

**HYALURONİK ASİT SAFLAŞTIRMASI İÇİN ÇEKİRDEK –
KABUK YAPISINA SAHİP SİLİKA PARTİKÜLLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CORE-SHELL SILICA PARTICLES
FOR PURIFICATION OF HYALURONIC ACID**

MUSTAFA DENİZ AĞLAMAZ

Prof. Dr. LOKMAN UZUN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

HYALURONİK ASİT SAFLAŞTIRMASI İÇİN ÇEKİRDEK – KABUK YAPISINA SAHİP SİLİKA PARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa Deniz AĞLAMAZ

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Lokman UZUN

Eş Danışman: Doç. Dr. Bengi Özgün ÖZTÜRK

Temmuz 2024, 126 sayfa

Bu çalışmada, ekonomik değeri yüksek olan Hyaluronik Asit (HA)'ın saflaştırılması ve ayırımı için amfifilik polimer çekirdek – silika kabuk (core-shell) özellikli afinitesi yüksek partikül geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu hedef doğrultusunda estetik, sağlık ve kozmetik sektörlerinde yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerden HA'nın ayrılması ve saflaştırılması için Stöber

yöntemi ile hibrit çekirdek-kabuk silika jel bazlı partiküller sentezlendi. Elde edilen partiküllerin son yıllarda gözde olan kromatografik teknik olan hidrofilik ayırım kromatografisi, HILIC, temellerine uygun olduğu gözlemlendi. Ayrıca üstün özellikleriyle birlikte çekirdek – kabuk teknolojisine sahip partiküller de kromatografi dolgu malzemeleri arasındaki ticari payı ve yerini gün geçtikçe arttırmaktadır. Sentezlenen partiküllerin hyaluronik aside karşı afinitesini arttırmak için fonksiyonel ligand olarak seçilen L-aspartik asit ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirildi. Hazırlanan 0,6 µm L-aspartik asit modifiyeli çekirdek – kabuk hibrit silika partiküllerin (mod-SiO₂@P1) yüzey alanı 240 m²/g ve 5,3 µm boyutunda olan L-aspartik asit modifiyeli çekirdek – kabuk hibrit silika partiküllerin (mod-SiO₂@P2) yüzey alanı 440 m²/g'dır. Karakterizasyon yöntemlerinden olan Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), geçirgenlik elektron mikroskopu (TEM), termogravimetrik analiz (TGA), ışık saçılım yöntemi (DLS) partikül boyut analizi ve yüzey alanı ölçümleri (BET) ile karakterize edildi. Sulu çözeltide ve bakteri lizati ortamında hyaluronik asit adsorpsiyonu ve desorpsiyonu mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partiküller ile gerçekleştirildi. Kullanılan tampon sisteminin adsorpsiyonu etkilediği görüldü ve maksimum hyaluronik asit adsorpsiyonu mod-SiO₂@P1 partikülleri için 25,85 mg/g ve mod-SiO₂@P2 partikülleri için 65,25 mg/g olarak fosfat tamponu varlığında, pH 7 değerinde gerçekleştirildi. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sonucunda mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partiküllerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadığı gözlemlendi. mod-SiO₂@P2 partikülleri ile kesikli sistem haricinde sürekli sistem çalışmaları da yapıldı. Partiküllerin tekrar kullanılabilirliği de ayrıca incelendi. HPLC analizleriyle deneysel verilerin doğrulamaları yapıldı.

Anahtar Kelimeler: L-aspartik asit, çekirdek-kabuk partikül, hyaluronik asit, glukozaminglikan, hidrofilik etkileşim.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CORE-SHELL SILICA PARTICLES FOR PURIFICATION OF HYALURONIC ACID

Mustafa Deniz AĞLAMAZ

Doctor of Philosophy, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Lokman UZUN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bengi Özgün ÖZTÜRK

July 2024, 126 pages

In this study, the aim is to develop amphiphilic polymer core-silica shell hybrid particles with high affinity for the purification and separation of Hyaluronic Acid (HA), which has significant economic value.

In line with this objective, hybrid core-shell silica particles were synthesized using the Stober method for the separation and purification of HA, which is widely used in the aesthetic, health, and cosmetic sectors. It was observed that the obtained particles are suitable for hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), a chromatographic technique that has become popular in recent years. Additionally,

particles with core-shell technology are increasingly gaining commercial ground among chromatographic packing materials due to their superior properties. To enhance the affinity of the synthesized particles against hyaluronic acid, the surface was modified with L-aspartic acid, chosen as a functional ligand. The surface area of the prepared 0,6 μm L-aspartic acid modified core-shell hybrid silica particles (mod-SiO₂@P1) was determined to be 240 m²/g and the surface area of the prepared 5,3 μm L-aspartic acid modified core-shell hybrid silica particles (mod-SiO₂@P2) was determined to be 440 m²/g. These particles were characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), Dynamic Light Scattering (DLS) particle size analysis, and surface area measurements (BET). Adsorption and desorption of hyaluronic acid in aqueous solution and bacterial lysate were carried out using mod-SiO₂@P1 and mod-SiO₂@P2 hybrid core-shell particles. It was observed that the buffer system used affected the adsorption, with maximum hyaluronic acid adsorption of 25.85 mg/g for mod-SiO₂@P1 and that for mod-SiO₂@P2 is 65.25 mg/g occurring in the presence of phosphate buffer at pH 7. No significant decrease in adsorption capacity was observed for mod-SiO₂@P1 and mod-SiO₂@P2 hybrid core-shell particles after adsorption-desorption cycles. In addition to batch-wise set-up, continuous system studies were also conducted with mod-SiO₂@P2 particles. The reusability of the particles was also examined. Experimental data were confirmed by HPLC analysis.

Key words: L-Aspartic acid, core-shell particle, hyaluronic acid, glycosaminoglycane, hydrophilic interactions.

TEŞEKKÜR

Lisansımın son yıllarında bitirme tezi ile akademik dünyanın kapısını bana aralayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü dert ve tasamı paylaştığım, en zor zamanlarımda yardımına koşan, bu uzun doktora serüveninde yanımda olan, bilgi ve tecrubesine sonuna kadar inandığım, örnek aldığım, öncü bilim insanlarından saygıdeğer ve sevgili danışman hocam Prof. Dr. Lokman Uzan'a,

Çalışmalarım esnasında tüm tecrube ve bilgi birikiminden faydalandığım, laboratuvarının kapılarını ve imkanlarını sınırsızca bana açan, hem hocam hem arkadaşım ve aynı zamanda da bu doktora serüveninde eş danışmanım olan Doç. Dr. Bengi Özgün Öztürk'e,

Bu yolda birlikte yürüdüğümüz sevgili arkadaşlarımlarım Dr. Mesut Kaplan (benden 1 ay önce tezini verdi), Tunca Karasu, Sena Pişkin ve BioSmart ekibi üyeleri ile sevgili ağabeyim, hocam Prof. Dr. Mehmet Emin Çorman'a,

Her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, dertlerimi, kederlerimi, sevinçlerimi paylaştığım, bu serüvene başlarken sevgilim olan ve serüven içerisinde canım eşim'e dönüşen biricik kıymetli çiçeğim Burcu Durmuş Ağlamaz'a,

Çekirdek ailemizin büyümesini sağlayan ve varlıklarıyla kendimi konforlu hissettiren biricik kayınvalidem Saliha Durmuş'a, biricik kayınpederim Ahmet Durmuş'a,

Her konuda desteklerinin arkamda olduğunu bildiğim, beni bu günlere getiren, bir dediğimi iki etmeyen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, hayattaki en büyük şanslarımdan olan canım annem Fikriye Ağlamaz ve canım babam Musa Ağlamaz'a,

Beni bu noktaya getiren sadece destekler değil, aynı zamanda kösterlerdi de. Bu anı yazabildiğim, bu anı paylaşabildiğim için hayatıma giren herkese, bu hayatı bu bedende ve bu şekilde deneyimleme fırsatı bulduğum için...

Sonsuz Teşekkürler...

Bu tezi canım annem ve canım babama itaf ediyorum. İyi ki varsınız, her şey gönlünüzce, gönlümüzce olsun. Sevgi ve şükranlarla,

Namaste...

