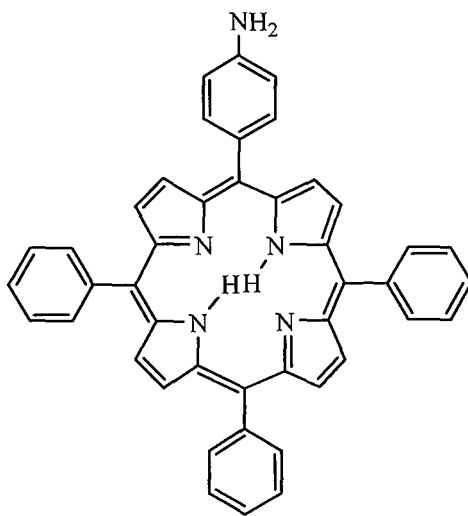
aminlerin temiz olarak alınan IR spektrumlarında biri $3400-3330\text{ cm}^{-1}$ diğeri $3330-3250\text{ cm}^{-1}$ de olmak üzere iki adet asimetric ve simetric gerilme titreşimlerine ait pikler görülür [135,136]. Ayrıca primer aminlerin bükülme (bending) titreşimlerine ait genellikle orta şiddette bir pik $1650-1580\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında görülür. Monoaminli yapının FTIR spektrumu (Şekil 3.10) incelendiğinde NH_2 grubunun asimetric ve simetric gerilme titreşimlerine ait iki pik 3369 cm^{-1} ve 3315 cm^{-1} de ve bending titreşimine ait pik 1602 cm^{-1} de görülmektedir. Mononitrolu ve monoaminli tetrafenilporfirin yapılarının ^1H NMR spektrumları karşılaştırıldığı zaman aradaki farkı en vurgulayıcı pik monoaminli yapıya katılmış olan iki tane amino grup hidrojenlerinin pikidir. Aromatik aminlerin NH proton pikleri $5,0-3,0\text{ ppm}$ arasında gözlenir [136]. Sentezlenmiş olan mononitroluporfirin amin grubu hidrojenlerine ait pik $4,0\text{ ppm}$ de zayıf da olsa gözlenmiştir (Şekil 3.11).



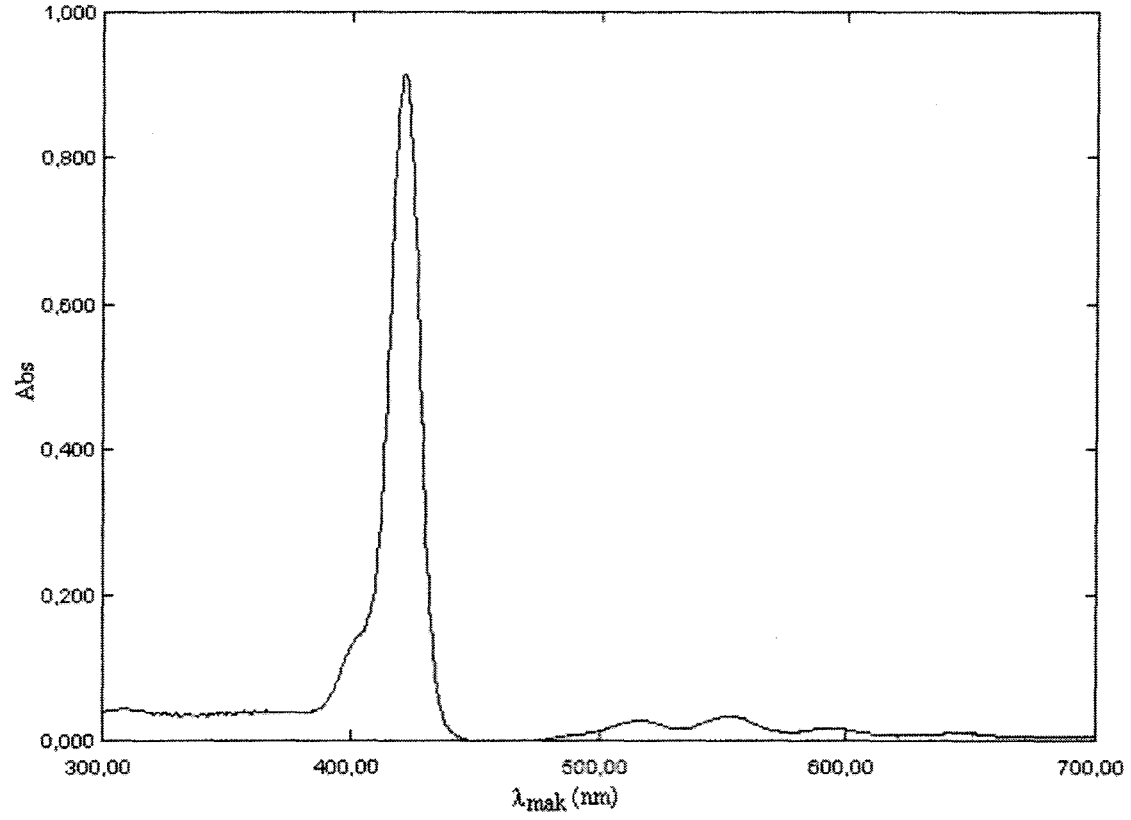
5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirin



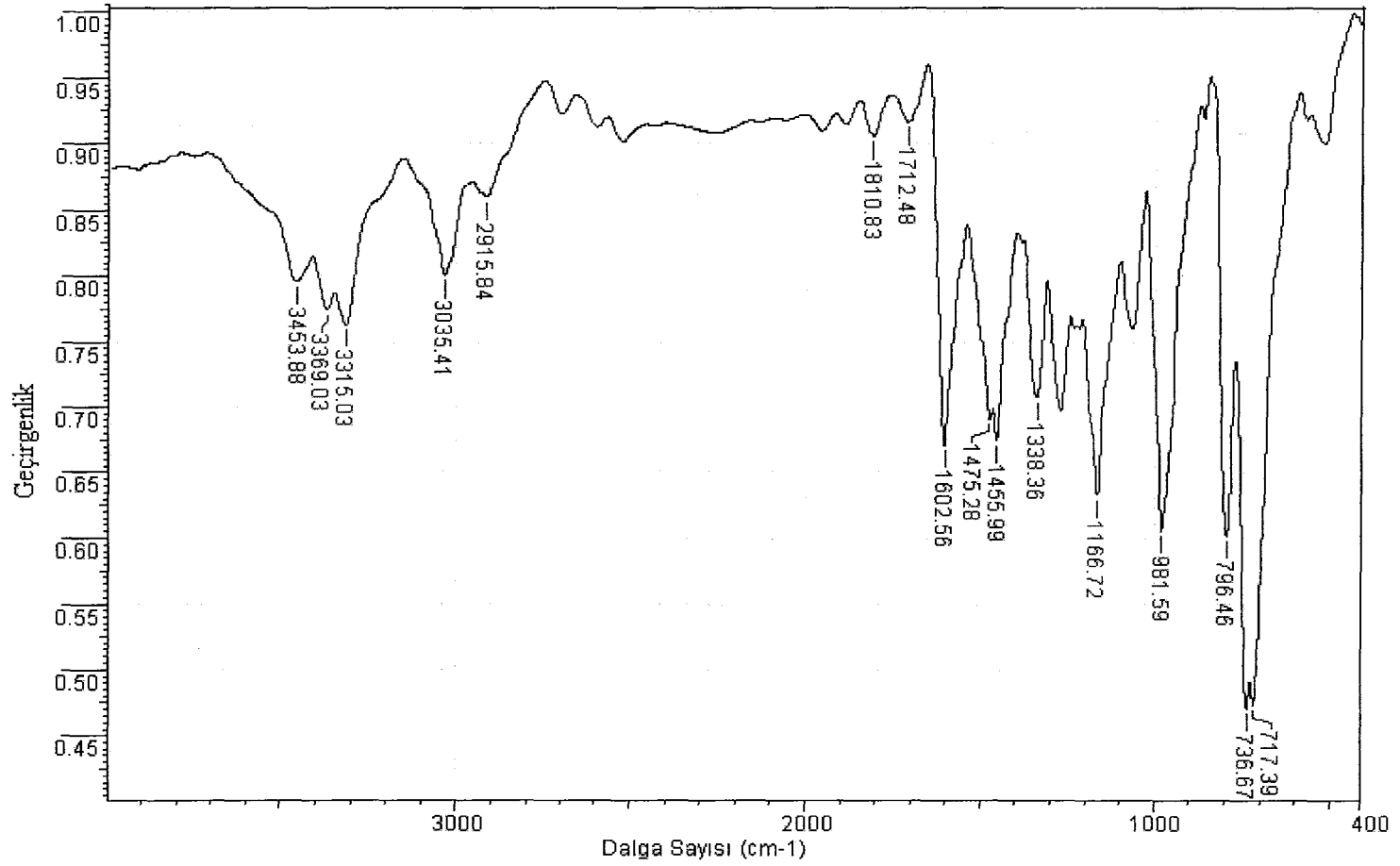
%20 lik HCl (25 ml)
SnCl₂.2H₂O (0,5 g)
40°C, 25 dk



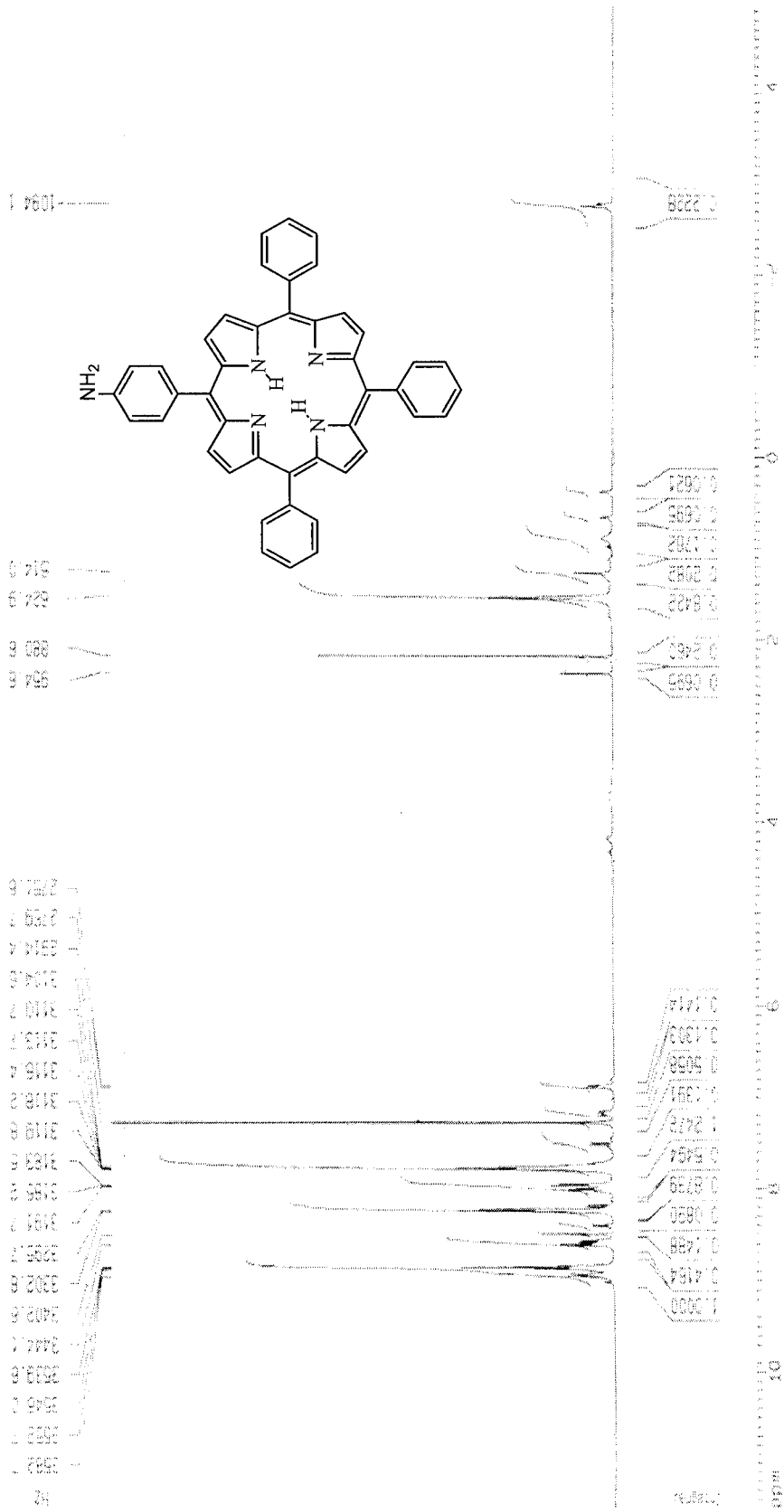
Şekil 3.8. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirin indirgenme reaksiyonu ile eldesi



Şekil 3.9. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu



Şekil 3.10. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu

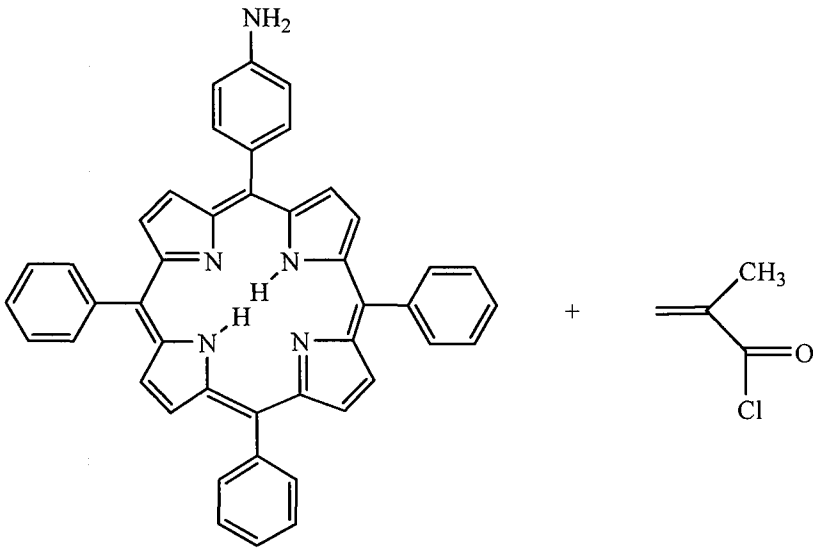


Şekil 3.11. 5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin ¹H NMR spektrumu

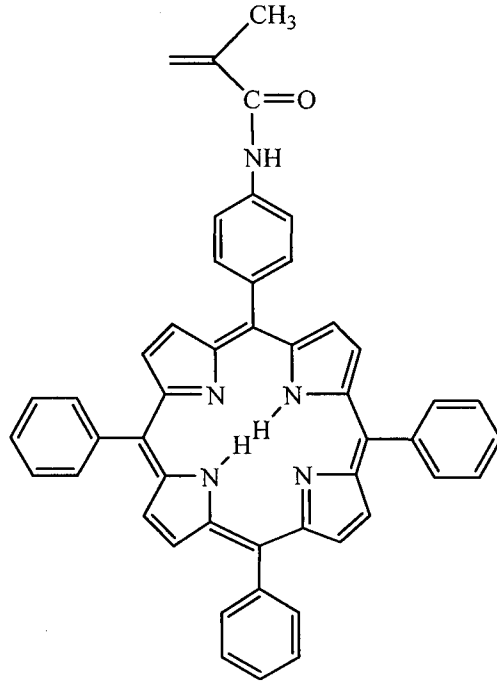
3.1.1.3. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi ve karakterizasyonu