Mustafa Deniz Ağlamaz

Temmuz 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	lix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Polisakkaritler ve Hyaluronik Asit	4
2.1.1. Polisakkarit Çeşitleri	6
2.1.2. Glukozaminglikanlar	10
2.1.3. Hyaluronik Asit Yapısı ve Özellikleri	10
2.1.3.1. Hyaluronik Asit Elde Edilişi	11
2.1.3.2. Hyaluronik Asit Tarihi Özelliği ve Kullanımları	13
2.1.3.3. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri	15
2.1.3.4. Hyaluronik Asit Ayırma ve Saflaştırma Yöntemleri	17
2.2. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi	19
2.2.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Tarihi ve Gelişimi	19
2.2.2. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Temelleri	20
2.2.3. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisindeki Parametreler	21
2.2.3.1. Ligand Çeşidi Etkisi	21
2.2.3.2. Tuz Derişimi ve Türünün Etkisi	23
2.2.3.3. pH Etkisi	24
2.2.3.4. Sıcaklık Etkisi	26
2.2.3.5. Hareketli Faz Çözücüleri Etkisi	26
2.3. Çekirdek – Kabuk Partiküller	27
2.3.1. Çekirdek – Kabuk Partikül Tarihi	28
2.3.2. Çekirdek – Kabuk Partikül Yapılı Kolon Dolgu Malzemeleri	29
2.3.3. Çekirdek – Kabuk Partikül Sentez Yöntemleri	32

2.3.4. Çekirdek – Kabuk Partikül Temelleri.....	33
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	35
3.1. Kimyasal Malzemeler	35
3.2. Amfifilik Çekirdeğin Sentezi	36
3.3. Amfifilik Polimer Çekirdeğin Silika Kabuk İle Kaplanması.....	37
3.4. L-Aspartik Asit İle Silika Yüzey Modifikasyonu	41
3.5. Hibrit Çekirdek - Kabuk Partiküllerin Karakterizasyonu	42
3.5.1. FTIR İle Yapı Analizleri.....	42
3.5.2. Termogravimetrik Analiz.....	42
3.5.3. Yüzey Morfolojisi	43
3.5.4. Yüzey Alanı Ölçümleri	43
3.5.5. Partikül Boyut Analizi.....	43
3.6. Adsorpsiyon – Desorpsiyon Çalışmaları.....	43
3.6.1. HA'nın Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu - Kesikli Sistem.....	43
3.6.2. HA'nın Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu - Sürekli Sistem	44
3.6.3. Desorpsiyon Çalışmaları	45
3.7. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Hibrit Çekirdek - Kabuk Partiküllerin Karakterizasyonu.	47
4.1.1. FTIR Analizleri.....	47
4.1.2. Termogravimetrik Analiz.....	49
4.1.3. Yüzey Morfolojisi	50
4.1.4. Yüzey Alanı Ölçümleri	52
4.1.5. Partikül Boyut Analizi.....	52
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları – Kesikli Sistem	54
4.2.1. Hibrit Paratiküllere Hyaluronik Asit Adsorpsiyonu.....	54
4.2.1.1. Hyaluronik Asit Derişim Etkisinin İncelenmesi	55
4.2.1.2. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi.....	56
4.2.1.3. pH Etkisinin İncelenmesi	58
4.2.1.4. Temas Süresi Etkisinin İncelenmesi	59
4.2.2. Modifiye Edilmemiş Silika Partiküller Üzerine HA Adsorpsiyonu	61
4.2.3. Adsorpsiyon Termodinamikleri	62
4.2.4. Adsorpsiyon İzotermi.....	66
4.2.5. Adsorpsiyon Kinetikleri	70

4.2.6. Kesikli - Sürekli Sistem Adsorpsiyon Karşılaştırma	75
4.2.7. Sürekli Sistem Akış Hızı Etkisi.....	77
4.3. Desorpsiyon, Tekrar Kullanılabilirlik, Kararlılık ve Seçicilik	78
4.3.1. Desorpsiyon, Tekrar Kullanılabilirlik ve Kararlılık.....	78
4.3.2. Seçicilik	80
4.4. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları.....	85
5. YORUM	87
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	92
EKLER	106
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	106
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	107
ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glikozit bağının tekrarlı monomerler arasında oluşmasıyla meydana gelen bileşikler.	5
Şekil 2.2. Şeker yapılarına örnekler.....	5
Şekil 2.3. Kökenlerine göre doğal polisakkaritlerin sınıflandırılması.	6
Şekil 2.4. Hyaluronik asit polimer yapısı.	11
Şekil 2.5. Streptokok bakterisinin hyaluronik asit üretiminin mikroskopik olarak analizi.	12
Şekil 2.6. Hyaluronik asit üretim yöntemleri	15
Şekil 2.7. Hyaluronik asit ayırma ve saflaştırma yöntemi.....	17
Şekil 2.8. HILIC yönteminin diğer kromatografik yöntemlerle karşılaştırılması.	20
Şekil 2.9. HILIC ayırma mekanizmasının şematik gösterimi	21
Şekil 2.10. HILIC uygulamalarında tercih edilen fonskiyonel sabit faz örnekleri.....	22
Şekil 2.11. Hoffman tuz serisi.	23
Şekil 2.12. Analit – analit etkileşimine tuz varlığının etkisi.	24
Şekil 2.13. pH etkisi.	25
Şekil 2.14. Silika çekirdek – kabuk partiküllerin şematik diagramı	29
Şekil 2.15. van Deemter eşitliği ve kolon akış profilinin şematik gösterimi.	30
Şekil 2.16. Farklı çekirdek – kabuk yapıları partikül kombinasyonları	31
Şekil 2.17. van Deemter eşitliğinde C terimi ve difüzyon yollarının kıyaslanması.....	34
Şekil 3.1. Çekirdek – kabuk partikül hazırlama sistemi.....	38
Şekil 3.2. mod-SiO ₂ @P1 partikül sentez mekanizması.	42
Şekil 4.1. Aspartik asit, SiO ₂ @P1, mod-SiO ₂ @P1 ve mod@P2 FTIR spektrumları ...	48
Şekil 4.2. (A) mod-SiO ₂ @P1 ve (B) mod-SiO ₂ @P2 partiküllerin termogramı.	49
Şekil 4.3. SiO ₂ @P1 partiküllerinin TEM görüntüsü.....	50
Şekil 4.4. mod-SiO ₂ @P1 partiküllerinin SEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.5. mod-SiO ₂ @P2 partiküllerinin SEM görüntüsü	51
Şekil 4.6. (A) P1 ve (B) SiO ₂ @P1 partiküllerinin DLS spektrumu.	53
Şekil 4.7. (A) P2 ve (B) SiO ₂ @P2 partiküllerinin DLS spektrumu.	54
Şekil 4.8. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine derişim etkisi.....	56
Şekil 4.9. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi	57

Şekil 4.10. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine pH etkisi.....	59
Şekil 4.11. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine temas süresi etkisi	60
Şekil 4.12. Modifiye edilmemiş (A) $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri üzerine HA adsorpsiyonu.....	62
Şekil 4.13. van't Hoff eğrisi için çizilen grafik.	65
Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklardaki (A) mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri için Langmuir izoterm modelleri.....	67
Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklardaki (A) mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri için Freundlich izoterm modelleri.....	69
Şekil 4.16. (A) mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri için elde edilen verilerin yalancı birinci derece kinetiği.....	73
Şekil 4.17. (A) mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri için elde edilen verilerin yalancı ikinci derece kinetiği.....	74
Şekil 4.18. Kesikli ve sürekli sistemde mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri üzerine hyaluronik asit adsorpsiyon kapasitesi karşılaştırma	76
Şekil 4.19. Sürekli sistem akış düzeneği.	76
Şekil 4.20. Hyaluronik asit adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.....	78
Şekil 4.21. mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ partikülü için (A) tekrar kullanılabilirlik ve (B) desorpsiyon kinetiği çalışmaları.....	79
Şekil 4.22. mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülü için (A) tekrar kullanılabilirlik ve (B) desorpsiyon kinetiği çalışmaları.....	80
Şekil 4.23. (A) mod- $\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve (B) mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partiküllerine <i>E.coli</i> lizatından HA adsorpsiyonu	82
Şekil 4.24. <i>E. coli</i> lizatından HA adsorpsiyonunun mod- $\text{SiO}_2@\text{P2}$ partikülleri ile kesikli ve sürekli sistem karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.25. <i>E. coli</i> lizatından HA adsorpsiyonun sürekli sistem akış düzeneği.....	84
Şekil 4.26. HPLC Kromatogramları.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. mod-SiO ₂ @P1 partikülünün polimerizasyon içeriği ve işlem koşulları	39
Çizelge 3.2. mod-SiO ₂ @P2 partikülünün polimerizasyon içeriği ve işlem koşulları	40
Çizelge 4.1. mod-SiO ₂ @P1 ve mod-SiO ₂ @P2 partikülleri üzerine hyaluronik asit adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve kolerasyon katsayıları.....	70
Çizelge 4.2. mod-SiO ₂ @P1 ve mod-SiO ₂ @P2 hibrit silika çekirdek – kabuk partikülü için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	van Deemter denklemi Eddy difüzyonu
B	van Deemter denklemi boyuna difüzyon
b	Langmuir sabiti
C	van Deemter denklemi, kütle transferi
C_e	Çözeltildeki HA derişimi (mg/L)
C_{eq}	Denge HA derişimi (mg/L)
H	Teorik plaka yüksekliği
ΔG	Gibbs serbest enerjisi
ΔH	Sistem entalpi değişimi
K_F	Freundlich üstü
k_1	Yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (1/dak)
k_2	Yalancı-ikinci derece adsorpsiyon hız sabiti (g/mg.dak)
M	Molarite
Ma	Molekül ağırlığı
n	Freundlich sabiti
R^2	Korrelasyon katsayısı
S	Entropi
T	Sıcaklık
Q	Adsorplanmış HA miktarı (mg/g)
Q_e	Adsorpsiyon miktarı (mg/g)
q_e	Denge anında adsorplanan HA miktarı (mg/g)
q_t	t anında adsorplanan HA miktarı (mg/g)
Q_{max}	Adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

AAPH	2-2-Azobis(2-metilpropiyonamit) dihidroklorür
APTES	3-Aminopropiltrietoksisilan
BET	Brunauer-Emmet-Teller
CPC	Setilpridinyum klorür
CPM	Kontrollü gözeneklilik malzemesi
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
DLS	Dinamik Işık Saçılım
FCP	Füzyon çekirdek partikül
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
GAG	Glukozaminglikan
HA	Hyaluronik asit
HCl	Hidroklorik asit
HILIC	Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
IC	İyon kromatografisi
kDa	Kilo Dalton
KBr	Potasyum bromür
MMA	Metil metakrilat
Mod-SiO ₂ @P1	Modifiye silika çekirdek – kabuk hibrit partikül
Mod-SiO ₂ @P2	Modifiye silika çekirdek – kabuk hibrit partikül (5.3 µm)
MOF	Metal organik çerçeve
NP-LC	Normal faz sıvı kromatografisi
P1	Amfifilik polimer çekirdek 1
P2	Amfifilik polimer çekirdek 2
PEGMA	Poli(etilenglikol) metakrilat

RP-LC	Ters faz sıvı kromatografisi
SEC	Boyutça ayırma kromatografisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SiO ₂ @P1	Modifiye edilmemiş silika çekirdek – kabuk hibrit partikül
SPP	Yüzey gözenekli partikül
TEM	Geçirgenlik elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
THF	Tetrahidrofur
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Dijital çağ içerisinde yaşadığımız şu günlerde, güzel görünme arzusu gittikçe artmaktadır. Bu arzuyla birlikte insanların estetik işlemlere, besin takviyelerine, kozmetik ve farmasötik ürünlere olan ilgisi gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye’de güzellik ve estetik ekonomisinin büyüklüğü 2018 yılı itibariyle iki milyar dolar olarak belirtilmektedir. Sektör yılda ortalama %10’luk bir büyüme göstermektedir. Türkiye bu konuda dünyada ilk 10 ülkenin içine girmektedir. Sektördeki bu büyümenin ilerleyen yıllarda da devam edeceği ön görülmekte olup 2018 TÜİK verilerine göre kozmetik sektörü rakamları; 1.59 milyar dolar ihracat, 907 milyon dolar ithalat hacminden oluşmaktadır. Kozmetik ürünler 300 milyon dolar ile en çok ithal edilen ürün olmuştur. İnsanlar artık cerrahi ameliyattan ziyade, gündelik hayatlarına devam edebilecek işlemleri tercih etmektedir. Etkisini çok daha hızlı ve yoğun görebildiği, aynı zamanda da sağlıklarına daha az zararlı olan kozmetiklere yönelmektedir. Sektörel büyüme ve arge çalışmalarıyla birlikte bu noktada yenilikçi çözümler ve malzemeler geliştirilmektedir. Toksik etki göstermeyen ve biyobozunur olan malzemeler hedeflenmektedir. Hyaluronik asit biyobozunur olmasının yanısıra yüksek nem tutma ve viskoelastik özelliklerinden dolayı; biyomedikal, farmasötik ve kozmetik ürünlerde tercih edilmektedir [1].

Hyaluronik asit, başka bir deyişle hyaluronan, glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinin oluşturduğu bir disakkaritin tekrar ettiği doğrusal bir polimerdir. Hyalonan gilikozamingilikan ailesinin bir üyesidir [2]. Yüksek yağlayıcılık, suyu adsorplama ve tutma (hücresel işlevleri etkiler, göç yapışma ve çoğalma) özelliklerinden kaynaklı olarak HA oftalmik cerrahi, artrit tedavisi, doku iskeleti, doku mühendisliği, implant malzemelerle birlikte ve estetik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Cilt, kırık, sinoviyal sıvı ve bakteriyel hücre kapsül gibi birçok hayvan dokusunda bulunabilir [3].

Fermentasyon işlemi ile üretilen HA monodisperse molekül ağırlık dağılımına sahip değildir. Farmasötik ve kozmetik alanda kullanım HA’nın molar kütle dağılımıyla doğrudan ilgilidir [4, 5]. Molar kütle dağılımının hesaplanmasında viskozimetre [6], jel elektroforez [7], kapiler elektroforez [8] ve kromatografik yöntemler [9, 10] kullanılmaktadır. Makromolekülleri sayıca ortalama molekül

ağırlıklarına (M_n) göre ayırmada boyut ayırma kromatografisi (SEC) yüksek performanslı bir yöntemdir. SEC; polimer zincir uzunluğuna ve çözücü içerisinde bulunan makromoleküllerin hidrodinamik hacimlerini baz alan kromatografik bir yöntemdir. Geleneksel SEC kolonları; hidrofilik poliakrilamid, agaroz, dextran, silika polimer veya polistiren tanecikler içermektedir.

Sıvı kromatografisinde analit ayırımının gerçekleştiği kısım kolondur. Ayrımdaki temel mantık ise sıvı faz ile birlikte hareket halinde ilerleyen hedef molekülün, kolon içerisindeki katı faza (dolgu maddesi) karşı olan ilgisiyle kolon içerisinde ikincil etkileşimler vasıtasıyla tutunarak bir süre alıkonma ve devamında da bir süre sonra kolondan ayrılmasıdır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) günümüzde laboratuvarların temel cihazları arasında yer almaktadır. Gıda, kimya, tekstil, ilaç ve kozmetik gibi birçok sektörün temel analitik cihazı olmuştur. HPLC sistemi; ayırma ve saflaştırma yanında biyoteknoloji ve biyokimya alanında değerli ürünlerin izolasyonun, ön deriştirilmesinde ve hazırlık aşamasında da kullanılmaktadır [11]. Gelişen teknolojiyle birlikte daha yüksek basınçlara dayanabilen ve yüksek hızlı sonuçlar verebilen UPLC sistemleri (Ultra Performanslı – Basınçlı Sıvı Kromatografisi) geliştirilmiştir. Analiz sürelerinin kısalması, yüksek basınçlara çıkabilmek avantaj olsa da UPLC sistemlerinin bakımı ve analiz için kullanılan düşük partikül çaplı kolonların maliyetleri oldukça yüksektir. Bu durumdan kaynaklı olarak UPLC sisteminin avantajı ile HPLC sisteminin avantajını bir araya getiren çekirdek-kabuk partikül teknolojisi ortaya çıkmıştır. Çekirdek - kabuk dolgu maddeleri silika ya da polimer bazlı olabilmektedir. Küresel partiküllerden oluşan çok katmanlı bir dolgu maddesi çeşididir. Partikül büyüklüklerinin monodispers yapıda olması hidrodinamik açıdan üstün özellikleri de oluşturmaktadır. Hızlı sonuçlar vermesinin yanında düşük geri basınç özellikleri gösterdiği için, HPLC de sisteminde UPLC sonuçları alınmasını sağlayan bir kolon dolgu teknolojisidir. Kullanım çeşitliliği artarak devam eden dolgu malzemesi olup; farklı büyüklüklerdeki ve farklı özelliklerdeki çeşitleriyle analiz sektörünün göz bebeği halindedir.