5-(4-Aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirine polimerleşebilme özelliği kazandırmak için vinil gurubu fonksiyonelliği, metakriloil klorür 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin amino grubu aracılığıyla reaksiyona sokularak sağlanmıştır (Şekil 3.12). Oluşan 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Yapının UV-görünür bölge (Şekil 3.13), FTIR (Şekil 3.14) ve ^1H NMR (Şekil 3.15) spektrumlarının literatürde verilen değerler ile uyduğu görülmüştür [124]. Kısım 3.1.1.2'de belirtildiği gibi tetraarilporfirinlerdeki aril grupları üzerindeki substitüsyonlar tetraarilporfirinlerin görünür bölge spektrumlarını pek değiştirmemektedir. Bu nedenle sentez ile başlangıçtaki yapıdaki amino grubu yerine metakrilamido grubunun gelmesi bu porfirinin görünür bölge spektrumunda çok fazla bir farklılık yaratmamıştır. Gözlenen sadece Soret pikinin maksimumunun dalga boyunda 421 nm den 423 nm'ye kayması olmuştur. Sentez öncesi ve sonrası yapıların FTIR spektrumları karşılaştırıldığında 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumundaki başlangıç maddesine ait aromatik amin piklerinin yerine sekonder amid yapısına ait piklerin geldiği görülmüştür. Sekonder amidler $3330\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ aralığında N-H gerilim titreşimine ait bir band verirler [135,136]. Bu band 3315 cm^{-1} de görülmüştür. Karbonil grubuna ait IR spektrumundaki gerilim titreşimine ait pik son derece karakteristiktir ve konumu karbonil grubunun bulunduğu yapıya bağlıdır. Amidlerde karbonil adsorpsiyonu ketonlardaki, aldehitlerdeki karbonil adsorpsiyonuna göre daha yüksek dalga boyunda gelir ve bu amid I bandı olarak da bilinir. Genellikle amid karbonil veya amid I bandı $1715\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenir. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin yapısındaki karbonil grubuna ait amid I bandı absorpsiyonu 1670 cm^{-1} de görülmüştür. N-H bending (bükülmesi) titreşimine ait pik amid II bandı olarak bilinir ve bu pik C=O pikinden biraz daha düşük frekansta gelir. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin yapısında N-H bending titreşimine ait pik 1590 cm^{-1} de gözlenmiştir. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin ^1H NMR

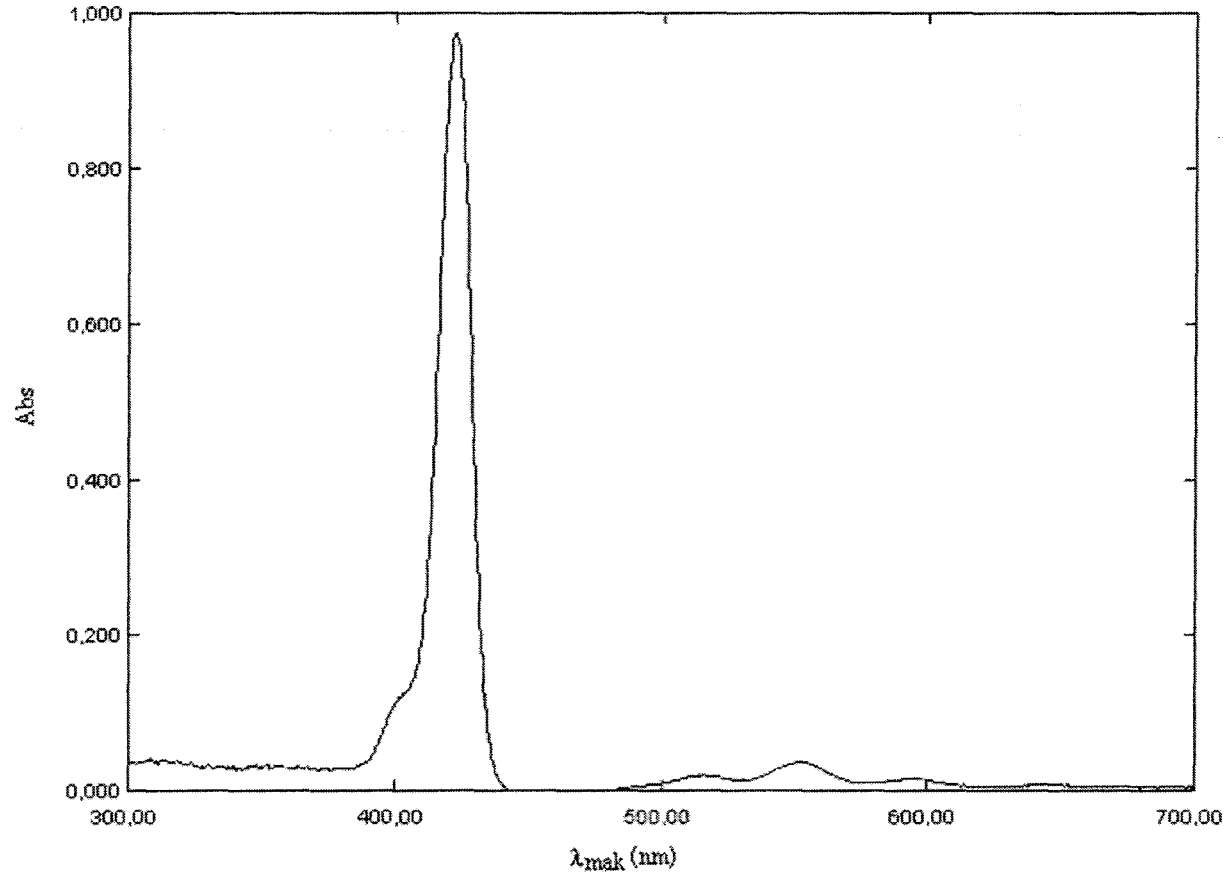
spektrumunda görülmesi beklenen vinil grup protonları ise 5-6 ppm aralığında multipler olarak gözlenmiştir. Vinilik protonlar genellikle 6.0-4.5 ppm aralığında multipler olarak gözlenirler.



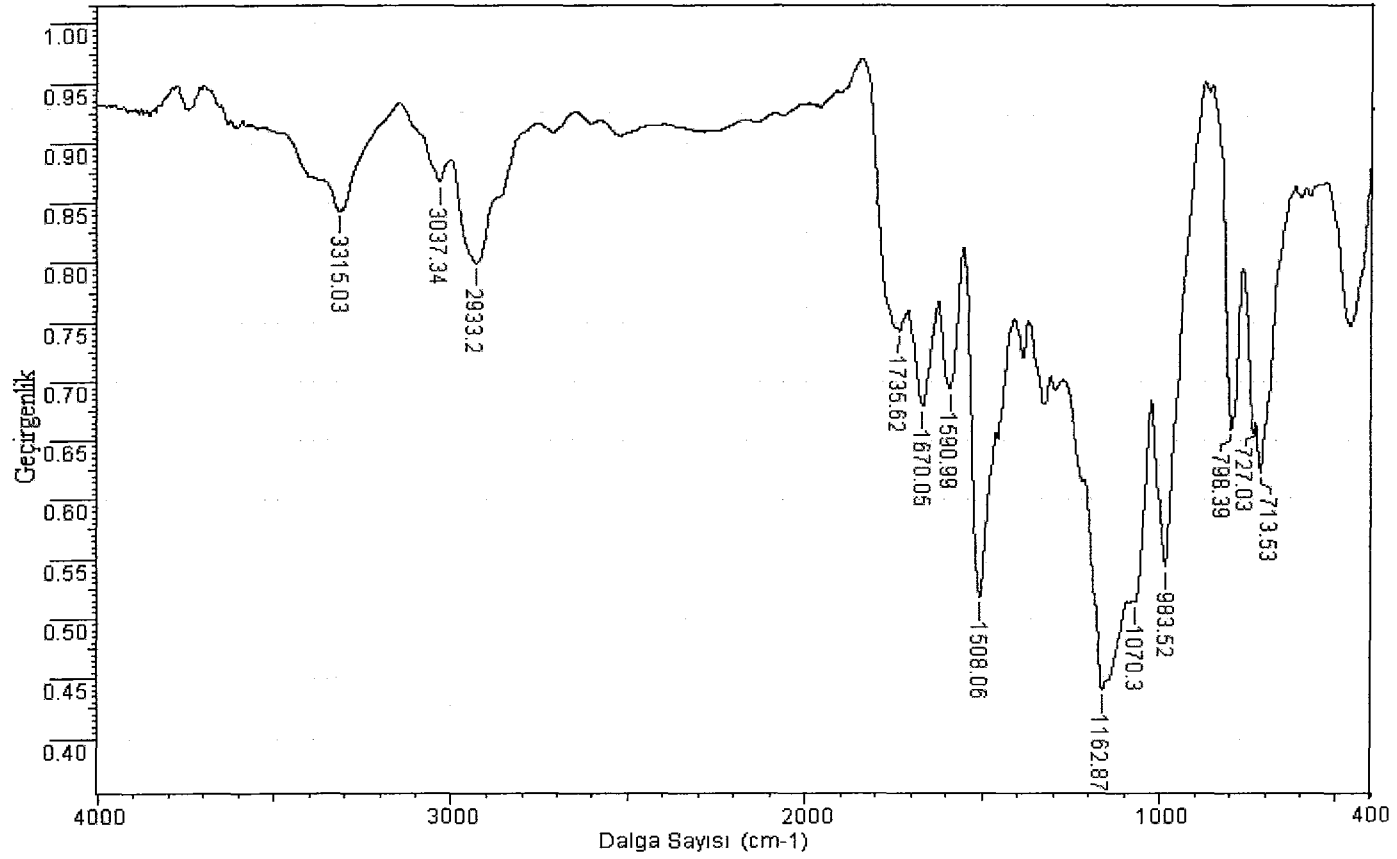
Tetrahidrofuran (10 ml)
Piridin (2 ml),
30 dk (0-5°C)
2 saat, oda sıcaklığı



Şekil 3.12. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi



Şekil 3.13. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin UV-görünür bölge spektrumu



Şekil 3.14. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin FTIR spektrumu

3.1.2. Tetrafenilporfirin ligandlı polimerik mikrokürelerin sentezi

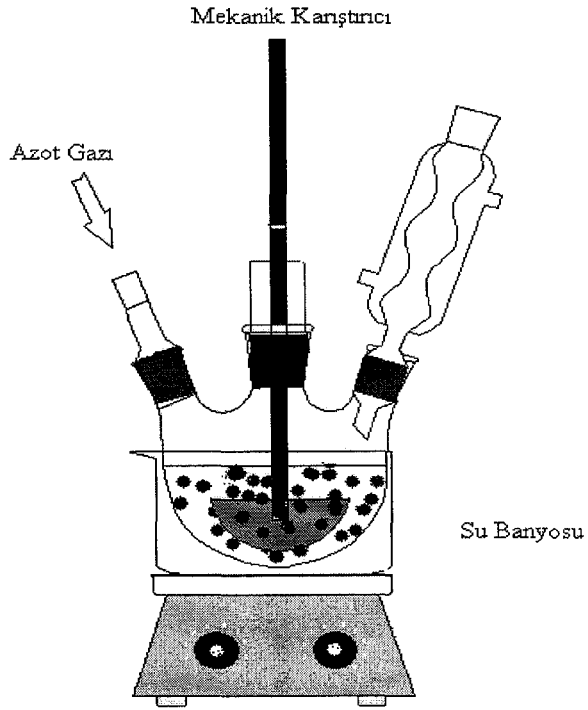
Birkaç mikrometreden milimetre boyutuna kadar polimerik mikroküreler hazırlamak için en elverişli yöntem süspansiyon polimerizasyon yöntemidir [129,137]. Bu yöntemde suda çözünür olmayan monomerler stabilizör olarak adlandırılan maddelerin varlığında karıştırılarak damlacıklar halinde devamlı faz olan suda dağıtılırlar. Polimerizasyon ortama ilave edilen suda çözünmeyen bir başlatıcı tarafından başlatılır ve ortama istenildiği durumda mikrokürelerde gözenekliliği artırmak için gözenek yapıcı (porojen) maddeler ilave edilebilir. Süspansiyon polimerizasyonu için bir deney düzeneği Şekil 3.16 da verilmiştir.

Tetrafenilporfirin ligandı bağılı mikrokürelerin sentezinde farklı oranda tetrafenilporfirin içerecek şekilde 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin – akrilamid – etilenglikoldimetekrilat (EDMA) kopolimerleri süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir (Şekil 3.17; Çizelge 3.1). Stabilizör olarak polivinil alkol (PVA), başlatıcı olarak 2,2-azobisisobütironitril (AIBN) ve gözenek yapıcı olarak toluen kullanılmıştır. Gerek PVA gerekse AIBN süspansiyon polimerizasyonunda en sık kullanılan stabilizör ve başlatıcıdır. Polimerizasyonda EDMA monomeri iki amaca yönelik kullanılmıştır: 1) polimer zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturarak rijit bir polimerik yapı oluşturmak, 2) tetrafenilporfirin ligandı haricinde polimerde hidrofilik (polar) bir yapı oluşmasını sağlamaktır. Aynı şekilde akrilamid de oldukça hidrofilik bir yapı oluşması için seçilmiştir. Hidrofilik yapı oluşturmadaki amaç, protein adsorpsiyonu için protein ile tetrafenilporfirin arasında hidrofobik etkileşimlerden yararlanılacağından polimerik mikrokürelerde tetrafenilporfirin içermeyen kısımların hidrofobikliğini düşürerek spesifik olmayan hidrofobik etkileşimleri azaltmaktır.

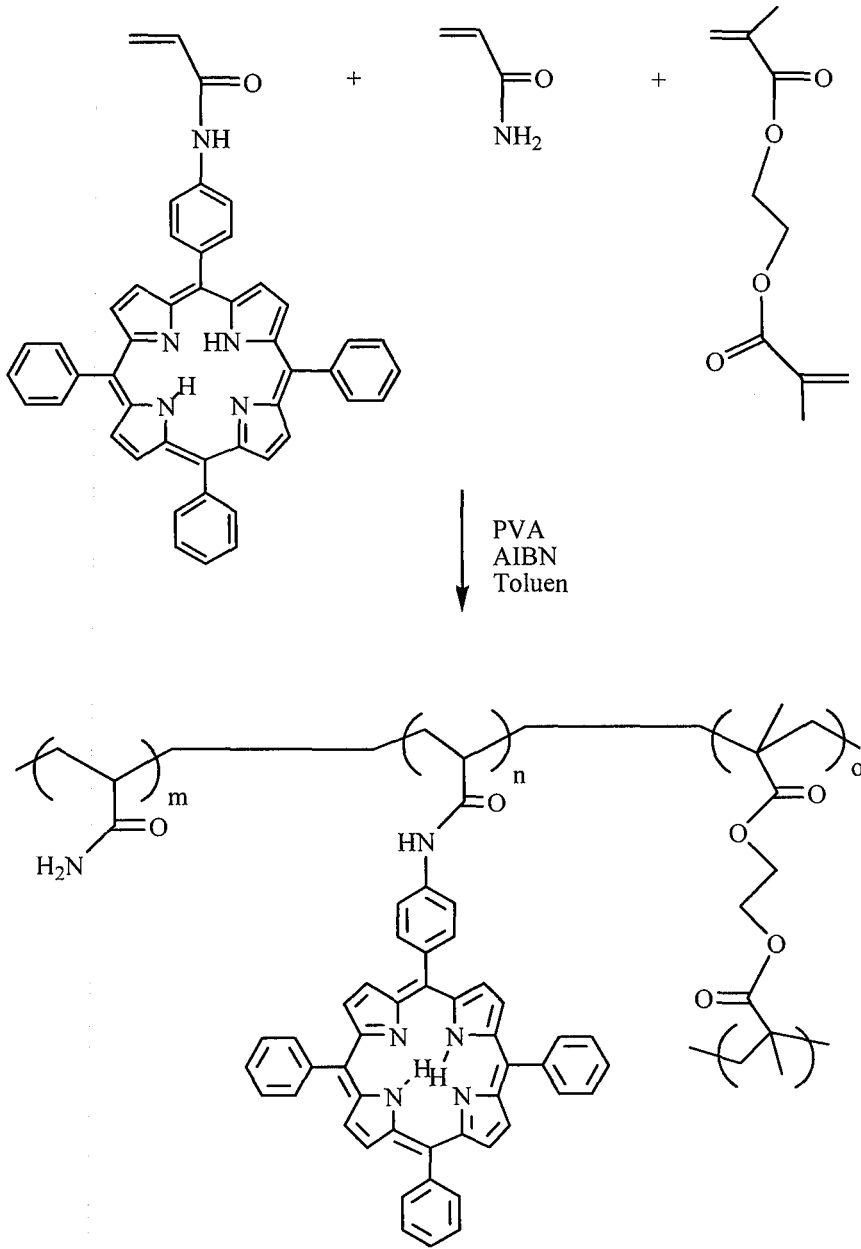
Ayrıca EDMA'nın mol %si yüksek bir oran olan % 60 olarak tutulmuştur. Bu oranda EDMA'nın ortamda bulunması polimerizasyon sırasında mikrokürelerde yoğun bir çapraz bağlanmaya neden olur. Bu da polimerik mikrokürelerin rijit bir yapıya sahip olmalarını sağlayacağından protein adsorpsiyon çalışmaları sırasında suda mikrokürelerin jelleşmesi ve şişmesi sorunu olmayacaktır.

Ayrıca tetrafenilporfirin ligandı içermeyen akrilamid-EDMA kopolimeri (Çizelge 3.1, deney 4) ve sadece EDMA polimeri de (Çizelge 3.1, deney 5)

sentezlenmiştir. Akrilamid–EDMA kopolimerinin sentezinde stabilizör olarak PVA yerine NaCl-MgCl₂ kullanılmıştır.



Şekil 3.16. Kopolimer hazırlanmasında kullanılan süspansiyon polimerizasyonu sisteminin gösterimi



Şekil 3.17. Tetrafenilporfirin bağlanmış poliakrilamid mikrokürelerin sentezi

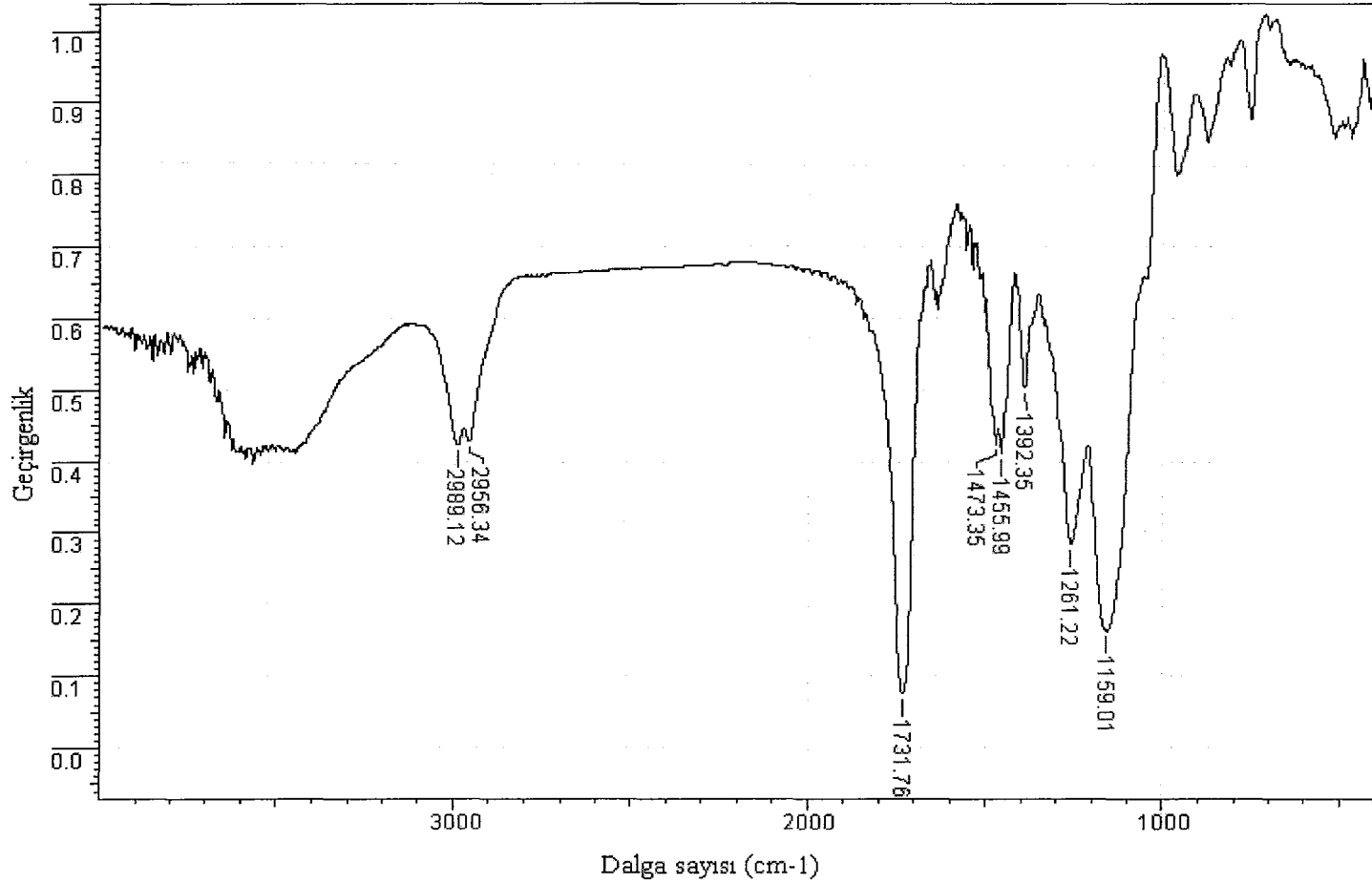
Çizelge 3.1. Hazırlanan mikrokürelerin monomer bileşimi (mol%)

	Tetrafenilporfirin	Akrilamid	EDMA	Stabilizör
1	1,0	39,0	60,0	PVA
2	0,5	39,5	60,0	PVA
3	0,1	39,9	60,0	PVA
4		40,0	60,0	NaCl-MgCl ₂
5			100	PVA

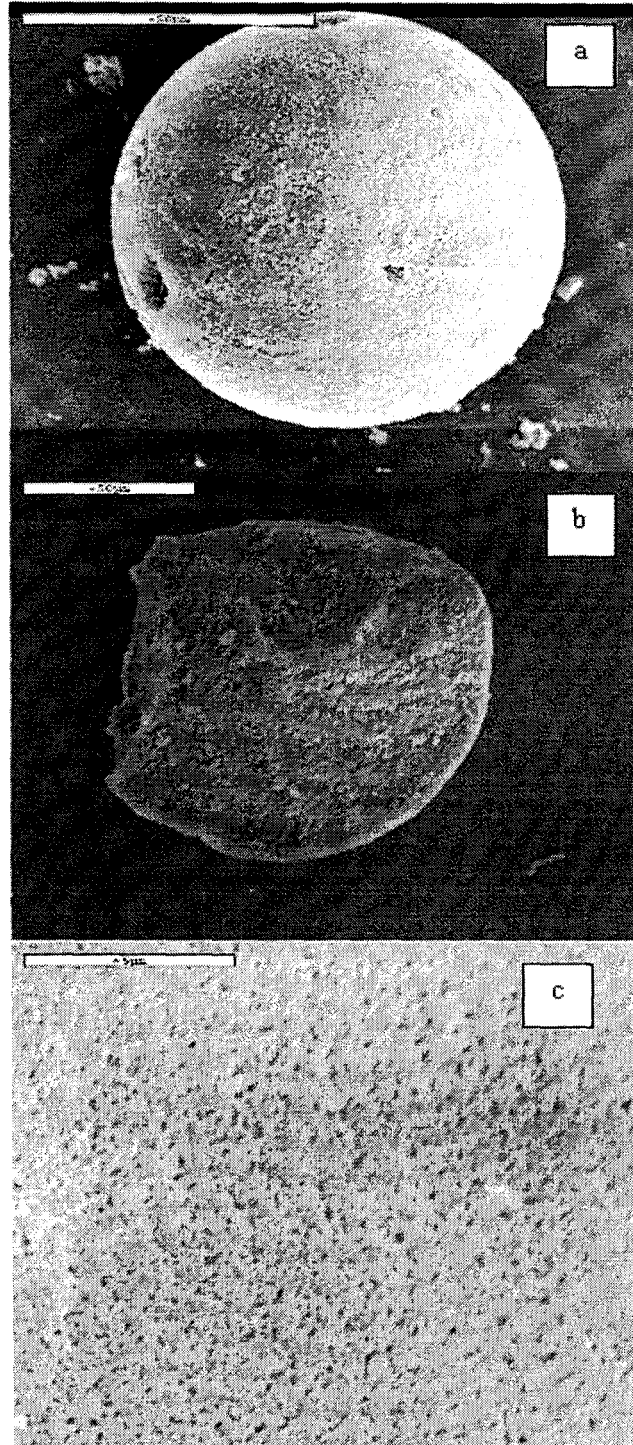
Süspansiyon polimerizasyonu sonunda elde edilen tetrafenilporfirin ligandlı mikrokürelerin boyutlarının homojen olmadığı bir dağılım gösterdiği ve renklerinin tetrafenilporfirinin renginden dolayı mor – koyu mor oldukları görülmüştür. 5-(4-Metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin polimerizasyon reaksiyonunun katılıp katılmadığı yani tetrafenilporfirin ligandının polimerik mikrokürelerdeki zincirlere (kovalent bağlarla) bağlı olup olmadığını anlamak için bir miktar polimerik mikroküre kloroform içine konularak bir gün bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirinin iyi bir çözücü olan kloroforma geçmediği yani bu porfirinin mikrokürelerden ekstrakte olmadığı görülmüştür. Bu şekilde tetrafenilporfirin ligandının yapıya kovalent bağlarla bağlı olduğu anlaşılmıştır. FTIR çalışmalarında ise tetrafenilporfirine ait pikler tetrafenilporfirinin yapıda %1 den daha az olması nedeniyle gözlenememiş ancak akrilamid ve EDMA'a ait pikler FTIR spektrumlarında yer almıştır (Şekil 3.18).

Adsorban amaçlı kullanılan polimerik mikrokürelerde yüzey alanının büyüklüğü, gözeneklilik, gözenek boyutu gibi özellikler adsorpsiyonu etkileyen parametrelerdir. Genel olarak gözeneklilik adsorpsiyonu artıran bir parametredir. Hazırlanan polimerik mikrokürelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir (Şekil 3.19). Mikrograflardan da görüldüğü şekliyle küresel yapıya sahip olan mikroküreler oldukça gözenekli yapıdadır (Şekil 3.19.a ve c). Ayrıca mikrokürelerin kırılarak alınmış fotoğraflarında da mikrokürelerin iç kısımlarının da gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.19.b). Tetrafenilporfirin içermeyen ve sadece EDMA kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin SEM fotoğraflarına bakıldığı zaman küresel yapıya sahip oldukları ancak yüzeylerinde gözenekliliğin fazla olmadığı görülmektedir (Şekil 3.20).

Tetrafenilporfirin ligandı içeren ve içermeyen polimerik mikroküreler ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucu alınan fotoğraflar ise Şekil 3.21 de verilmiştir. Polimerik mikroküreler homojen olmasa da küresel bir yapıya sahip oldukları görülmüştür.

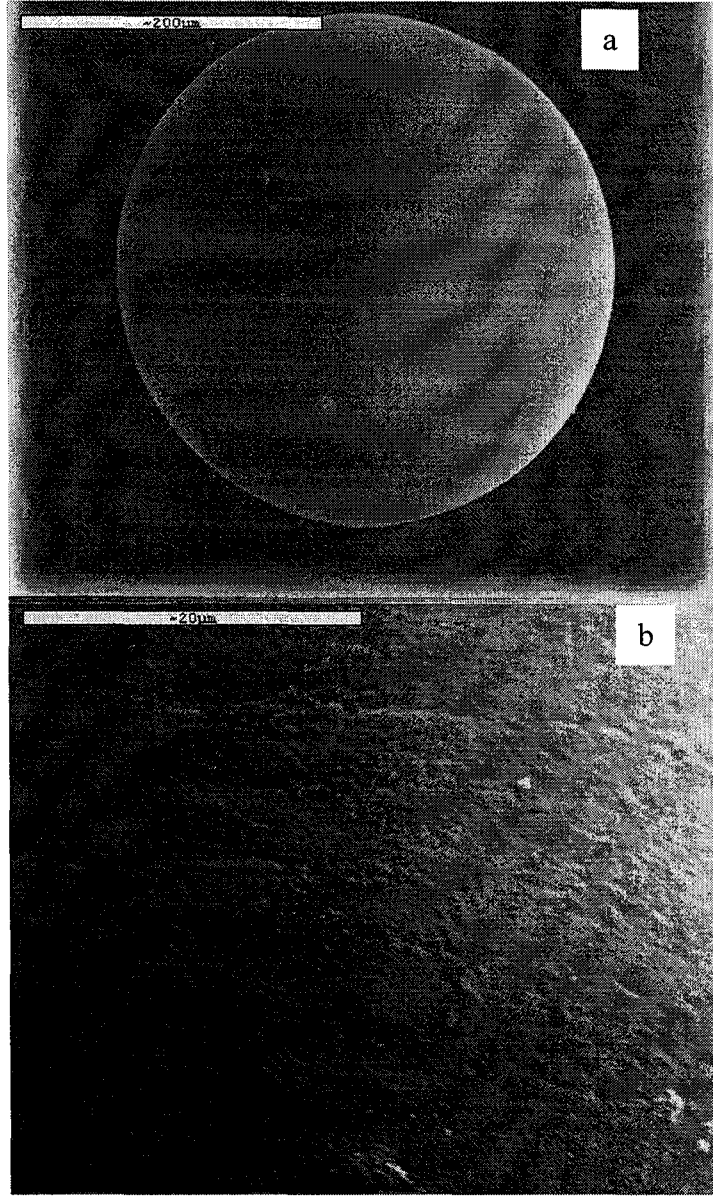


Şekil 3.18. Tetrafenilporfirin ligandı içeren akrilamid-EGDMA kopolimerinin polimerik mikroküreciklerin FTIR spektrum

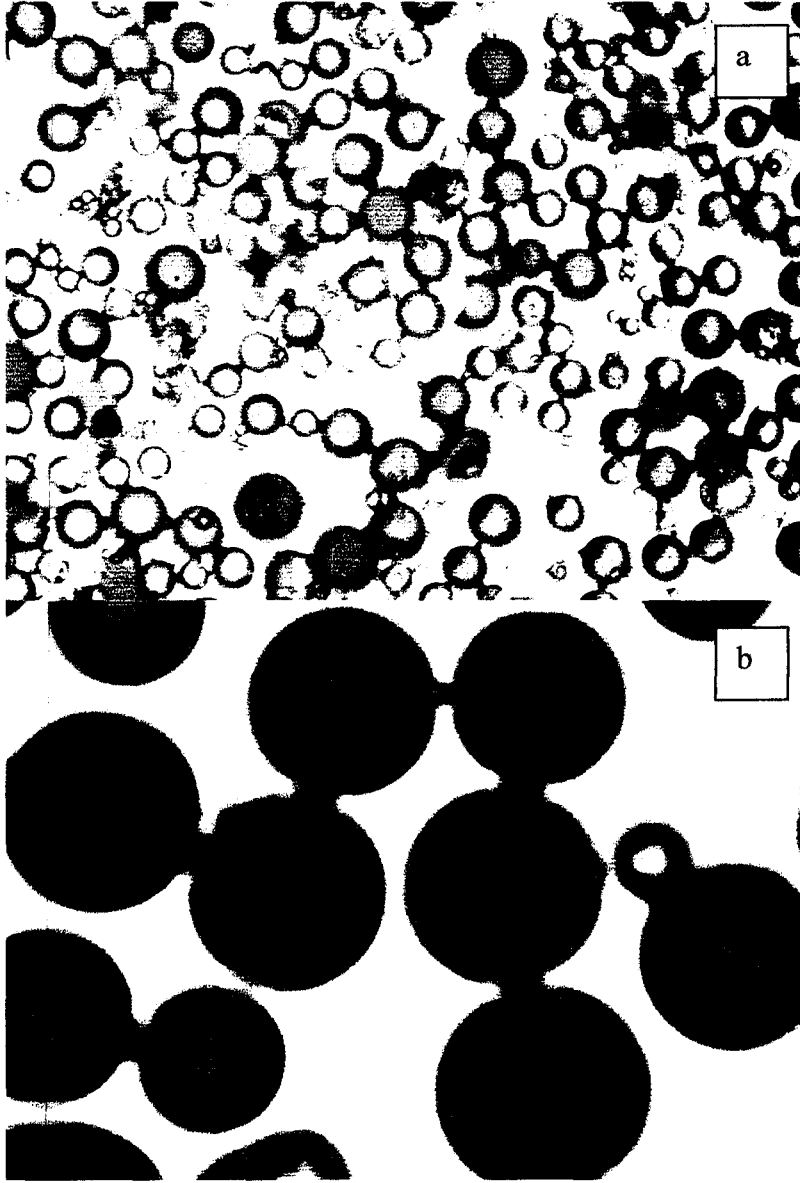


Şekil 3.19. %1,0 Tetrafenilporfirin içeren polimerik mikrokürelerin SEM fotoğrafları
Yüzey, (b) Mikrokürelerin iç kısmı, (c) Yüzey (yakın plan)

(a)