Yalancı-spesifik ligandlar; hidrofilik, hidrofobik etkileşimler ile elektrostatik ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşim güçlerini bünyelerinde barındırabildikleri için; zayıf afinite ligandları olmalarına rağmen hedef molekül ile seçici ve güçlü

etkileşime girebilirler. Bu özelliklerinden dolayı da son zamanlarda biyoligandlara alternatif olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda üretim maliyetleri de biyoligandlara göre daha düşüktür. [12]

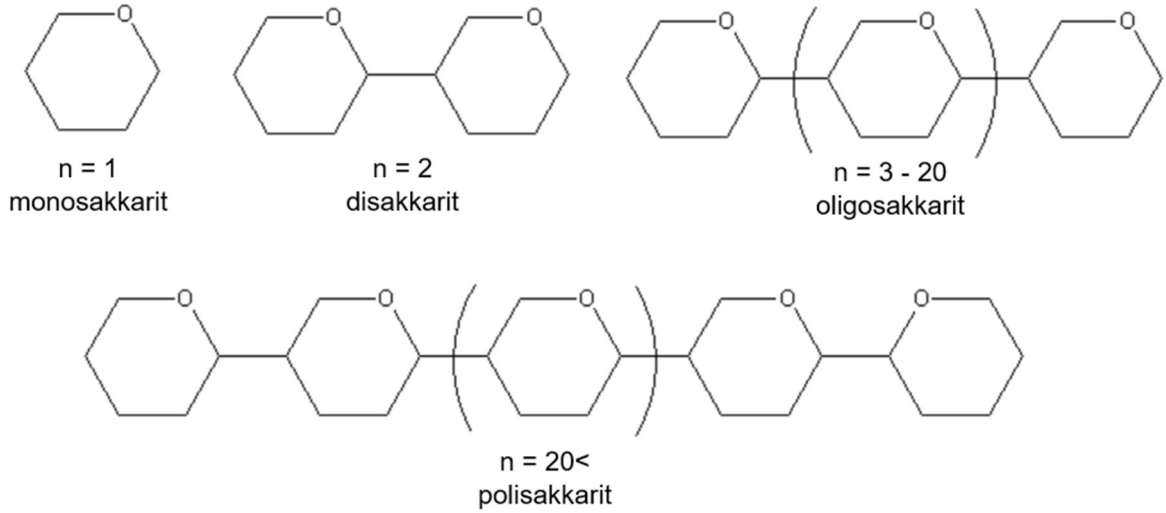
Sunulan tezin amacı; L-aspartik asit modifiyeli hibrit çekirdek – kabuk (core-shell) silika partiküller hazırlanarak, hyaluronik aside karşı adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesidir. Bu bağlamda ilk basamak olarak; metil metakrilat (MMA) ve poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA) temelli amfifilik çekirdek oluşturulmuştur. İkinci basamak olarak Stöber reaksiyon yöntemi ile amfifilik polimer çekirdek üzerine mezo-gözenekl silika kabuk kaplanmıştır. Bu doğrultuda partikül boyutu farklı silika jel bazlı çekirdek-kabuk malzemeleri sentezlenmiştir. Üçüncü adımda ise L-aspartik asit ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilerek modifiye silika çekirdek – kabuk hibrit partikülleri (mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2) elde edilmiştir. Karakterizasyon yöntemlerinden Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) kullanılarak, partiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca partiküllerin yüzey alanı (m²/g), gözenek boyutu (nm) ve gözenek hacmi (cm³/g) ölçümü N₂ adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi kullanılarak (BET) tespit edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirgenlik elektron mikroskobu (TEM), termogravimetrik analiz (TGA) ve dinamik ışık saçılım yöntemi (DLS) ile karakterizasyonu tamamlanmıştır. Dördüncü basamakta modifiye çekirdek – kabuk hibrit silika partiküller üzerine hyaluronik asit adsorpsiyon çalışmaları (pH, derişim, temas süresi, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca adsorpsiyon çalışmalarında kesikli ve sürekli sistem deneyleri gerçekleştirilmiş ve bakteriyel ortam içerisinde HA ayırımı ve saflaştırılması sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polisakkaritler ve Hyaluronik Asit

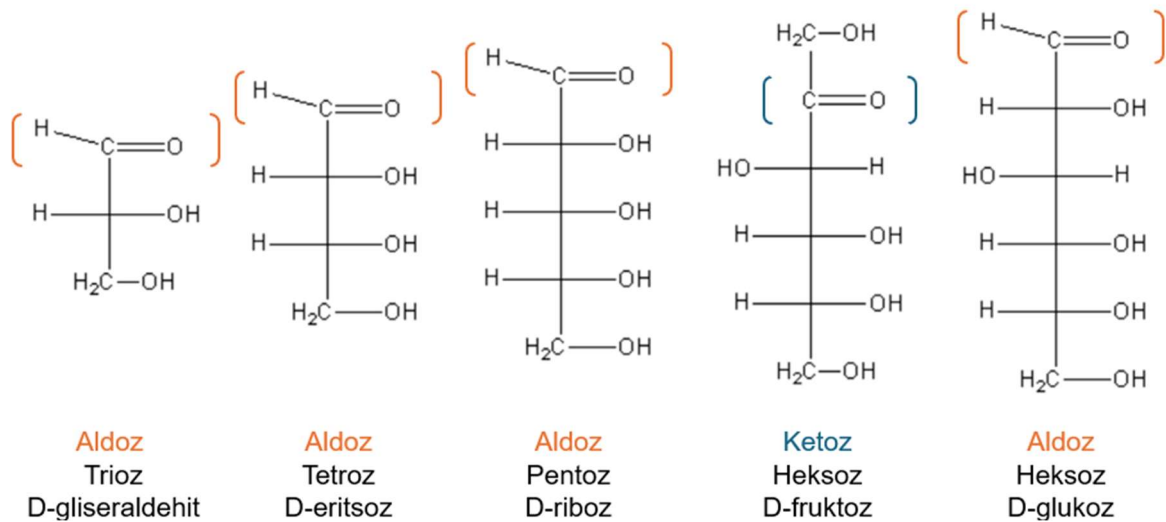
Canlı sistemlerinde çokça bulunan polisakkaritler, en yaygın olan biyopolimer türevlerindendir. Glikanlar, glikopolimerler, glikoproteinler, glikolipidler, glukozaminoglikanlar (GAG'ler), proteoglikanlar ve diğer glikokonjugatlar şeklinde, birçok biyolojik süreçte rol oynadıkları bilinen bileşiklerdir. Bu roller arasında enerji depolama ve metabolizma, protein ve lipid modifikasyonu, hücresel yapı, sinyal iletimi, hücre-hücre etkileşimleri ve konak-patojen etkileşimlerinin aracılığı bulunmaktadır [13]. Polisakkaritlerin biyolojik önemleri ve özellikleri sebebiyle; biyoteknoloji, biyomühendislik, malzeme bilimi ve biyomedikal alanlarında kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Polisakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri; molekül ağırlığı (MA), monosakkarit çeşidi, zincir konformasyonu gibi faktörlerle doğrudan ilişkilidir [14]. Şeker monomerlerinden oluşan polisakkaritler; bitki, alg, hayvan, böcek, bakteri ve alg kaynaklarından elde edilebilir. Doğal kaynakların heterojen ve yapısal karmaşıklığından kaynaklı olarak saf polimeri elde süreci uzun ve maliyetli bir işlemler bütünüdür. Sentetik olarak sentezlenen veya doğal kaynaklardan saflaştırılan glikanlar; ilaç taşınımı, ilaç hedefleme, kozmetik ürünler, estetik sektörü, biyoyakıt, biyobozunur ve çevreci polimerler, yenilenebilir enerji kaynakları birçok alanda kullanılmakta ve arge çalışmaları hızla devam etmektedir.