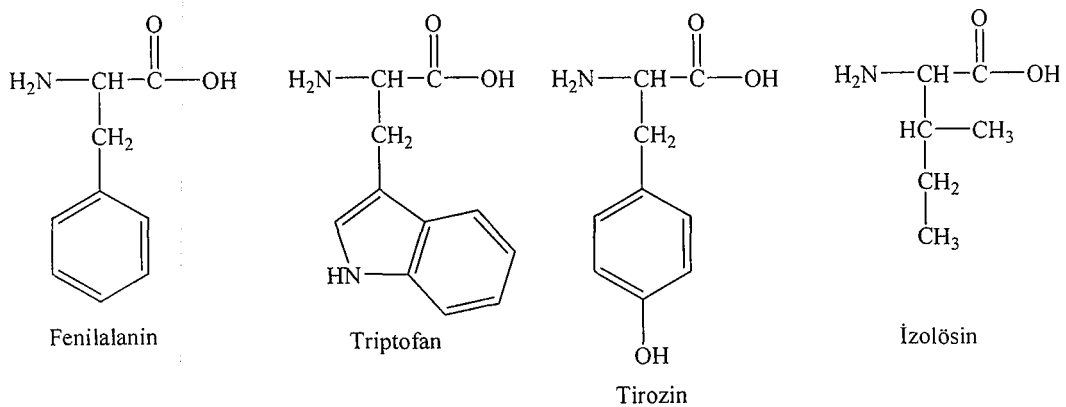
Şekil 3.20. Tetrafenilporfirin ligandı içermeyen ve sadece EDMA içeren polimerik mikrokürelerin SEM fotoğrafları



Şekil 3.21. Tetrafenilporfirin içeren polimerik mikrokürelerin optik mikroskop fotoğrafları

3.2. Bovin Serum Albumin Adsorpsiyon Çalışmaları

Proteinleri oluşturan amino asitlerin bir proteindeki bileşimi, dağılımı ve 3-boyutlu yapıdaki konumları o proteinin hidrofobik-hidrofilik derecesini etkiler. Fenilalanin, tirozin, izolösin ve triptofan gibi amino asitler hidrofobik özelliği fazla olan amino asitlerdir (Şekil 3.22). Bu amino asitlerin protein yapısında sayılarının fazla olması ve özellikle 3-boyutlu yapıda yüzeyde bulunmaları durumunda hem proteinin hidrofobikliği artar hem de proteinin yüzeyinde yama gibi nitelendirilebilecek hidrofobik bölgeler oluşur. Proteinlerin hidrofobisitelerinden yararlanarak bir karışımdan belli bir proteini ayırmak veya saflaştırmak mümkündür [52]. Adsorban ile protein arasında hidrofobik etkileşime neden olan kuvvetler temelde van der Waals kuvvetleridir. Proteini bir adsorban yardımıyla hidrofobik etkileşimlerden yararlanarak ayırma tekniği bir çeşit afinite kromatografisi olan hidrofobik etkileşim kromatografisidir (HEK) [86,138,139]. Bu kromatografik teknikte proteini adsorpsiyona zorlamak için ortamın iyonik kuvveti yüksek tutulur ve bu nedenle yüksek tuz derişimlerinde çalışılan bu yöntem "salting out" kromatografisi de denir [75,76]. Protein ile adsorban arasındaki hidrofobik etkileşimin derecesi protein ve adsorban yapılarına, tuz derişimine ve türüne bağlı olmasının yanında pH'a, sıcaklığa ve başka bazı faktörlere de bağlıdır.



Şekil 3.22. Hidrofobik karaktere sahip bazı amino asitler

Hidrofobik etkileşim ile protein adsorpsiyonunu gerçekleştirmek için genellikle n-alkil (özellikle n-bütül), fenil, aminoalkil gibi ligandların agaroz,

poliakrilamid, silika gibi hidrofilik matrikslere bağlanması ile elde edilen adsorbanlar kullanılır [77,78]. Hidrofobik etkileşim yardımıyla adsorplanan protein miktarı artan tuz derişimi veya iyonik kuvvet ile genel olarak doğrusal bir değişim gösterir. Bunun nedeni de iyonik kuvvetin artması sonucu çözeltilerin yüzey geriliminin artması ve bunun güçlü hidrofobik etkileşimlere neden olmasıdır. Kısacası tuz derişimi ne kadar yüksek ise, protein ile adsorban arasındaki hidrofobik etkileşim o derece güçlü olur. Genelde tuz olarak Na_2SO_4 , NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılır.

Hearn ve arkadaşlarının yaptıkları termodinamiksel çalışmalar, biyomoleküller ile hidrofobik adsorbanlar arasında etkileşimin adsorpsiyon ile sonuçlanmasının nedeninin adsorpsiyon entalpisinden ziyade entropik nedenlerden kaynaklandığını göstermiştir [99]. İlk bakışta adsorpsiyonun entropide azalışa neden olacağı düşünülse de gerçekte böyle bir süreçte entropinin arttığı belirlenmiştir. Bir protein ile adsorban arasındaki hidrofobik etkileşim sonucu adsorpsiyon 5 basamaklı bir süreç sonucu gerçekleşmektedir. Bu basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

a) Protein yüzeyini kaplayan ve protein ile etkileşen su moleküllerinin ve iyonlarının protein yüzeyinden atılması. Bu basamak proteinin dehidratasyonu ve deiyonizasyonu süreci olarak düşünülebilir.

b) Aynı şekilde hidrofobik adsorbanın yüzeyini kaplayan su moleküllerinin ve iyonlarının adsorban yüzeyinden atılması. Bu da adsorbanın dehidratasyonu ve deiyonizasyonu olarak düşünülebilir.

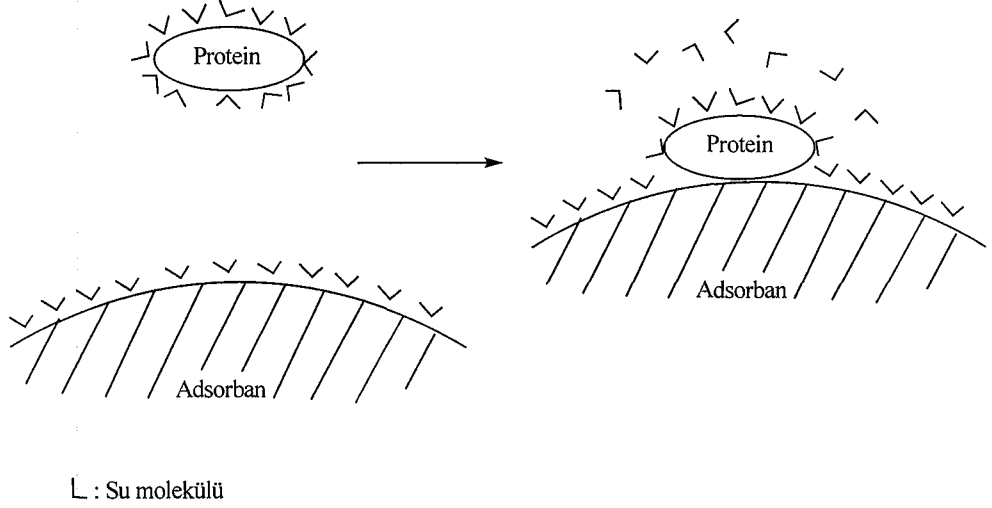
c) Protein ile adsorban arasında hidrofobik etkileşimlerin ortaya çıkması.

d) Adsorpsiyonun gerçekleşmesi ve sonucunda proteinin adsorban yüzeyine yerleşmesi.

e) Protein ve adsorban yüzeylerinden atılan su moleküllerinin ve iyonların sulu faza dağılımları ve bu fazda kendilerini konumlandırmaları.

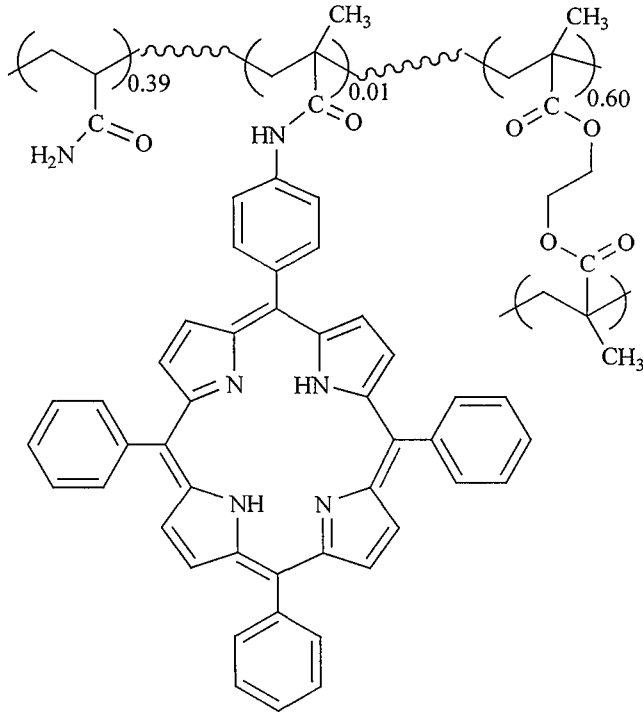
Şekil 3.23'de de şematize edildiği gibi sonuçta su moleküllerinin ve iyonların hidrofobik protein ve hidrofobik adsorban üzerinde buldukları adsorpsiyon öncesi daha düzenli yapıdan adsorpsiyon sonucu yüzey azalması nedeniyle daha az düzenli sıvı faza gitmeleri entropide net bir artışa

($\Delta S_{\text{adsorpsiyon}} > 0$) neden olmakta ve bu termodinamik etken adsorpsiyon için yürütücü kuvvet olmaktadır.



Şekil 3.23. Apolar karakterdeki bir proteinin hidrofobik bir adsorbana adsorpsiyonu sonucu daha az düzenli bir yapının oluşması

Bu çalışmada hidrofobik tetrafenilporfirin ligandı bağlanmış gözenekli polimerik mikroküreler ile bovin serum albumin (BSA) arasındaki hidrofobik etkileşimlerin neden olduğu adsorpsiyon araştırılmıştır. Şekil 3.24 de adsorbantın kimyasal yapısı gösterilmiştir.



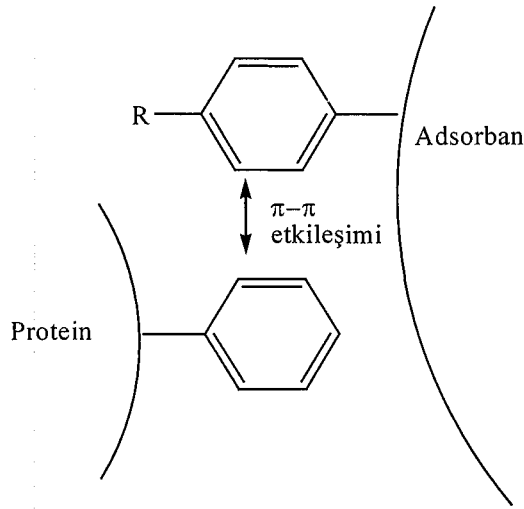
Şekil. 3.24. Tetrafenilporfirin ligandı içeren polimerik adsorbanın yapısı

Porfirin makrohalkası, düzlemsel bir yapıdır ve fenil grupları makro porfirin halkasına göre dönme şansına sahiptirler. Tetrafenilporfirinin yapısında dekolize yada konjügasyonda olan çok sayıda (23 adet) π bağı bulunmaktadır. Protein adsorpsiyonu ve saflaştırılması amacıyla π - π etkileşimlerinden de yararlanan bir kromatografik yöntem vardır ve bu yöntem yük transfer kromatografisi olarak bilinir [140]. Bu yöntemde aromatik ligandların proteindeki uygun yapılı (aromatik halka içeren) amino asitlerle π - π etkileşimi adsorpsiyonun yürütücü kuvvetidir (Şekil 3.25). Bu çalışma için hazırlanmış tetrafenilporfirin ligandının bovin serum albumin ile hidrofobik etkileşim yanında kuvvetli π - π etkileşimi de yapması beklenir (Şekil 3.26). Tetrafenilporfirin ligandı dışında polimerik yapının hidrofilik karakterde olmasına dikkat edilmiştir. Böylece BSA ile adsorban arasındaki hidrofobik etkileşimlerin hidrofobik ligand tetrafenilporfirin aracılığıyla gerçekleşmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

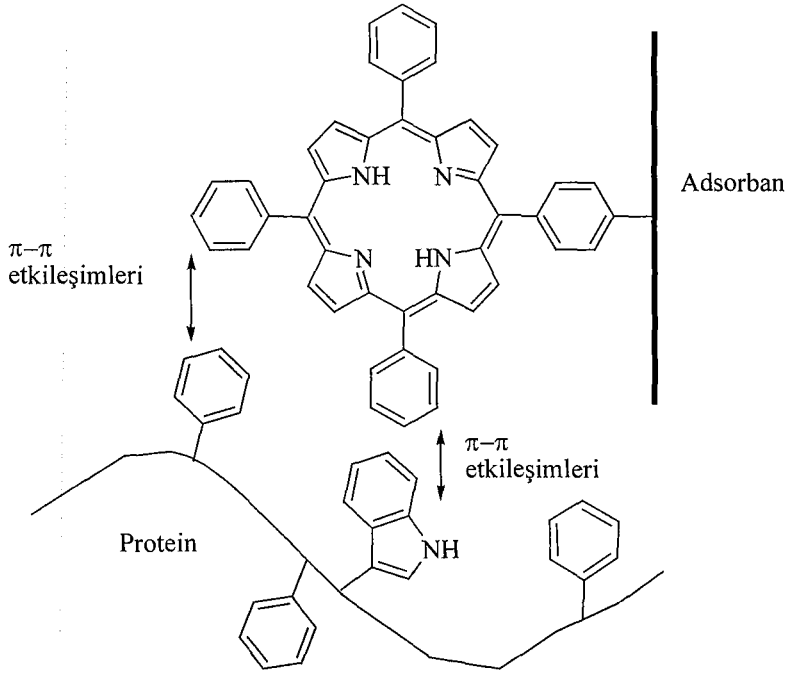
BSA'nin mol kütlesi 69000'dir. Bu proteinin izoelektrik noktası (pI) 4,7 olup 60 boyuta sahip küresel şekilli proteindir [46]. Bovin serum albumin (BSA) adsorpsiyon deneyleri 5 ml çözeltilde, 5 mg %1 tetrafenilporfirin içeren

adsorban (Şekil 3.24), 0,2-2,5 mg/ml BSA, 0-2 M Na_2SO_4 ve 20 mM tampon çözelti derişimlerinde oda sıcaklığında test tüpünde karıştırılarak yürütülmüştür. Deneylede pH 6-8 de 20 mM sodyum fosfat tamponu ve pH 4-5 de 20 mM sodyum asetat tamponu kullanılmıştır. Adsorpsiyon sonunda bağlanmamış protein derişimini Bradford assay yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [31]. Proteinin başlangıçtaki miktarından bağlanmamış protein miktarı çıkarılarak adsorplanmış protein miktarı bulunmuştur.

Adsorpsiyon deneylerinde BSA adsorpsiyonuna tuz (Na_2SO_4) derişiminin, kullanılan tuz türünün, pH'ın, protein derişiminin ve kullanılan adsorban türünün etkisi incelenmiştir.



Şekil 3.25. Yük transfer kromatografisinde proteinin adsorbana bağlanmasını sağlayan π - π etkileşimleri

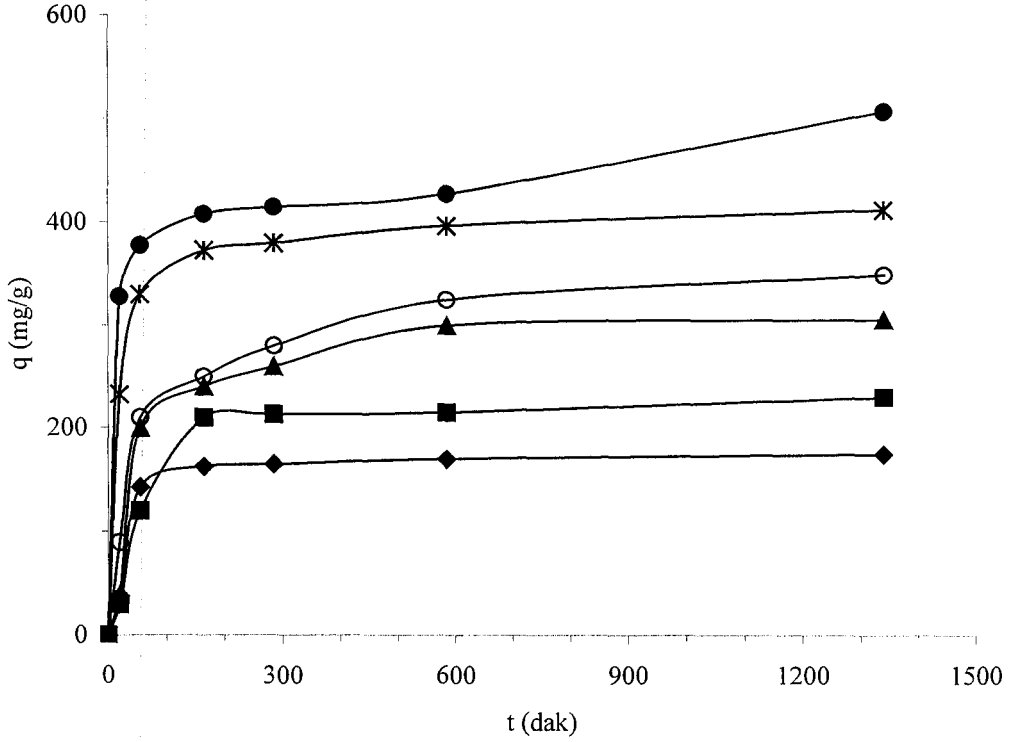


Şekil 3.26. BSA yüzeyindeki π bağlarına sahip amino asit kalıntılarının porfirin halkasındaki ve fenil gruplarındaki π bağları ile π - π etkileşiminin şematik gösterimi

3.2.1. Adsorpsiyona Tuz Derişiminin ve Türünün Etkisi

Adsorban ile BSA arasında hidrofobik etkileşimi kuvvetlendirmek için ortama konulacak tuz olarak sodyum sülfat (Na_2SO_4) seçilmiştir. Bu tuzun seçilmesinin nedeni SO_4^{2-} iyonunun bir adsorban ile protein arasındaki hidrofobik etkileşimi PO_4^{3-} iyonundan sonra artırıcı yönde en fazla etkileyen iyon olmasıdır. Na^+ iyonunun "salting-out" etkisi ise genel katyonlar içinde orta derecede yer almaktadır [77]. Na_2SO_4 derişiminin BSA adsorpsiyonuna etkisini görmek için biri BSA'nın izoelektrik noktasının üstündeki bir pH da (pH 7,0) ve diğeri altındaki bir pH da (pH 4,0) iki çalışma yürütülmüştür. pH 7,0 de yürütülen deneylerde beklenildiği gibi Na_2SO_4 derişimi artıkça adsorplanan BSA miktarı artmıştır (Şekil 3.27). pH 7,0 de hiç tuz içermeyen çözeltide yapılan deneyde adsorpsiyon kapasitesi (q) 150 mg/g-adsorban civarında iken 2,0 M Na_2SO_4 derişiminde bu değer 400 mg/g-adsorban değerinin üstünde gerçekleşmiştir.

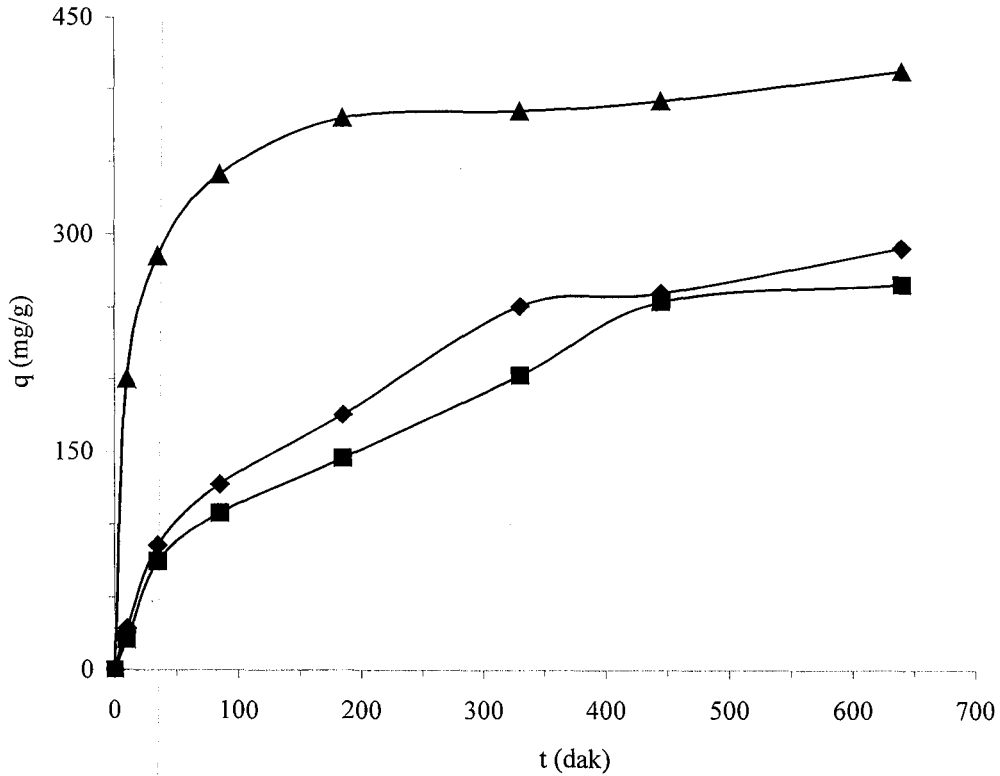
Belirtilmesi gereken bir diğer noktada Na_2SO_4 derişimi ne olursa olsun BSA adsorpsiyonunun yaklaşık bir saat içinde dengeye ulaşmış olmasıdır. 1M Na_2SO_4 derişiminde, pH 4,0 de yapılan bir deneyde ise adsorplanan protein miktarı pH 7,0 de elde edilen değere göre 1,75 kat daha yüksek olmuştur



Şekil 3.27. pH 7,0 de BSA adsorpsiyonuna Na_2SO_4 derişimine bağıllığı [Na_2SO_4] = 2.0 (●), 1.0 (*), 0.5 (○), 0.25 (▲), 0.125 (■) ve 0 M (◆) BSA = 5 mg, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, 20 mM fosfat tamponu

Farklı tuzların protein ile adsorban arasındaki hidrofobik etkileşimleri etkiledikleri bilinmektedir. Bunun nedeni farklı tuzların içinde buldukları çözeltinin yüzey gerilimini farklı oranda artırmalarıdır [77]. Tuz çözeltisi olarak Na_2SO_4 yerine 1 M'lık NaCl ve 1M'lık $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın kullanıldığı deneylerde 1M'lık Na_2SO_4 kullanılan deneylerde elde edilen adsorplama kapasitesine göre daha düşük maksimum adsorplama kapasiteleri elde edilmiştir (Şekil 3.28). Gerek NaCl 'ün gerekse $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın molal yüzey gerilim artış değerleri Na_2SO_4 'ın molal yüzey gerilim artış değerlerinden düşük olduğundan bu beklenen bir

sonuçtur. Ayrıca her iki tuz içinde adsorpsiyon dengesine ancak 8-10 saatte ulaşılabilmiştir.



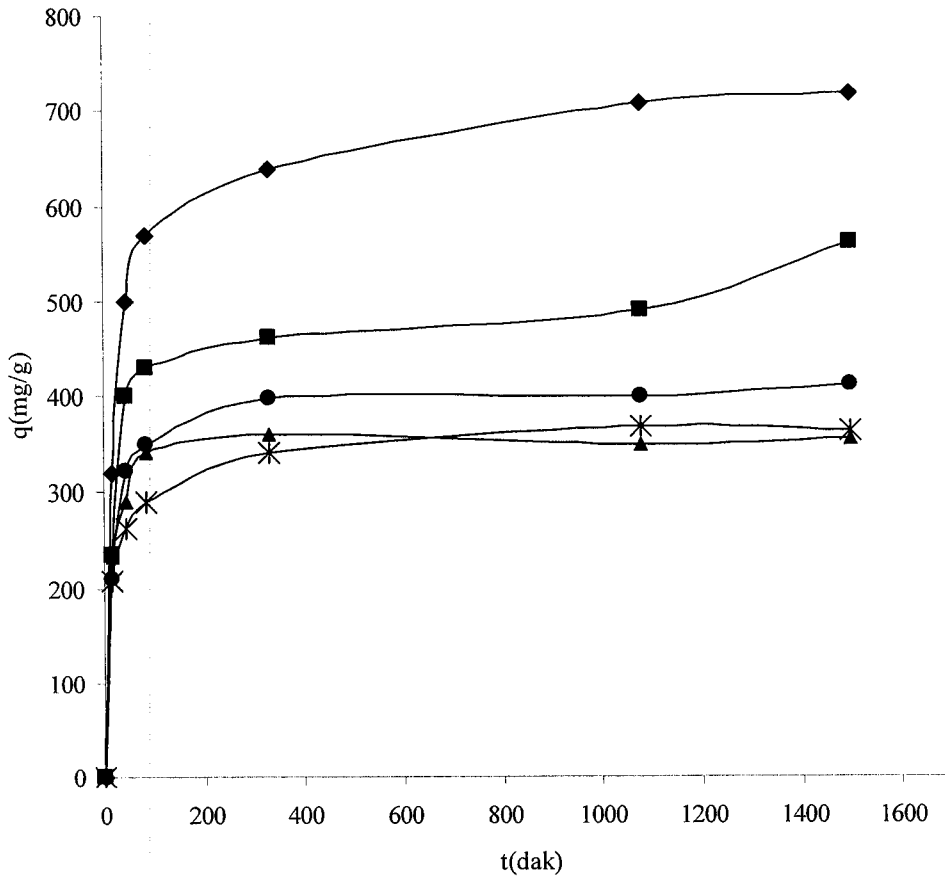
Şekil 3.28. Tuz yapısının pH 7,0 de BSA adsorpsiyonuna etkisi, tuzlar: Na₂SO₄ (▲), NaCl (◆) ve (NH₄)₂SO₄ (■), BSA=5 mg, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, Tuz =1 M, 20 mM fosfat tamponu

3.2.2. pH Etkisi

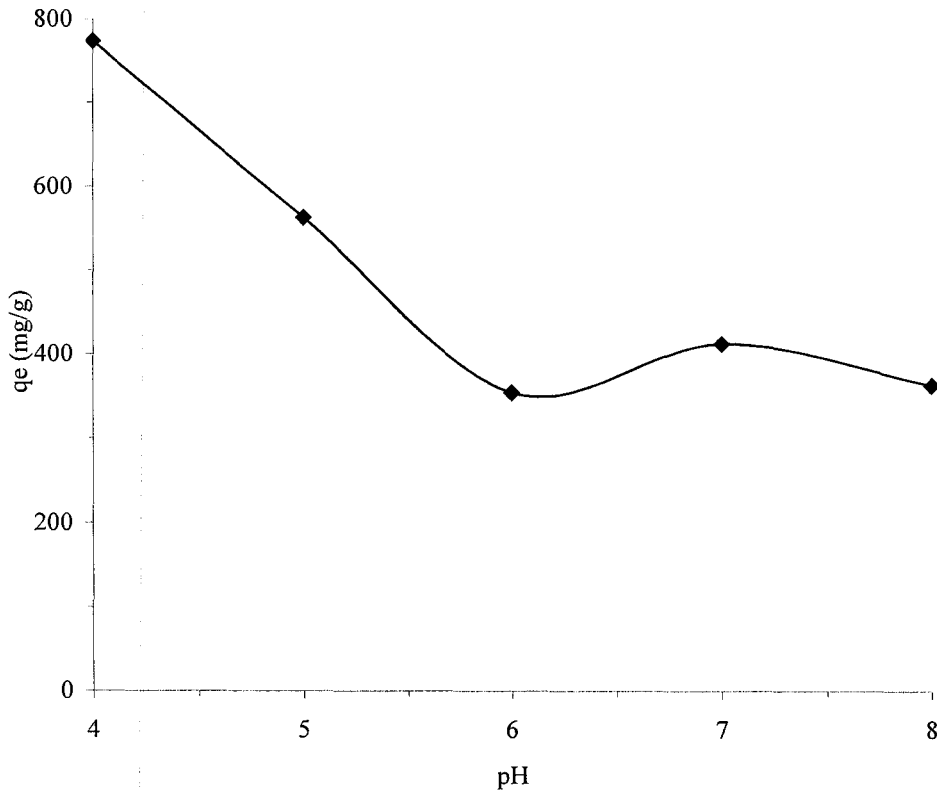
Hidrofobik etkileşim ile protein adsorpsiyonunda tuz derişimi ve türü yanında çözeltinin pH'ı da önemli bir faktördür [112,141,142]. Genellikle pH değerindeki artış protein ve adsorban arasındaki hidrofobik etkileşimi düşürür. Bundan dolayı proteinin yükündeki değişim ile hidrofobitesindeki değişim ilişkilidir.

BSA in izoelektrik noktası (pI) 4,7 olduğundan adsorpsiyonun pH'a bağlılık deneyleri pH 4,0-8,0 aralığında 1 mg/ml başlangıç BSA derişimlerinde yapılmıştır (Şekil 3.29). Bu pH aralığında tetrafenilporfirin ligandlı adsorbanın

yükünde net bir değişme beklenmemesine karşılık BSA'nın net yükü değişmektedir. Deneyler sonunda pH 5,0 ve 4,0 de adsorbanın protein adsorplama kapasitesinin pH 6,0-8,0 aralığında elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Genelde q değerinin BSA net yükünün negatif olduğu pH 6,0, 7,0 ve 8,0 de pek değişmediği buna karşılık proteinin net yükünün pozitif olduğu pH 4,0 de 1 gram adsorban başına adsorplanan BSA miktarının neredeyse 2 katına çıktığı görülmüştür. pH'a karşı q değerleri grafiği Şekil 3.30'da verilmiştir. Şekilden de anlaşıldığı gibi protonlanmış veya pozitif yüke sahip BSA'nın adsorbana karşı afinitesi net negatif yüke sahip olduğu duruma göre daha yüksektir. Buda $pH < pI$ olduğu durumlarda adsorpsiyona hidrofobik ve $\pi-\pi$ etkileşimlerinin yanında iyonik etkileşimlerinde katıldığını göstermektedir. Bütün pH değerlerinde adsorpsiyon dengesinin 1,5 saat içinde gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 3.29. BSA adsorpsiyonunun pH'a bağlılığı, pH 4,0 (◆), 5,0 (■), 6,0 (▲), 7,0 (●) ve 8 (*), BSA = 5 mg, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, $[Na_2SO_4] = 1$ M, Tampon: 20 mM fosfat veya asetat



Şekil 3.30. BSA adsorpsiyonunda maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH'a bağlılığı, BSA = 5 mg, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, [Na₂SO₄] = 1 M, Tampon: 20 mM fosfat veya asetat