Glikozit bağlarının tekrarlı monomerler arasında oluşmasıyla meydana gelen bileşikler; monosakkarit, oligosakkarit ve polisakkarit olarak isimlendirilir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Glikozit bağının tekrarlı monomerler arasında oluşmasıyla meydana gelen bileşikler [10, 11].

Yapıtaşı olan monosakkaritler; polihidroksi aldehit ve keton yapısında olan karbohidratlardır. $(CH_2O)_n$ genel formülü ile gösterilirler ve $n = 3$ veya daha büyük olur. Monosakkarit yapısındaki karbonil grubunun yerine göre adlandırma yapılır. Eğer karbonil grubu monosakkarit zincirinde başta veya sonda ise aldoz; baş ve son haricinde farklı bir yerde ise ketoz adını alır. Monosakkaritlerdeki karbon zincirinin uzunluğuna göre triozlar, tetrozlar, pentozlar ve heksozlar gibi isimlendirme alırlar.

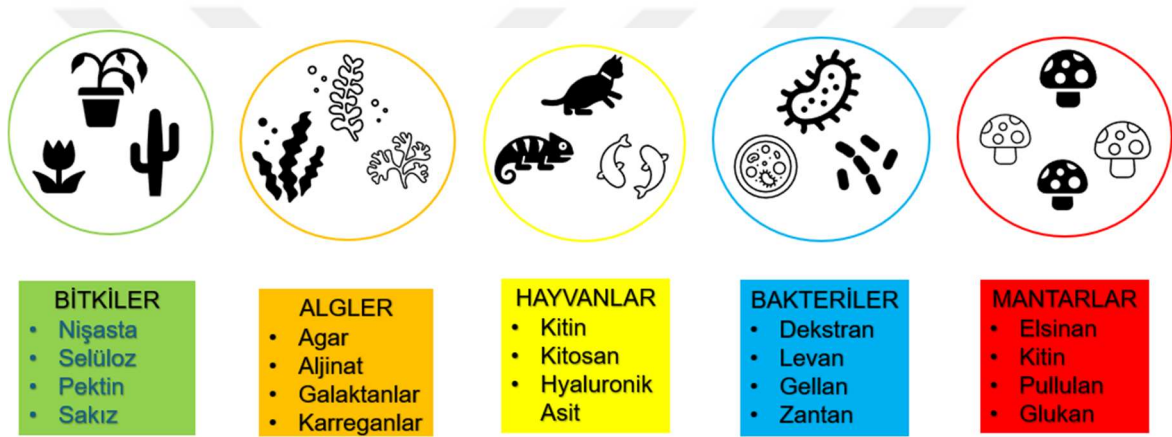


Şekil 2.2. Şeker yapılarına örnekler

2.1.1. Polisakkasit Çeşitleri

Polisakkaritler yapılarındaki monosakkasit bileşenlerine göre; homopolisakkarit (homoglikan) veya heteropolisakkarit (heteroglikan) olarak 2 ana başlık altında listelenir. Homopolisakkasitler tek bir çeşit monosakkasitten oluşurken; heteropolisakkaritler farklı tip polisakkasitlerden oluşurlar.

Doğal polisakkaritler kökenlerine göre de sınıflandırılabilir. Bunlar; bitki polisakkaritleri, alg polisakkasitleri, hayvansal polisakkasitler, bakteriyal polisakkasitler ve mantar polisakkasitleridir.



Şekil 2.3. Kökenlerine göre doğal polisakkaritlerin sınıflandırılması.

Bitki polisakkaritleri; α veya β glikozit bağlarıyla bağlı homo veya hetero sakkaritlerdir [15]. Bu polisakkaritleri bitkilerin enerji rezervlerinden olan polimerler ve bitki hücre duvarının parçası olan polimerler oluşturur. Bazı örnekler;

- Nişasta; glukoz monosakkaritinden oluşan bir homopolisakkarittir [16]. Yeşil bitkilerin birincil depo maddesi nişastadır. Boya, ilaç, karton ve plastik endüstrilerinde hammadde olarak kullanılır.
- Selüloz; bitki atıklarından ve bitkilerden elde edilen ve glukozun beta glikozit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan bir homopolisakkarittir [17]. Anti bakteriyal özellikleri nedeni ile sağlık sektörünün yanında; malzeme ve matris üretiminde de kullanılır [18].

- Pektin; bitki hücrelerinin hücre duvarları ile meyve ve sebzelerin kabuklarında yer alan bir heteropolisakkarittir. Pektin yüksek vizkozitesi ile suda çözünerek jel formu oluşturur. Gıda endüstrisinde; şeker, reçel ve jöle yapımında katkı maddesi olarak kullanılır [19].
- Sakızlar; rhamnoz, arabinoz, mannoz ve galaktoz gibi şekerlerden oluşan, kolloidal özellikleri olan dallı ve karmaşık bir heteropolisakkarittir. Genellikle bitkilerden, çalılardan, ağaçlardan, tohumlardan ve bakterilerde elde edilebilir. Gıda, kozmetik, tekstil, kapsülleme, kaplama ve ilaç endüstrilerinde katkı ajanları olarak kullanılır [20].

Alg polisakkaritleri; alg yapısında mukopolisakkarit olarak bulunan polisakkaritler hücre duvarına katılarak önemli bir yapı destek oluştururken aynı zamanda enerji depolama molekülleridir [21]. Alglerin kuru ağırlığının %4 - %76'sı polisakkaritleri oluşturur. Aralık arasında hangi miktarda polisakkarit içerdiği alg türlerine göre değişiklik göstermektedir [22]. Alglerde bulunan bazı polisakkaritlere örnekler;

- Agar; doğrusal galaktopiranoz birimlerinden oluşan, ısıyla şekillenebilen bir maddedir [23]. Gıda endüstrisinde doku oluşturma, jelleştirme, kalınlaştırma ve stabilizasyon ajanı olarak kullanılır. Bununla bakterojenik ve biyoteknolojik süreçlerde de (kültür ortamında) kullanılmaktadır [24].
- Galaktanlar ve karregananlar; kırmızı deniz alglerinde bulunan ve birbirlerine çok benzer özelliklere sahip ana zincirleri galaktoz olan polisakkaritlerdir. Reolojik özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde kalınlaştırma ve jelleştirme ajanı olarak kullanılır. Bununla birlikte antikoagülan, antitümör ve antiviral özellikleri sebebiyle; farmasötik, kozmetik ve tıbbi alanda da kullanılmaktadır [25].
- Aljinat; yoğunlukla kahverengi alglerde bulunan, glukronik ve manironik asitlerden oluşmuş bir heteropolisakkarittir. Jel oluşturucu, dayanıklı ve esnek bir moleküldür [26]. Bununla birlikte biyoyumlu, anti bakteriyel ve toksik olmayan biyobozunur özellikler sergileyen bir moleküldür. Bu özelliklerinden kaynaklı olarak; kapsülleme, biyokontrol ajanı, parçacık ve matris oluşturmak için kullanılmaktadır [27].

Hayvan polisakkaritleri; toksik olmayışları, biyouyumlulukları, antijenlerinin olmaması ve biyobozunurlukları nedeniyle doğal biyopolimerlerdir. Hayvansal hücrelerde enerji kaynağı olmalarının yanısıra yapısal ve depo işlevlerinde de görev alır. Glukozaminglikanlar ve kitinler olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılır [28, 29]. Başlıca hayvan polisakkaritleri;

- Kitin; N-asetil-D-glukozamin temelli omurgasızların hayvanların (ahtapot, mürekkep balığı, gibi), kabukluların (pavurya, yengeç, istakoz, gibi), böceklerin (örümcek, akrep, gibi) ve bazı mantarların dış iskeletlerinde yer alan azotlu bir polisakkarittir [30]. İlaç taşımada, biyosensörlerde, enzim taşıyıcısı olarak jel formu oluşturma özelliğiyle kullanılmaktadır [31]. Kitin deasetilasyonla birlikte yarı kristal formlu kitosana dönüşür. Kitosan yalancı – doğal katyonik özellikler sergileyen tek polimerdir [31]. Kitosan dönüşümüyle birlikte kimyasal ve yapısal değişimden kaynaklı olarak; biyobozunur, antimikrobiyal, biyouyumlu ve tamamen çözülebilir hale gelmektedir. Bu özellikleriyle birlikte; mikrobiyal biyokontrol ajanı, arıtıcı, jelleştirici ve taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [32].
- Hyaluronik asit; glukuronik asit ve N-asetilglukosamin birleşimiyle oluşan bir molekül olup, omurgalı hayvanların vücut sıvılarında, dokularında ve bazı bakterilerde bulunmaktadır [33]. Koruyucu, kayganlaştırıcı, iyileştirici ve gençleştirici özelliklerinden kaynaklı olarak kozmetik, dermatolojik ve farmasötik endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır [34].