3.2.3. Başlangıç BSA Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

Başlangıç BSA derişiminin BSA'in adsorpsiyon davranışına etkisi pH 7,0 ve pH 4,0 de 1M'lık Na₂SO₄ çözeltilerinde incelenmiştir (Şekil 3.31 ve 3.32). Her iki pH'da da artan protein başlangıç derişimi ile adsorbanın BSA'i adsorplama kapasitesinin genelde arttığı ancak yüksek protein başlangıç derişimlerinde (C>1 mg/ml) adsorplama kapasitesindeki artışın durduğu veya yavaşladığı görülmüştür. pH 4,0 da yürütülen deneylerde başlangıç derişimi 0,8 mg/ml ve üstünde iken q_{mak} değerinin yaklaşık 700 mg BSA/g-adsorban değerinde sabitlendiği ve pH 7,0 de ise q_{mak} değerinin BSA başlangıç derişimi 1,5 mg/ml ve üstünde iken aşağı-yukarı aynı kaldığı bulunmuştur. Her iki pH daki adsorpsiyon için elde edilen verilere uygun Langmuir izoterm modellemesi yapılmıştır. Langmuir izotermelerini veren Langmuir bağıntısı

$$q_e = \frac{q_m C_e}{K_d + C_e} \quad (3.1)$$

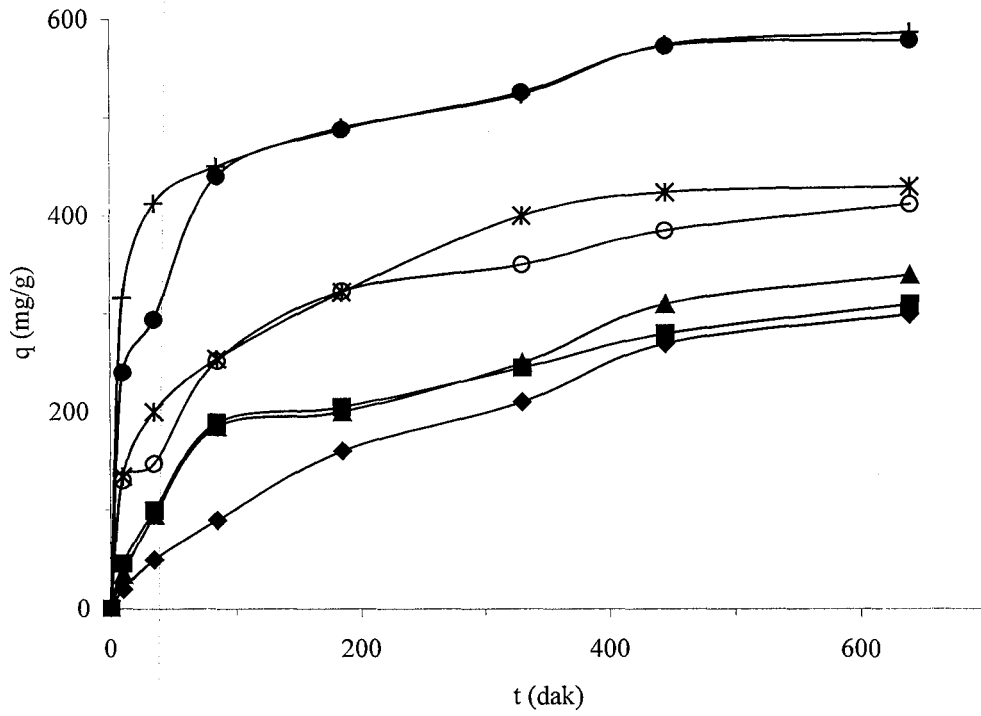
şeklindedir. Burada q_e , adsorplanmış proteinin dengedeki miktarı ve C_e , proteinin sulu fazda dengedeki derişimidir. q_m ise adsorpsiyon kapasitesi olarak ve tek tabakalı bir adsorpsiyonda adsorbanın birim miktarıdır (örneğin gramı başına adsorplanmış proteinin miktarıdır). K_d ise ayrışma (disosiasyon) sabiti olarak bilinir. Bir adsorpsiyon için q_m ve K_d değerleri yukarıda verilmiş olan Langmuir bağıntısının aşağıda verilmiş olan doğru denklemine indirgenmiş hali kullanılarak bulunabilir.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{K_d}{q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (3.2)$$

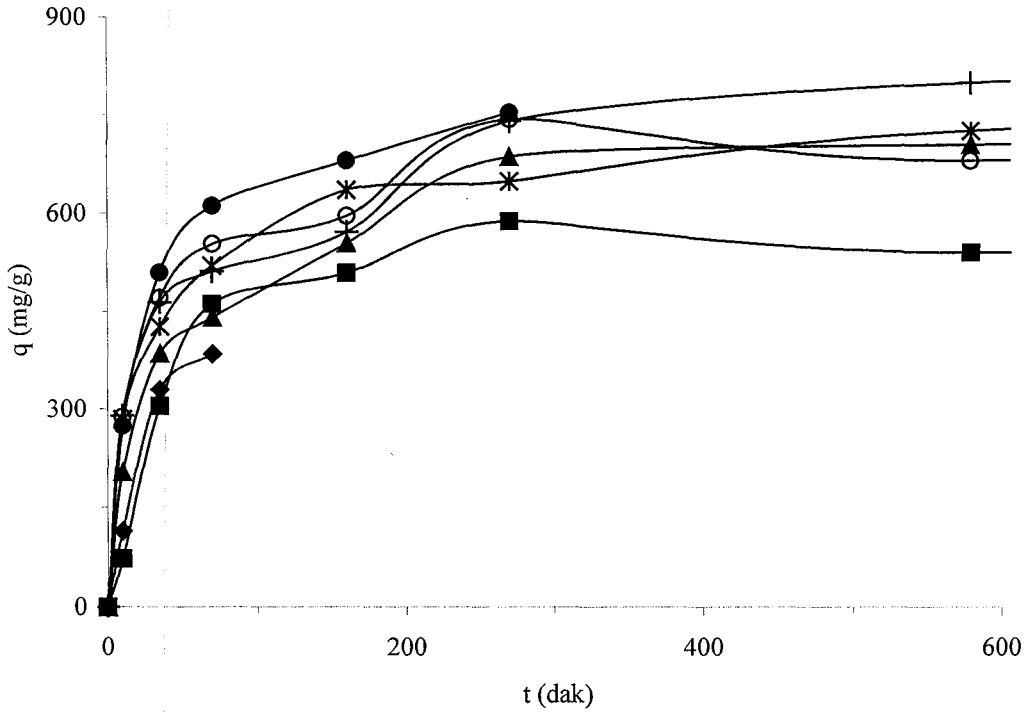
Eşitlik 3.2 bağıntısına göre çizilmiş C_e 'ye karşı (C_e/q_e) grafiği Şekil 3.33 de verilmiştir. Grafikten pH 4,0 ve 7,0 de elde edilen verilere ait noktalara en iyi uyan doğruların eğimlerinden ve y-kaymalarından q_m ve K_d için şu değerler elde edilmiştir:

pH 4,0	$q_m = 775 \pm 7$ mg BSA/g adsorban	$K_d = 1,21 \times 10^{-2}$ mg/mL
pH 7,0	$q_m = 625 \pm 4$ mg BSA/g adsorban	$K_d = 0,170$ mg/mL

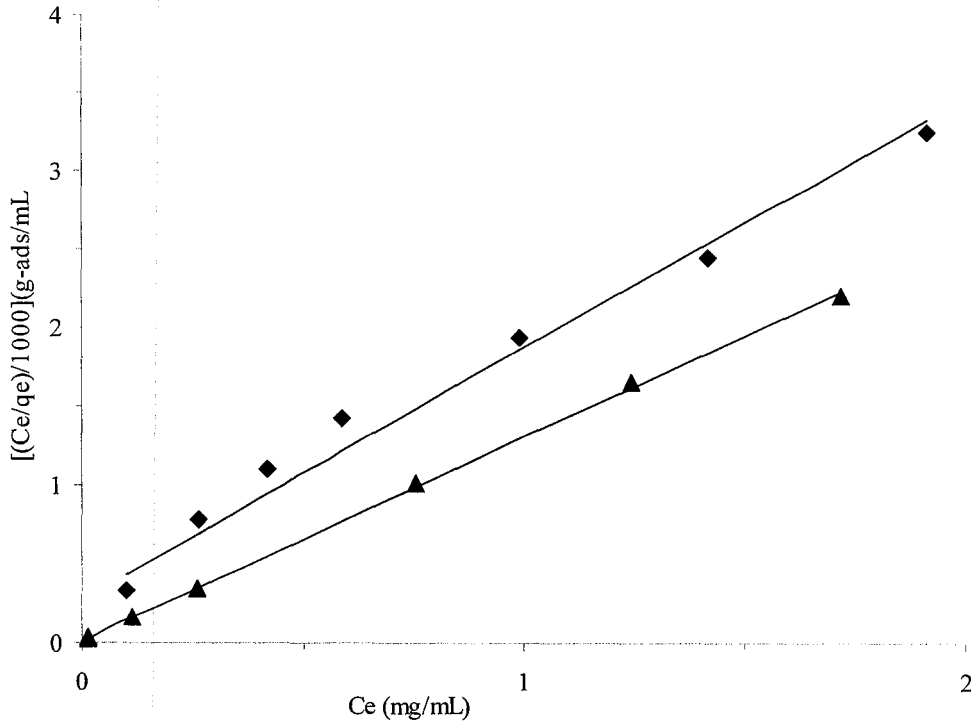
Her iki pH içinde oldukça düşük K_d değerleri elde edilmiştir. K_d 'nin tersi afinite sabiti (K_a) olduğundan K_d 'nin küçük olması BSA'in adsorban ile etkileşiminin yüksek olduğunu ve iki pH değerleri karşılaştırıldığında protein ile adsorban arasındaki etkileşimin pH 7.0 ye göre pH 4,0 de daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da pH 4,0 de iyonik etkileşimlerinde adsorpsiyona katkıda bulunduğunu göstermektedir (Şekil 3.33).



Şekil 3.31. pH 7.0 de, BSA adsorpsiyonunun başlangıç BSA derişimine bağılılığı, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ M}$, 20 mM fosfat tamponu, BSA başlangıç derişimleri: 2.5 (+), 2.0 (●), 1.5 (*), 1.0 (○), 0.8 (▲), 0.6 (■) ve 0.4 (◆) mg/mL



Şekil 3.32. pH 4,0 de BSA adsorpsiyonunun başlangıç BSA derişimine bağılılığı, BSA = 0,4-2,5 mg/ml, Adsorban =5 mg, V = 5 ml, [Na₂SO₄] =1 M, 20 mM asetat tamponu, BSA başlangıç konsantrasyonları 2,5 (+), 2,0 (●), 1,5 (*), 1,0 (○), 0,8 (▲), 0,6 (■) ve 0,4 (◆) mg/mL

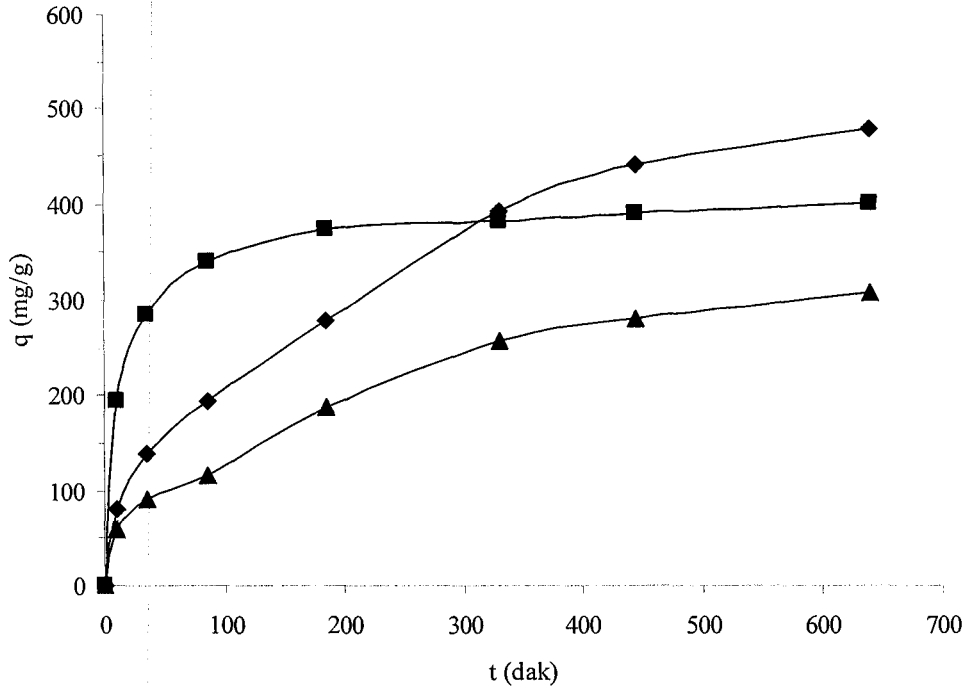


Şekil 3.33. BSA denge derişimine karşı (C_e/q_e) grafiği ve Langmuir izotermi. BSA =0,4-2,5 mg/ml, Adsorban =5 mg, V = 5 ml, $[Na_2SO_4] = 1$ M, 20 mM fosfat veya asetat tamponu, pH 4,0 (▲) ve pH 7,0 (◆)

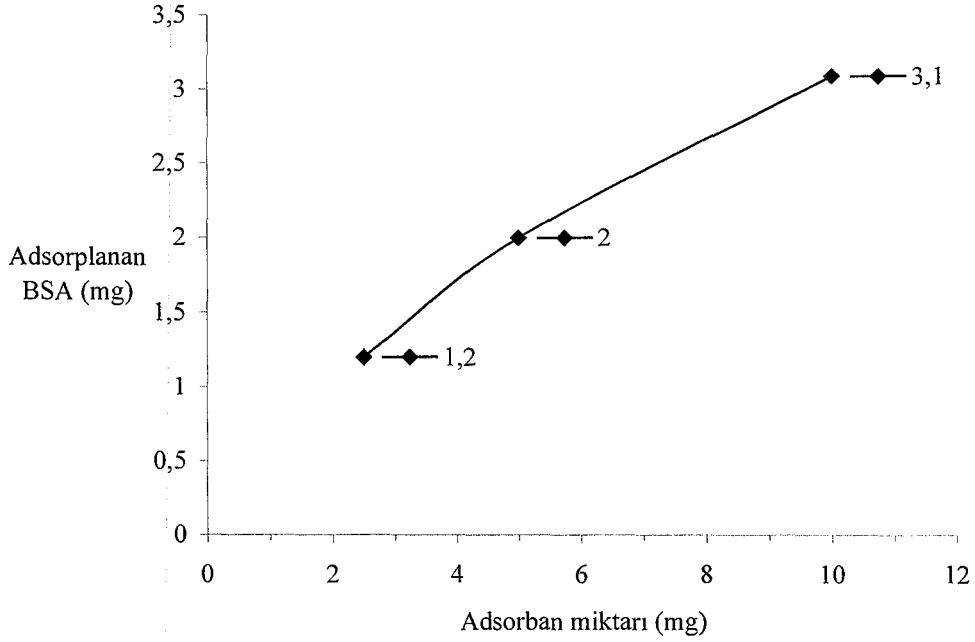
3.2.4. BSA Adsorpsiyonuna Adsorban Miktarının Etkisi

BSA adsorpsiyonunun adsorban miktarı ile değişimi 1 M Na_2SO_4 çözeltisi içinde ve pH 7.0 de incelenmiştir (Şekil 3.34). Deneyler 2,5 mg, 5,0 mg ve 10,0 mg miktarlarındaki adsorbanlar ile 1 mg/mL BSA başlangıç derişiminde BSA içeren çözeltilerde yürütülmüştür. 650 dakika izlenen adsorpsiyon sonunda adsorpsiyon kapasitesi için en yüksek değer 2,5 mg lık adsorban kullanıldığı zaman elde edilmiştir. 2,5 mg, 5,0 mg ve 10,0 mg adsorbanlar kullanıldığı zaman adsorpsiyon kapasiteleri sırayla 480 mg BSA/g-adsorban, 400 mg BSA/g-adsorban ve 308 mg BSA/g-adsorban elde edilmiştir. Adsorban miktarındaki artışa karşılık adsorbanın adsorpsiyon kapasitesinde düşme gözlenirken ortama konulmuş olan 5 mg BSA den adsorplanan miktar ise beklenildiği şekilde adsorban miktarları ile artmıştır. Ortamda 2,5 mg, 5,0 mg ve 10,0 mg adsorbanlar

bulduğunda sırayla BSA 5 mg'nın 1,2 mg, 2,0 mg, 3,1 mg'ı adsorplanmıştır (Şekil 3.35).



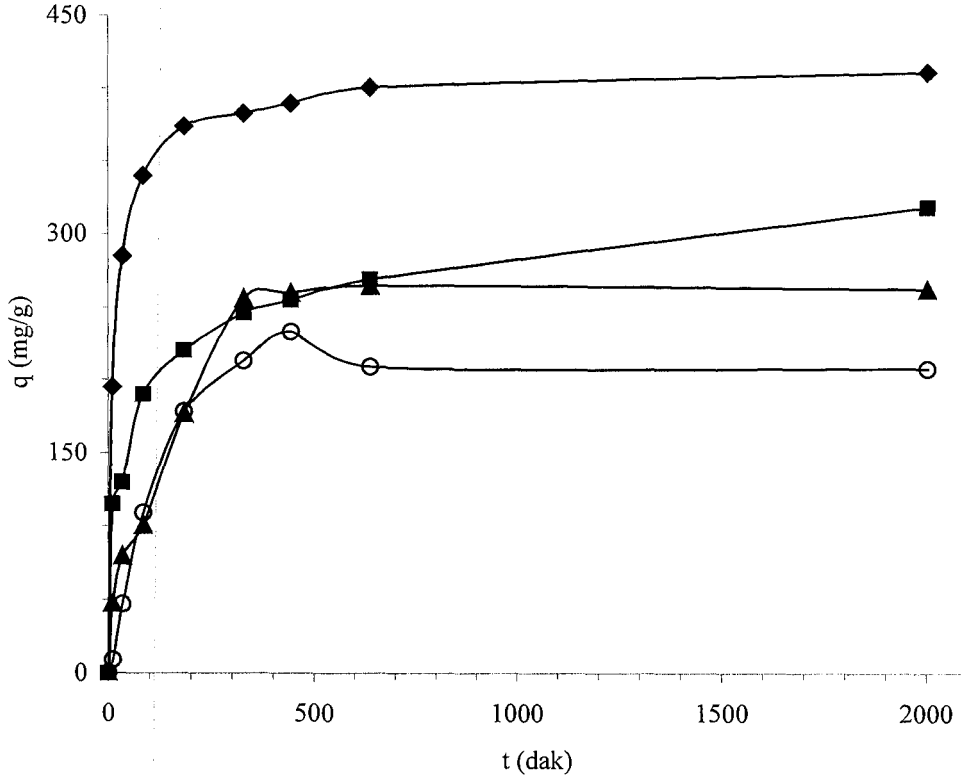
Şekil 3.34. Adsorban miktarının BSA adsorpsiyonuna etkisi, pH 7,0, BSA = 5 mg, V = 5 ml, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ M}$, 20 mM fosfat tamponu. Adsorban miktarı: 2,5 mg (◆), 5,0 mg (■) ve 10,0 mg (▲)



Şekil 3.35. Adsorplanan BSA miktarının adsorban miktarı ile değişimi, pH 7,0, Başlangıç BSA miktarı = 5 mg, V = 5 ml, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ M}$, 20 mM fosfat tamponu.

3.2.5. Adsorban Türünün Etkisi

Tetrafenilporfirin ligandının BSA adsorpsiyonuna etkisini görmek için bu ligandı içermeyen EDMA, %40 akrilamid-EDMA ve %40 akrilikasit-EDMA'dan üretilmiş mikroküreler adsorban olarak kullanılmıştır. pH 7,0 de 1 M Na_2SO_4 derişiminde yürütülen deneylerde bu adsorbanların maksimum adsorplama kapasitelerinin % 1 tetrafenilporfirin ligandı içeren adsorbana göre daha az olduğu görülmüştür (Şekil 3.36). Bu da porfirinin protein etkileşiminin adsorpsiyona önemli ölçüde katkı sağladığını göstermektedir. Ayrıca porfirin içermeyen adsorbanlar kullanıldığında adsorpsiyon dengesine daha uzun sürede ulaşıldığı görülmüştür.



Şekil 3.36. Adsorban türünün BSA adsorpsiyonuna etkisi, pH 7,0, BSA = 5 mg, Adsorban = 5 mg, V = 5 ml, $[Na_2SO_4] = 1$ M, 20 mM fosfat tamponu. Adsorbanlar 40% akrilik asit – EDMA kopolimeri (O), EDMA polimeri (▲), 40% akrilamid – EDMA kopolimeri (■) ve % 1 tetrafenilporfirin içeren adsorban - EDMA (◆)

3.3. Bovin Serum Albumin Desorpsiyon Deneyleri

BSA'nın adsorbanlardan desorpsiyonunun neredeyse tersinmez olduğu gözlenmiştir. Desorpsiyon deneyleri saf suda, 0,1 ve 1,0 M NaCl, 1,0 M KSCN, 0,2 M EDTA, 0,2 M okzalik asit, 0,2 M tartarik asit ve 0,2 M süksinik asit çözeltileri ile yapılmıştır. BSA adsorplanmış adsorban mikroküreleri deney tüpü içinde manyetik karıştırıcı ile 8 saat karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda deney tüpleri 3000 dev/dk santrifüj edilmiş ve ortamdan alınan çözeltilerde BSA varlığı ve miktarı araştırılmıştır. Deneyler sonunda saf su, okzalik asit, EDTA, tartarik asit ve süksinik asit içeren çözeltilerde herhangi bir desorpsiyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. NaCl ve KSCN çözeltilerinde ise adsorplanmış BSA'nın %10 dan daha azının desorbe olduğu görülmüştür. Desorpsiyona

sıcaklığın etkisi de düşünülerek, 0,1 M NaCl içeren çözelti +4 °C de bir gün bekletilmiş ve bu süre sonunda da BSA'in ancak % 10'u desorbe olmuştur.

Bu sonuç tetrafenilporfirin içeren adsorban ile BSA arasındaki hidrofobik ve π - π etkileşimlerin oldukça kuvvetli olduğunu, BSA'nin adsorbana tutunup kovalent bağlanma olmaksızın da adsorbana bağlı kalabildiği görülmüştür.

3.4. Sonuç

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Polimerleşebilen 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezi üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada mononitrolu porfirin literatürde verilen yönteme göre sentezlenmiştir [4,6] ve verimi %2,5 olarak bulunmuştur. İkinci aşamada elde edilen mononitrolu porfirin kalay klorür katalizörlüğünde indirgenmiş ve monoaminli porfirin elde edilmiştir. Elde edilen monoaminli porfirinin verimi %84 olarak bulunmuştur. Son aşamada porfirine polimerleşebilme özelliği katabilmek için literatürde verilen benzer yöntemler kullanılarak monoaminli porfirin ile metakrilol klorürün reaksiyonu sonucu 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin sentezlenmiş ve elde edilen ürünün verimi %91 olarak bulunmuştur.
2. Polimerleşebilen 5-(4-metakrilamidofenil)-10,15,20-trifenilporfirin süspansiyon polimerizasyonu ile bir polimerik yapıya katılmıştır. Etilenglikoldimetakrilat çapraz bağlı bu porfirin ligandı içeren poliakrilamid mikroküreler ilk kez bu çalışma ile sentezlenmiştir.
3. Tetrafenilporfirin ligandı içeren bir polimerik adsorbana bir proteinin adsorpsiyonu ilk kez bu çalışmada yapılmıştır. Adsorpsiyon denemeleri kesikli sistemde yürütülmüş ve model protein olarak bovin serum albumin kullanılmıştır. Adsorplanan protein miktarı pH 7,0 da 24 saatte 0-2 M Na₂SO₄ derişiminde 175-508 mg/g-adsorban, 1M Na₂SO₄ derişiminde 24 saatte pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 de sırayla 774, 563, 355, 413, 364 mg/g adsorban olmuştur. Bovin serum albuminin hazırlanan adsorbana hidrofobik etkileşimler ile kuvvetli bir şekilde adsorplandığı gözlenmiştir.
4. Bovin serum albuminin tetrafenilporfirin ligandı içeren adsorbana neredeyse tersinmez olarak adsorbe olduğu (tutuklandığı) bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. LEUNG, S.H. Department of Chemistry Washburn University Topeka, KS 66621 USA, E-Mail: sam.leung@washburn.edu
2. ROTHEMUND, P., *Formation of Porphyrins from Pyrrole and Aldehydes*, J. Amer. Chem. Soc., **57**, 2010-2011 (1935).
3. ROTHEMUND, P., *A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin*, J. Amer. Chem. Soc., **58**, 625-627 (1936).
4. ADLER, A.D., LONGO, F.R., FINARELLI, J.D., GOLDMACHER, J., ASSOUR, J. ve KORSKOFF, L., *A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine*, J. Org. Chem., **32**, 476-476 (1967).
5. BANFI, S., MONTANARI, F. ve QUICI, S., *Investigation on Factors Ruling Catalytic Efficiency and Chemical Stability of Mn(III) Porphyrins in HOCl Olefin Epoxidation: Conditions for Practical Application*, J. Org. Chem., **54**, 1850-1859 (1989)
6. LINDSEY, J.S., SCHREIMAN, I.C., HSU, H.C., KEARNAY, P.C. ve MARGUERETTAZ, A.M., *Rothemund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions*, J. Org. Chem., **52**, 827-836 (1987).
7. LINDSEY, J.S. ve WAGNAR, R.W., *Investigation of the synthesis of ortho-substituted tetraphenylporphyrins*, J. Org. Chem., **54**, 828-836 (1989).
8. WAGNER, R.W., LAWRENCE, D.S. ve LINDSEY, J.S., *An improved synthesis of tetramesitylporphyrin*, Tetrahedron Lett., **28**, 3069-3070 (1987).
9. DOYGHERTY, T.J., GOMER, C.J., HENDERSON, B.W., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J. ve PENG, Q., *Photodynamic Therapy*, J. Natl Cancer Inst., **90**, 889-905 (1998).
10. BARTH, R.F., SOLOWAY, A.H., GOODMAN, J.H., GAHBAUER, R.A., GUPTA, N., BLUE, T. E., YANG, W. ve TJARKS, W., *Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality*, Neurosurgery, **44**, 433-451 (1999).
11. VICENTE, M.G.H., *Porphyrin-based sensitizers in the detection and treatment of cancer: recent progress*, Med. Chem., Anticancer Agents, **1**, 175-194 (2001).
12. OSTERLOH, J. ve VICENTE, M.G.H., *Mechanisms of Porphyrinoid Localization in Tumors*, J. Porphyrins Phthalocyanines, **6**, 305-324. (2002).
13. MARZILLI, L.G., *New J. Chem.*, **14**, 409-420 (1990)
14. BUSTAMANTE, C., GURRIERI, S., PASTERNAK, R.F., PURRELLO, R. ve RIZZARELLI, E., *Interaction of Water-Soluble Porphyrins with Single- and Double-Stranded Polyribonucleotides*, Biopolymers, **34**, 1099-1104 (1994).
15. VILLANUEVA, A. ve JORI, G., *Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4N-methylpyridyl)porphine*, Cancer Lett., **73**, 59-64 (1993).
16. PRATVIEL, G., BERNADOU, J. ve MEUNIER, B., *Carbon - Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs*, Angew. Chem. Int. Ed. England, **34**, 746-769 (1995).

17. LABAT, G. ve MEUNIER B., *Factors controlling the reactivity of a ligninase model based on the association of potassium monopersulfate to manganese and iron porphyrin complexes*, J. Org. Chem., **54**, 5008-5011 (1989).
18. HARRIMAN, A. ve PORTER, G., *Photochemistry of manganese porphyrins. Part 1.—Characterisation of some water soluble complexes*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. II **75**, 1532-1542 (1979).
19. HARRIMAN, A., CHRISTENSEN, P.A., PORTER, G., MOREHOUSE, K., NETA, P. ve RICHOUX, M-C., *Decay of high-valent manganese porphyrins in aqueous solution and catalysed formation of oxygen*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I **82**, 3215-3231 (1986).
20. CARNIERI, N., HARRIMAN, A. ve PORTER, G., *Photochemistry of manganese porphyrins. Part 6. Oxidation–reduction equilibria of manganese(III) porphyrins in aqueous solution*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **78**, 931-938 (1982).
21. CARNIERI, N., HARRIMAN, A., PORTER, G. ve KALYANASUNDARAM, K., *Photochemistry of manganese porphyrins. Part 7. Characterisation of manganese porphyrins in organic and aqueous/organic microheterogeneous systems*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **78**, 1231-1238 (1982).
22. BANFI, S., MONTANARI, F. ve QUICI, S., *Tetrakis(halogenoaryl)porphyrins Featuring Sterically Hindering Electronegative Substituents: Synthesis of Highly Stable Catalysts in Olefin Epoxidation*, J. Org. Chem. **53**, 2863-2866 (1988).
23. BANFI, S., DRAGONI, M., MONTANARI, F., POZZI, G. ve QUICI, S., *Alkene Epoxidations Catalysed by Chemically Robust Mn(III) Porphyrins and Promoted by H₂O₂ Under Aqueous-Organic Two-Phase Conditions in the Absence of Axial Ligand and Phase-Transfer Catalyst: Reaction Mechanism and Large-Scale Preparative Applications*, Gazz. Chim. Ital., **123**, 431-436 (1993).
24. CUI, F., WIJESKERA, T., DOLPHIN, D., FARRELL, R. ve SKERKER, P., *Biomimetic degradation of lignin*, J. Biotechnology, **30**, 15-26 (1993).
25. BİNGÖL, G., *Biyokimya*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye, (1978).
26. GÖZÜKARA, E.M., *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, Türkiye (1997).
27. TEMİZKAN, G., YILMAZER, S., ÖZTÜRK, M., ARI, Ş., ERTAN, H., OLGUN, A., SARIKAYA, A.T. ve ARDA, N., *Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler*. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, Türkiye (1999).
28. WARBURG, O. ve CHRISTIAN, W., *Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase*, Biochem. Z., **310**, 384-421 (1941).
29. GORNALL, A., BARDAWILL, C. ve MAXIMA, D., *Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction*, J. Biol. Chem., **177**, 751-766 (1949).
30. LOWRY, H., ROSEBROUGH, N., FARR, A. ve RANDALL, R., *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

31. BRADFORD, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).
32. KOOSER, A., MANYGOATS, K., EASTMAN, M.P. ve Porter T.L., *Investigation of the antigen antibody reaction between anti-bovine serum albumin (α -BSA) and bovine serum albumin (BSA) using piezoresistive microcantilever based sensors*, Biosensors and Bioelectronics, **19**, 503-508 (2003).
33. PALACIO, L., PRADANOS, C.-C., HERNANDEZ, A. ve ZYDNEY, A.L., *Fouling with protein mixtures in microfiltration: BSA-lysozyme and BSA-pepsin*, Journal of Membrane Science, **222**, 41-51 (2003).
34. GELAMO, E.L., SILVA, C.H.T.P., IMASATO, H. ve TABAK, M. *Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology, **1594**, 84-99 (2002).
35. PETERS, T., Jr. *Serum Albumin*. Adv. Protein Chem., **37**, 161-245 (1985).
36. BROWN, J.R., *Structure of Bovine serum albumin*. Fed. Proc., **34**, 591-591 (1975).
37. BROWNE, W.J., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C., BREW, K., VANAMAN, T.C. ve HILL, R.L. *A possible three-dimensional structure of bovine alpha-lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme*, J. Mol. Biol., **42**, 65-86 (1969).
38. PATTERSON, C., *Homology in classical and molecular biology*, Mol. Biol. Evol. **56**, 603-625 (1988).
39. PATTERSON, J.E. ve GELLER, D.M. *Bovine microsomal albumin: Amino terminal sequence of bovine proalbumin*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 1220-1226 (1977).
40. PETERS, T., *Serum Albumin*, Adv. Protein Chem., **37**, 161-245 (1985).
41. BULL, H.B., *Viscosity of solutions of denatured and of native egg albumin*, J. Biol. Chem., **133**, 39 (1940).
42. YANG, J.T., *The Viscosity of Macromolecules in Relation to Molecular Conformation*, Adv. Protein Chem., **16**, 323-400 (1961).
43. TUNG, M.A., *Rheology of protein dispersions*. J. Texture Stud., **9**, 3-31 (1978).
44. KOLTHOFF, I.M., ANASTASI, A. ve TAN, B.H., *Reactivity of Sulfhydryl and Disulfide in Proteins. II. Reactive Disulfide as Related to Viscosity and Optical Rotation in Denatured Bovine Serum Albumin*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 3235-3240 (1958).
45. BABAN, N., *Protein Biyokimyası*, Nazım Terzioğlu, İstanbul, Türkiye, (1980).
46. CARTER, D.C. ve HO, J.X., *Structure of Serum Albumin*. Adv. Protein Chem., **45**, 153-203 (1994).
47. FOSTER, J. F., *Albumin Structure, Function and Uses*, (Ed: ROSENBERG, V.M., ORATZ, M. and ROTHSCILD, M.A.). Pergamon, Oxford., 53-84 (1977).
48. FOSTER, J. F. *The Plasma Proteins*, (Ed: PUTMAN, F.W.), Academic Press, New York., **1**, 179-239. (1960).