Bakteriyel polisakkaritler; doğal bir polisakkarit çeşididir. Stabilizatör, jelleştirici ve kıvam arttırıcı özellikleriyle birlikte antitümör, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikleri de bulunmaktadır [35]. Ticari önemi yüksek bu polisakkaritlerden örnekler;

- Dekstran; ekzopolisakkarittir ve laktik asit bakterinin ürünüdür. Gıda ürünlerinde kıvamlaştırma, jelleştirme ve emulsifikasyon ajanı olarak kullanılır. Bununla birlikte üretilen suşun çeşidine göre de farklı özellikler sergilemektedir [36, 37].
- Gellan; doku mühendisliği ve kapsülleme de kullanılan gellan sakızı olarak bilinen doğrusal yapıda bir polisakkasittir [38]

- Zantan; bir heteropolisakkarittir. Üretim maliyeti yüksek olan zantan tekstil, gıda ve tıp endüstrisinde; kıvam arttırıcı, jelleştirici ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır [39].
- Levan; fruktoz monomerinden oluşan bir polimerdir. Levanın özelliği üretim koşullarına ve üretilen suşa göre değişiklik göstermektedir. Gıda endüstrisinde lezzet ve kıvam arttırıcı, stabilizatör ve prebiyotik olarak kullanılmasıyla birlikte; kaplama malzemesi olarak nanoparçacıklarda kullanılmaktadır [40].

Fungal polisakkaritler; enerji süreçlerinde kullanılmak için maya ve yenilebilir mantarlarda bulunan ve hücre duvarına da katılan polisakkaritlerdir [41]. Yapısal çeşitlilikleriyle farklı özellikler sergileyen fungal polisakkaritler homopolisakkarit veya heteropolisakkarit olabilir. Örnek olarak; polimerin dallanma derecesi, kütlesi ve konformasyonu bu polisakkaritin antitümör özelliklerini belirleyen etmenlerdendir [42]. Fungal polisakkaritlere bazı örnekler;

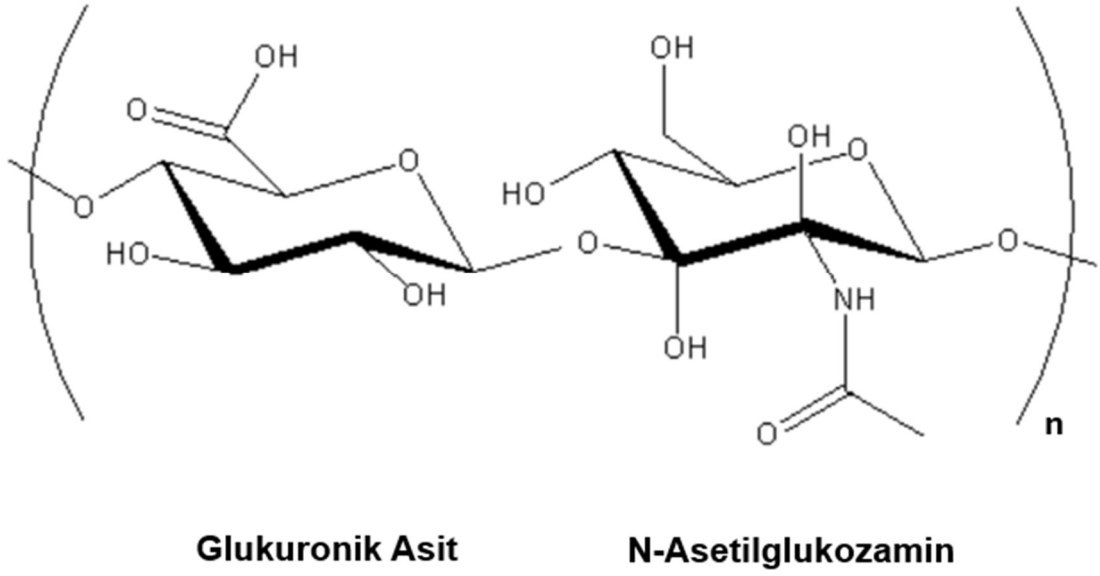
- Elsinan; hücre dışı bir polisakkarittir ve *Elsinoe* spp. tarafından üretilir. Yüksek viskoziteye sahip olan elsinan; organik çözücülerde çözünüp, suda çözünmez ve film oluşturmak için kullanılmaktadır [43].
- Pullulan; doğrusal bir homopolisakkarittir ve *Aureobasidium pullulans* tarafından üretilir [43]. Kapsül, film, kaplama ve jelleştirici ajan olarak endüstrilerde kullanılmasıyla birlikte; prebiyotik ve stabilizatör olarak da kullanılmaktadır [40].
- β -Glukan; diyetetik bir liftir ve maya, mantar, alg ve bakterilerin hücre duvarlarında bulunur. Polimerik yapısına ve molekül ağırlığına göre farklı özellikler gösterir. Bu özellikleriyle birlikte; suda veya organik çözücülerde çözülme, asidik pH'lara dayanım, viskoz yapı ve hipo kolesterol etkileriyle çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [44, 45].
- Galaktan; galaktoz monomerinden oluşan bir polisakkarittir. Mantarlar dışında; bitkiler, algler, hayvanlar ve bazı mikroorganizmalar tarafından da üretilir. İlaç endüstrisinde antiinflamatuvar, antitrombotik, antiviral ve antikoagülan olarak kullanılırken; takviye gıda olarak da gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [46].

2.1.2. Glukozaminoglikanlar

Mukopolisakkarit olarak da bilinen glukozaminoglikanlar (GAG'lar) polisakkarit çeşitlerinden negatif yüklü olan ve her memeli dokusunda bulunan moleküllerdir [47]. Moleküler yapısı ile birlikte vücutta aldığı işlev de çeşitlilik gösterir. Önceki düşüncelerde işlevlerinin sadece yapısal iskelet oluşturmak ve hücre hidrasyonu olduğu zannediliyordu. Yapılan çalışmalarla birlikte bu görevlerin dışında biyokimyasal süreçleri modüle eden, hücre sinyalleşiminde de büyük rol oynadığı bulunmuştur [48]. Bu biyokimsal süreçlere örnekler; hücre tutunması ve yapışmasının teşvik edilmesi, yara onarımı ve antikoagülasyon ile hücre büyümesi ve poliferasyonun düzenlenmesi olarak sıralanabilir. Sınıflandırılması disakkarit birimlerine göre yapılan GAG'lar, temelde dört ana gruba ayrılır. Bunlar; keratan sülfat, heparin/heparan sülfat, kondroitin sülfat/dermatan sülfat ve hyaluronik asittir [49].

2.1.3. Hyaluronik Asit Yapısı ve Özellikleri

Hyaluronik asit, başka bir deyişle hyaluronan, glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinin oluşturduğu bir disakkaritin tekrar ettiği doğrusal bir polimerdir (Şekil 2.4.). Hyaluronan, glukozaminglikan ailesinin bir üyesidir [50]. Glukozaminglikanlar arasındaki en basit yapıya sahip hyaluronik asit, diğer GAG'lar gibi golgi aygıtındaki fonksiyonel grupların ek sülfatlanması gerekmez [51]. Hyaluronik asitin yapıtaşı olan glukuronik asit ve asetilglukozamin monomerleri hücre stoplazmasında sentezlenip, plazma membranına difüzyonla çekilerek HA sentezi gerçekleştirilir [49]. Plazma membranında sentezlendikten sonra HA yapısı değiştirilmeden hücreden hücre dışı alana salgılanır [52]. HA, 2000-25000 disakkarit bileşiminden oluşabilir [53, 54].

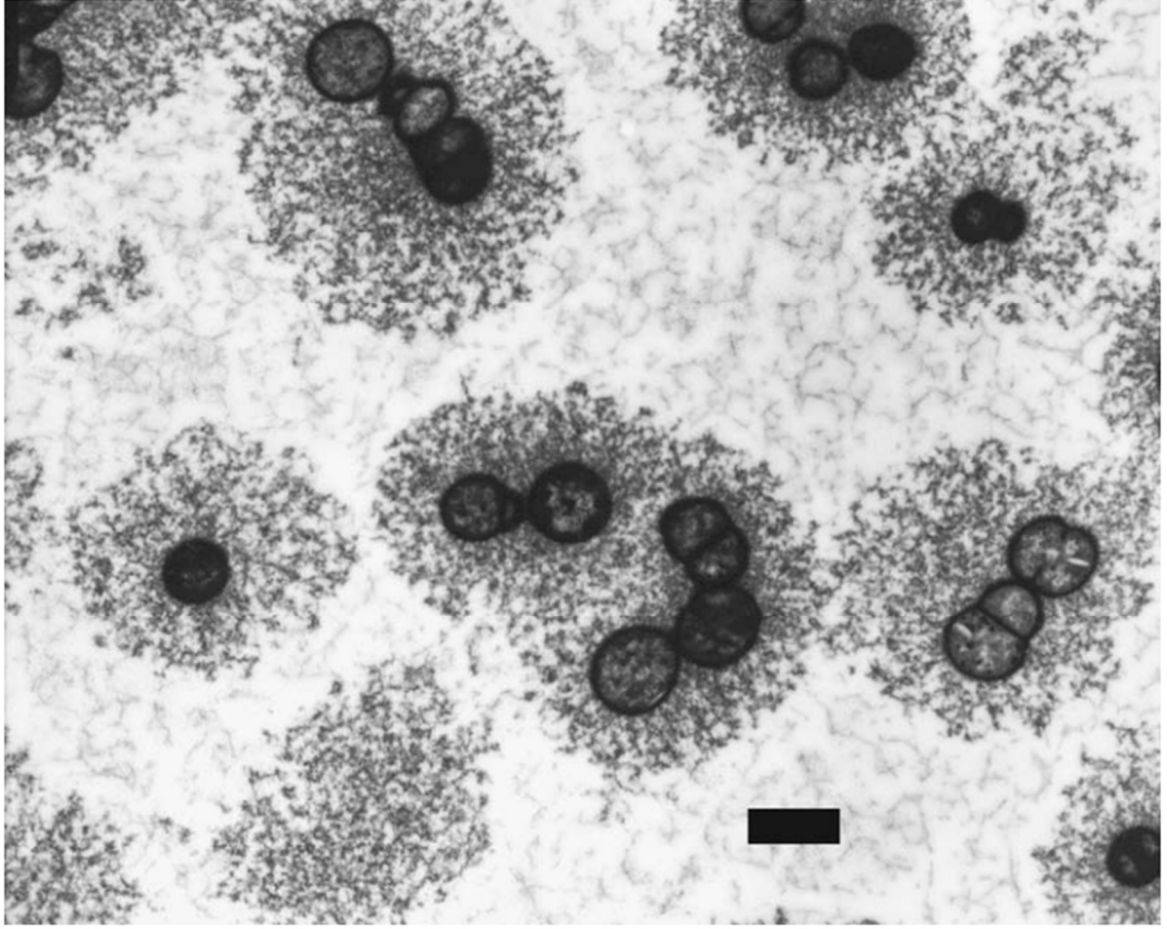


Şekil 2.4. HA polimer yapısı

Biyouyumlu ve biyobozunur yapıdaki hyaluronik asit; yüksek su tutma, şekillendirilebilme ve lubrikant (yağlayıcı) özellikleri sebebiyle kozmetik, estetik, medikal ve biyomühendislik alanlarında kullanımı revaçta olan bir moleküldür.

2.1.3.1. Hyaluronik Asit Elde Edilişi

HA hayvansal kaynaklı olarak sığır gözünden, göbek kordonu ve horoz ibiğinden özütleme yöntemiyle üretilmektedir. Hayvandan izole edilen biyokimyasalların insanda terapötik olarak kullanılması çapraz-viral ve beklenmedik farklı enfeksiyonların oluşumunu tetikleyebilmektedir [55]. Bu dezavantajdan kaynaklı mikrobiyal HA üretimi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *Streptokok* suşundan mikrobiyal HA eldesi alternatif bir yaklaşımdır [56]. Lancefield grup A ve C *Streptokok* patojeni tarafından hücre dışı kapsül olarak HA üretilmektedir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Elektron mikrograf görüntüsü, havalandırılmış bir biyoreaktör kültürünün geç eksponansiyel fazından elde edilen *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) hücrelerine aittir. Hücreler, Jacques ve Graham (1989) yöntemine göre elektron mikroskopisi için hazırlanmıştır. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmış ve 80 kV hızlandırma voltajında Jeol JEM1010 geçirgenlik elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Ölçek 1 μm [59].

Bakterilerden üretilen HA immünojik değildir ve medikal kullanım için oldukça uygundur. Grup A hemolitik Streptococci'den izole edilen HA 60-140 mg/L'dir [57]. İlerleyen süreç ve yapılan araştırmalarla optimizasyon koşullarının belirlenmesi, kültür ortamlarının uyarlanması ve suş seçimleriyle birlikte HA ürün verimi 6-7 g/L'ye kadar arttığı çalışmalar vardır [58]. Bu değer kütle transfer limitlerinden dolayı pratik limit olarak görülmektedir [59]. HA biyosentez işlemi yüksek enerji gerektirmektedir. Enerji kaynağı olarak da glukoz ve türevleri kullanılabilir. Glukoz limitli koşullar altında üretilen hyaluronan ve molekül ağırlığı azalmaktadır [59].

Aerobik kültür koşullarında hyaluronan verimliliği %50'ye kadar artmaktadır [60]. %5'lik çözünmüş oksijen seviyesi kritik seviye olarak görülüp, verimliliği arttırmak için yeterlidir [61]. Başlangıç glukoz miktarı ve oksijen seviyesi dışında ortamca kompozisyonu, pH, sıcaklık ve çalkalama da fermentasyon için önemli parametrelerdir. Fermentasyon işlemi ile üretilen HA monodisperse molar kütleyle sahip değildir.

2.1.3.2. Hyaluronik Asit Özelliği ve Kullanım Alanları

Vücut dokularında yaygın olarak bulunan hyaluronik asit, polaritesi yüksek ve ağırlığının 10000 katı suyu bağlama kapasitesine sahip bir makromoleküldür. Su bağlama kapasitesinin bu denli yüksek olması sebebiyle sinoviyal eklemleri yağlayıcı ve yara iyileştirici olarak kullanılan çok güçlü bir moleküldür [62]. Yüksek yağlayıcılık, suyu adsorplama ve tutma (hücrel işlevleri etkiler, göç yapışma ve çoğalma) özelliklerinden kaynaklı olarak HA oftalmik cerrahi, artrit tedavisi, doku iskelesi, doku mühendisliği, implant malzemelerle birlikte ve estetik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Klinik uygulamaları içerisinde doku rejenerasyonunu ve cilt onarımını aktive edici olarak kullanılır [63]. Su bağlama özelliğinin yanı sıra; anjiyogenezin aktivasyon ve inhibisyonunda rol aldığı ve buna bağlı olarak da karsinogenez sürecinde yer aldığı belirlenmiştir [62]. Cilt esnekliğini ve sıkılığını geliştirme, estetik bozuklukları düzeltme (dolgu) ve kozmetik ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [64].

HA bazlı son ürünlerin kullanım yeri ve fonksiyonları, HA'nın zincir uzunluğu ile doğrudan ilişkilidir [65]. Yüksek molekül ağırlıklı (10 kDa değerinden yüksek) HA; oftalmoloji, ortopedik, doku mühendisliği ve kozmetik alanındaki ürünlerde tercih edilir [66, 67]. Düşük molekül ağırlıklı (5 kDa civarları veya daha az) HA anjiyogenez ve tümör ilerlemesini durduran ajan olarak kullanılmaktadır [68]. Orta molekül ağırlıklı (5 kDa – 10 kDa arası) HA ise yara örtüsü olarak kullanılmaktadır [69].