49. JANSON, J.-C. ve RYDEN, L. (Ed.), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, 2nd ed., Wiley-Liss, New York, USA, (1998).
50. VELIKY, I.A. ve MCLEAN, R.J.C. (Ed.), *Immobilized Biosystems: Theory and Practical Applications*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, (1994).
51. KLINE, T. (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1993).
52. QUIEROZ, J.A., TOMAZ, C.T. ve CABRAL, J.M.S., *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*, J. Biotechnol., **87**, 143-159 (2001).
53. LIN, F.-Y., CHEN, W.-Y. ve HEARN, M.T.W., *Microcalorimetric Studies on the Interaction Mechanism between Proteins and Hydrophobic Solid Surfaces in Hydrophobic Interaction Chromatography: Effects of Salts, Hydrophobicity of the Sorbent, and Structure of the Protein*, Anal. Chem., **73**, 3875-3883 (2001).
54. TSAI, Y.-S., LIN, F.-Y., CHEN, W.-Y. ve LIN C.-C., *Isothermal titration microcalorimetric studies of the effect of salt concentrations in the interaction between proteins and hydrophobic adsorbents*, Colloid. Surface. A, **197**, 111-118 (2002).
55. CUTLER, A.C., BRITTAIN, T. ve BOYD, P.D.W., *A spectroscopic and electrochemical study of the interaction between copper (II) glycylglycyl-L-histidine-N-methylamide and iron (III) tetra-p-sulfophenylporphine*, J. Inorg. Biochem., **24**, 199-209 (1985).
56. XIAO, J. ve MEYERHOFF, M.E., *Retention Behavior of Amino Acids and Peptides on Protoporphyrin-Silica Stationary Phases with Varying Metal Ion Centers*, Anal. Chem., **68**, 2818-2825 (1996).
57. MIZUTANI, T., WADA, K. ve KITAGAWA, S., *Porphyrin Receptors for Amines, Amino Acids, and Oligopeptides in Water*, J. Am. Chem. Soc., **121**, 11425-11431 (1999).
58. CHIRVONY, V.S., GALIEVSKY, V.A., TEREKHOV, S.N., DZHAGAROV, B.M., ERMOLENKOV, V.V. ve TURPIN, P.-Y., *Binding of the cationic 5-coordinate Zn(II)-5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin to DNA and model polynucleotides: Ionic-strength dependent intercalation in [poly(dG-dC)]₂*, Biospectroscopy, **5**, 302-312 (1999).
59. GALANTI, R., BARDOS-NAGY, I., MODOS, K., KARDOS, J., ZAVODSZKY, P. ve FIDY, J., *Serum Albumin-Lipid Membrane Interaction Influencing the Uptake of Porphyrins*, Arch. Biochem. Biophys., **373**, 261-270 (2000).
60. CHATTERJEE, S. ve SRIVASTAVA, T.S., *Spectral investigations of the interaction of some porphyrins with bovine serum albumin*, J. Porphyrins Phthalocyanines, **4**, 147-157 (2000).
61. DING, Y.S., LIN, B.C. ve HUIE, C.W., *Thermodynamics of Porphyrin Binding to Human Serum Albumin Using Affinity Capillary Electrophoresis*, Chromatographia, **52**, 367-370 (2000).
62. HUFFMAN, D.L. ve SUSLICK, K.S., *Hydrophobic Interactions in Metalloporphyrin-Peptide Complexes*, Inorg. Chem., **39**, 5418-5419 (2000).

63. MUNAKAT, H., KANZAKI, T., NAKAGAWA, S., IMAI, H. ve UEMORI, Y., *Synthesis and nucleic acid-binding properties of water-soluble porphyrins appending platinum(II) complexes*, Chem. Pharm. Bull., **49**, 1573-1580 (2001).
64. TROMMEL, J.S. ve MARZILLI, L.G., *Synthesis and DNA Binding of Novel Water-Soluble Cationic Methylcobalt Porphyrins*, Inorg. Chem., **40**, 4374-4383 (2001).
65. DING, Y., LIN, B. ve HUIE, C.W., *Binding studies of porphyrins to human serum albumin using affinity capillary electrophoresis*, Electrophoresis, **22**, 2210-2216 (2001).
66. PASTERNAK, R.F., *Circular dichroism and the interactions of water soluble porphyrins with DNA - A minireview*, Chirality, **15**, 329-332 (2003).
67. LAUCERI, R., CAMPAGNA, T., RAUDINO, A. ve PURRELLO, R., *Porphyrin binding and self-aggregation onto polymeric matrix: a combined spectroscopic and modelling approach*, Inorg. Chim. Acta, **317**, 282-289 (2001).
68. GANDINI, S.C.M., YUSHMANOV, V.E., PERUSSI, J.R., TABAK, M. ve BORISSEVITCH, I.E., *Binding of the Mn(III) Complex of Meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)Porphyrin to DNA. Effect of Ionic Strength*, J. Inorg. Biochem., **73**, 35-40 (1999).
69. BORISSVITCH, I.E., TOMINAGA, T.T. ve SCHMITT, C.C., *Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics*, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **114**, 201-207 (1998).
70. BORISSVITCH, I.E., TOMINAGA, T.T., IMASATO, H. ve TABAK, M., *Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin*, Anal. Chim. Acta, **343**, 281-286 (1997).
71. PEKİN, B., *Fizikokimya II*, Çağlayan Kitabevi, İstanbul, Türkiye, (1986).
72. CEBE, M., *Fizikokimya*, Cilt: 1, Uludağ Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 11, Bursa, Türkiye, (1987).
73. ATKINS, P.W., *Physical Chemistry*, Oxford University Press., New York, (1998)
74. SARIKAYA, Y., *Fizikokimya*, Gazi Büro Kitapevi, Ankara, Türkiye, (1993).
75. TISELIUS, A., *Adsorption separation by salting out*, Arkiv för Kemi, Mineralogi Geologi, **26B**, 1-5 (1948).
76. SHALTIEL, S. ve ER-EL, Z., *Hydrophobic chromatography. Use for purification of glycogen synthetase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 778-781 (1973).
77. HJERTEN, S., *Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography*, J. Chromatogr., **87**, 325-331 (1973).
78. PORATH, J., SUNDBERG, L., FORNSTEDT, N. ve OLSON, I., *Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption*, Nature, **245**, 465-466 (1973).
79. PORATH, J., *Salt-promoted adsorption: recent developments*, J. Chromatogr., **376**, 331-341 (1986).

80. PORATH, J., *Salt-promoted adsorption chromatography*, J. Chromatogr., **510**, 47–48 (1990).
81. BERNA, P.P., BERNA, N., PORATH, J. ve OSCARSSON, S., *Comparison of the protein adsorption selectivity of salt-promoted agarose-based adsorbents. Hydrophobic, thiophilic and electro donor-acceptor adsorbents*, J. Chromatogr. A, **800**, 151–159. (1998).
82. ERIKSON, K.O., *Hydrophobic Interaction Chromatography*, (Ed: JANSON, J.-C. ve RYDEN, L.), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, 2nd ed., Wiley-Liss, New York, (1998).
83. SCOUTEN, W.H., *Affinity Chromatography, Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, Wiley-Interscience, New York, USA, (1981).
84. JENNISSEN, H.P. ve HEILMEYER, L.M.G., *General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes*, Biochemistry, **14**, 754–759 (1975).
85. GUSTAVSSON, P.-E., AXELSSON, A. ve LARSSON, P.-O., *Superporous agarose beads as a hydrophobic interaction chromatography support*, J. Chromatogr. A, **830**, 275–284 (1999).
86. MELANDER, W. ve HORVATH, C., *Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series*, Arch. Biochem. Biophys., **183**, 200–215 (1977).
87. VAN OSS, C.J., GOOD, R.J. ve CHAUDHURY, M.K., *Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation*, J. Chromatogr., **376**, 111–119. (1986).
88. EL RASSI, Z., *Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species*, J. Chromatogr. A, **720**, 93–118 (1996).
89. QUEIROZ, J.A., GARCIA, F.A.P. ve CABRAL, J.M.S., *Purification of Chromobacterium viscosum lipase by hydrophobic interaction chromatography*, Isolat. Purif., **3**, 1–7 (1999).
90. DILL, K.A., *Dominant forces in protein folding*, Biochemistry, **29**, 7133–7155 (1990).
91. KAUZMANN, W., *Some factors in the interpretation of protein denaturation*, Adv. Protein Chem., **14**, 1–63 (1959).
92. PRIVALOV, P.L. ve GILL, S.J., *Stability of protein structure and hydrophobic interaction*, Adv. Protein Chem., **39**, 191–234 (1988).
93. DILL, K.A., *The meaning of hydrophobicity*, Science, **250**, 297–298 (1990).
94. BAUMANN, G., FROMMEL, C. ve SANDER, C., *Polarity as criterion in protein design.*, Protein Eng., **2**, 329–334 (1989).
95. KLOTZ, I.M., *Comparison of molecular structures of proteins: helix content, distribution of apolar residues*, Arch. Biochem. Biophys., **138**, 704–706 (1970).
96. NOZAKI, Y. ve TANFORD, C., *The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale*, J. Biol. Chem., **246**, 2211–2217 (1971).

97. CHOTHIA, C., *The nature of the accessible and buried surfaces in proteins*, J. Mol. Biol., **105**, 1–14 (1976).
98. EISENBERG, D. ve McLACHLAN, A.D., *Solvation energy in protein folding and binding*, Nature, **319**, 199–203 (1986).
99. WILCE, M.C.J., AGUILAR, M.I. ve HEARN, M.T.W., *High-Performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CVII. Analysis of group retention contributions for peptides separated with range of mobile and stationary phases by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., **536**, 165–183 (1991).
100. WILCE, M.C.J., AGUILAR, M.I. ve HEARN, M.T.W., *Physicochemical basis of amino acid hydrophobicity scales: evaluation of four new scales of amino acid hydrophobicity coefficients derived from RP-HPLC of peptides*, Anal. Chem., **67**, 1210–1219 (1995).
101. VOGEL, H.J., LINDAHL, L. ve THULIN, E., *Calcium-dependent hydrophobic interaction chromatography of calmodulin, troponin C and their proteolytic fragments*, FEBS Lett., **157**, 241–246 (1983).
102. PORATH, J., *Metal ion-hydrophobic, thiophilic and Ilectron governed interactions and their application to salt-promoted protein adsorption chromatography*, Biotechnol. Prog., **3**, 14–21 (1987).
103. ARAKAWA, T., *Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns*, Arch. Biochem. Biophys., **248**, 101–105 (1986).
104. ROETTGER, B.F., MYERS, J.A., LADISCH, M.R. ve REGNIER, F.E., *Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography*, Biotechnol. Prog., **5**, 79–88 (1989).
105. GENG, X., GUO, L. ve CHANG, J., *Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography*, J. Chromatogr., **507**, 1–23 (1990).
106. OSCARSSON, S., *Influence of salts on protein interactions at interfaces of amphiphilic polymers and adsorbents*, J. Chromatogr. B, **666**, 21–31 (1995).
107. LIN, F.-Y., CHEN, W.-Y., RUAAN, R.-C. ve HUANG, H.-M., *Microcalorimetric studies of the interactions between proteins and hydrophobic ligands in hydrophobic interaction chromatography: effects of chain length, density and the amount of bound protein*, J. Chromatogr. A, **872**, 37–47 (2000).
108. SINANOGLU, O., ABDULNUR, S., *Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers*, Fed. Proc., **24** (3), 12–23 (1965).
109. TANFORD, C., *Hydrophobic free energy micelle formation and the association of proteins with amphiphiles*, J. Mol. Biol., **67**, 59–74 (1972).
110. HJERTEN, S., ROSENGREN, J. ve PAHLMAN, S., *Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose*, J. Chromatogr., **101**, 281–288 (1974).
111. OSCARSSON, S. ve KARSNAS, P., *Salt-promoted adsorption of proteins onto amphiphilic agarose-base adsorbents. II. Effects of salt and salt concentration*, J. Chromatogr. A, **803**, 83–93 (1998).
112. HOFSTEE, B.H.J., *Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with changes*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**, 751–757 (1973).

113. HJERTEN, S., YAO, K., ERIKSSON, K.-O. ve JOHANSSON, B., *Gradient and isocratic high-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns*, J. Chromatogr., **359**, 99–109 (1986).
114. ER-EL, Z., ZAIDENZAIG, Y. ve SHALTIEL, S., *Hydrocarboncoated sepharoses. Use in the purification of glycogen phosphorylase*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 383–390 (1972).
115. YON, R.J., *Chromatography of lipophilic proteins on adsorbents containing mixed hydrophobic and ionic groups*, J. Biochem., **126**, 765–767 (1972).
116. YON, R.J., *Recent developments in protein chromatography involving hydrophobic interactions*, Int. J. Biochem. **9**, 373–379 (1978).
117. RIMERMAN, R.A. ve HATFIELD, G.W., *Phosphate-induced protein chromatography*, Science, **182**, 1268–1270 (1973).
118. KATO, Y., KITAMURA, T. ve HASHIMOTO, T., *New resinbased hydrophilic support for high-performance hydrophobic interaction chromatography*, J. Chromatogr. **360**, 260–265 (1986).
119. GOODING, D.L., SCHMUCJ, M.N. ve GOODING, K.M., *Analysis of proteins with new, mildly hydrophobic high-performance liquid chromatography packing materials*, J. Chromatogr., **296**, 107–114 (1984).
120. KLEINMANN, I., PLICKA, J., SMIDL, P. ve SVOBODA, V., *Hydrophobic interaction chromatography of proteins on Separon HEMA. I-The effect of an initial salt concentration on the separation of proteins*, J. Chromatogr. **479**, 327–334 (1989).
121. QUEIROZ, J.A., TOMAZ, C.T. ve CABRAL, J.M.S., *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*, Journal of Biotechnology, **87**, 143–159 (2001).
122. PİŞKİN, E., *Polimer Teknolojisine Giriş*, İnkılap Kitabevi, İstanbul, Türkiye, (1987).
123. WILLIAM, J., KRUPER, Jr., THOMAS, A. ve KOCHANNY, M., *Regiospecific Aryl Nitration of Meso-Substituted Tetraarylporphyrins: A Simple Route to Bifunctional Porphyrins*, J. Org. Chem. **54**, 2753-2756 (1989).
124. HASEGAWA, E., NEMOTO, J., KANAYAMA, T., ve TSUCHIDA, E., *Syntheses and Properties of Vinyl Monomers Containing A Meso-Tetraphenylporphin Ring and Their Copolymers*, European Polymer Journal, **14**, 123-127 (1977).
125. MOORE, J.C., J. Polymer Sci., **A2**, 835 (1962).
126. KUNIN, R., MEITZNER, E. ve BORTNICK, N., J. Amer. Chem. Soc. **80**, 305 (1962).
127. MOORE, J.A. ve KENNEDY, J.J., *Small-Scale Production of Macroreticular Polystyrene Beads*, Macromolecular Syntheses, **8**, 69-73 (1964).
128. NAKAMURA, M., TATSUMI, T. ve TOMINAGA, H., Bull. Chem. Soc. Jpn., **63**, 3334- (1990).
129. SAY, R., BIRLIK, E., ERSOZ, A., YILMAZ, F., GEDİKBEY, T. ve DENIZLI, A., *Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads*, Analytica Chimica Acta, **480**, 251-258 (2003).
130. RENIL, M., ve MORTEN, M., Tetrahedron Lett. **36**, 4647-4650 (1995).

131. BATTONI, P., LALLIER, J.-P., BARLOY, L. ve MANSUY, D., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1149 (1989).
132. TURK, H. ve FORD, W.T., *Epoxidation of styrene with aqueous hypochlorite catalyzed by a manganese(III) porphyrin bound to colloidal anion-exchange particles*, J. Org.Chem., **56**, 1253–1260 (1991).
133. HILAL, H.S, KIM, C., SITO, M.L. ve SCHREINER, A.F., *Preparation and characterization of tetra(4-pyridyl)porphyrinatomanganese(III) cation supported covalently on poly(siloxane)*, Journal of Molecular Catalysis, **64**, 133-142 (1991).
134. COOKE, P.R. ve LINDSAY SMITH, J.R., *Alkene epoxidation catalysed by ligand-bound supported metalloporphyrins*, Tetrahedron Letters, **33**, 2737-2740 (1992).
135. COOPER, J.W., *Spectroscopic Techniques for Organic Chemistry*, John Wiley&Sons, (1980).
136. SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. ve MORRILL, T.C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley&Sons, (1984).
137. RUDIN, A., *The Elements of Polymer Science and Engineering*, Academic Press, INC., London, (1982).
138. ROE, S., *Purification based on hydrophobicity*, (Ed: HARRIS, E.L.V., ANGAL, S.), Protein Purification Methods: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 221–232 (1989).
139. FAUSNAUGH, J.L., REGNIER, F.E., *Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins*, J. Chromatogr., **359**, 131–146 (1986).
140. KASHLEV, M. ve MARTIN, E., A. Polyakov, Gene, **130**, 9-14 (1993).
141. STROP, P., CECHOVA, D., ve TOMASEK, V., *Model study of hydrophobic interactions of α - and β -trypsin and α -chymotrypsin*, J. Chromatogr., **259**, 255–268 (1983).
142. SANZ, Y., MULHOLLAND, F. ve TOLDRA, F., *Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactobacillus sake**, J. Agric. Food Chem., **46**, 349–353 (1998).