Hyaluronik asit ürünlerine bilimsel araştırmalarda eşiktaşı özelliğindeki önemli tarihler özetlenecek olursa;

- 1880 – Portes, vitröz dokudaki musinin kornea ve kıkırdak gibi diğer mukoidlerden farklı olduğunu bildirdi ve adına hyalomukin adını verdi [70].
- 1934 – Meyer ve Palmer vitröz dokudan polisakkarit izole etti ve adına hyaluronik asit dedi [71].
- 30'lar ve 50'ler – Omurgalıların birçok farklı dokusundan hyaluronan izole edildi, karakterize edildi ve tanımlandı. Bazı patojen bakterilerin hücrelerini çevrelemek ve kapsül oluşturmak için hyaluronan kullandığı bulundu [72].
- 50'ler – Karl Meyer ve ekibi tarafından hyaluronanın yapısı aydınlatıldı. Hyaluronidaz kullanarak yapısal olarak benzer polisakkaritler ürettir. Göz cerrahisinden vitröz doku yerine hyaluronan kullanımı ilgi çekici halde geldi [73].
- 70'ler – Hayvansal dokulardan hyaluronan özütlemesini ve yapıdaki proteinlerin uzaklaştırılması optimize edildi. Bakteriyal fermentasyon ve kimyasal sentezle hyaluronan üretimi üzerine ilk çalışmalar başladı [72].
- 1979 – Horoz ibiğinden izole edilen hyaluronan için ilk patent alındı [74]. Hayvansal kaynaklı hyaluronanın insan üzerindeki uygulamaları endüstriyel bir adımdır. 1980'de katarakt cerrahisinde kullanılan Healon adlı bir ürün tanıtıldı.
- 90'lar ve 00'ler – Bakteriyel fermentasyonla yüksek molekül ağırlıklı hyaluronan üretmek için çalışmalar yoğunlaştı. Polimerin molekül ağırlığı ve polidispersiteyi kontrol etmeye yönelik çalışmalar yapıldı [72].
- 1993 – Hyalurana UDP-GlcNAc ve UDP-GlcUA'yı polimerize eden enzimi kodlayan gen *Streptococcus pyogenes*'den DeAngelis ve meslektaşları tarafından izole edildi. Farklı mikroorganizmalardaki hyaluronan sentezleri karakterize edildi ve tanımlandı [75, 76].
- 1996 – Disakkarit birimlerinin kontrollü eklenmesi ile en büyük hyaluronik asit parçası olan bir oktomer üretildi [77].
- 2003 – Hyaluronanın enzimatik sentezi ve belirli uzunluğa sahip monodispers hyaluronan oligosakkaritleri sentezi üzerine çalışmalar yapıldı [78, 79].

1880 yılında Fransız kimyager Portes ile başlayan hyaluronik asitin tarihi; kornea ve kıkırdaktaki diğer mukoidlerden farklı davranışlar sergilemesini gözlemlemesiyle başladı [70]. Ellidört yıl sonrasına geldiğimizde Meyer ve Palmer sığır gözünden izole üstüne yöntem belirlerken, hidroid (vitröz) ve üronik asiti baz alarak hyaluronik asit ismini verdiler [73]. Günümüzde ise üstüne yapılan çalışmalarla çok revaçta olan bir biyopolimer bilim ve biyomedikal dünyasına kazandırılmış oldu.

Hyaluronan, canlı organizmalarda hyaluronan sentez enzimleri üzerinden üretilir. Bu enzimler ektive edilmiş nükleotid şekeri olan UDP-glukuronik asit ve UDP-N-asetilglukosamini hammadde olarak kullanarak; GlcUA ve GlcNAc birimlerini birbirlerine ekleyip, $\beta(1,4)$ -GlcUA- $\beta(1,3)$ -GlcNAc disakkarit birimlerinin büyümesiyle doğrusal heteropolisakkarit oluşturur [72].

2.1.3.3. Hyaluronik Asit Üretim Yöntemleri

Günümüzde hyaluronik asit üretiminde hayvansal kaynaklı dokulardan özütleme, bakteriyel fermentasyon ve in vitro sistemde üretim yöntemleri kullanılmaktadır (Şekil 2.6.). Genetiği değiştirilmiş suşlarla büyük ölçekli üretimler yapılabilmektedir. 1MDa'nun üstünde molekül ağırlığında HA üretilmekte olup bu son ürün kozmetik ve biyomedikal alanda hammadde olarak kullanılmaktadır [80].



Şekil 2.6. HA üretim yöntemleri

Horoz ibiği, sığır sinoviyal sıvısı, sığır gözü ve insan göbek kordonu en çok kullanılan hayvansal kaynaklar olmakla birlikte deniz canlılarının dokularından da hyaluronik asit elde edilebilmektedir. Hayvansal kaynaklı HA doğal olarak daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir [81]. Hayvansal kökenli HA iyi bir kaynak olmakla birlikte; dokulardan özütleme işlemi (öğütme, asidifikasyon, sıvı – sıvı özütme gibi) zahmetlidir ve bu kontrolsüz parçalama teknikleri son ürünün verimini ve polidispersitesini de etkilemektedir [82]. Bunun haricinde hayvansal kaynaklı HA'nın halen hyalüronidaz gibi hücrel proteinlere bağlı olabilme ihtimali de sorun teşkil etmektedir [81]. Bu proteinler bağışıklık sisteminde istenmeyen yanıt oluşturarak kirlenici etki gösterirler. Ayrıca yine hayvansal kaynaktan gelebilecek nükleik asit, virüs ve pironlar da yan etki gösterebilirler [83]. Hayvansal kaynaklı HA üretimi büyük tesisler gerektiren ve maliyetli bir yöntemdir.

Bakteriyel fermentasyonla üretimin ilk yıllarında doğal olarak HA üreten A ve C *Streptokoklar* kullanılmış; ilerleyen dönemde ise HA üreten genler bulunmuş ve bu genler bazı bakterilerde (*Bacillus*, *Agrobacterium*, *E. coli* ve *Lactococcus*) genetik olarak değiştirilerek toksinsiz HA üretimi sağlanmıştır [84, 85, 86, 87, 88]. Günümüzde en çok kullanılan *S. equisimilis*'dan *hasA* gen ile *Streptococci*'den *hasB*, *hasC* ve *hasD* genlerinin kombinasyonu ile genetiği değiştirilen *B. subtilis*'dir. Bu şekilde elde edilen HA; endotoksin ve ekzotoksin içermeyen genel olarak güvenli şekilde adlandırılan üründür [88]. HA üretimi genel olarak gram pozitif bakterilerde gözlemlenirken; genetiği değiştirilmiş gram negatif bakterilerde de üretim sağlanabilir. JM109 *E. coli* suşuna glukoz ve glukozamin medyalarının takviye edildiği fermentasyon ortamında 1.5 MDa molekül ağırlığa ve 3.8 g/L verime ulaşan HA sentezlenmiştir [89]. Büyük ölçekli sistemlerde bakteriyel HA üretimi 6-7 g/L'ye kadar çıkmaktadır. Bunun nedeni de sentezlenen HA ile birlikte ortamın viskozitesindeki artış ve buna bağlı olan düşük oksijen kütle transferi oranıdır [80]. Bakteriyel kaynaklı HA genel olarak güvenli şekilde tasvir edilse de yine de içerisinde nükleik asitler, HA bağlayıcı proteinler, toksinler gibi kirleniciler bulunabilir [72].

Bir diğ er HA  retim yöntemi ise in vitro sistemde hücresiz üretimdir. Bu yöntemde hücresel hyaluronan sentezleyen izoenzim olan hyaluronan sentez (HAS) enzimleri kullanılır [90]. In vitro (hücre dışı) sistemde yüksek molekül ağırlıklı (1 – 2 MDa) ve düşük polidispersiteli HA üretmek mümkündür [91]. Reaksiyon karışımına HA oligomerleri eklenerek üretim süreci kontrollü olarak gerçekleştirilir. Polimerin uzunluğu oligomerin deşişimiyle ters orantılıdır. Hız sınırlandırıcı adım olan ilk glukozid bağının oluşumu adımı atlatılarak sondaki şekerlerin oligomer uçlarına hızla bağlanması sağlanır. Toplam HA verimi düşük olmasına rağmen yüksek molekül ağırlıklı HA  retilebilir.

2.1.3.4. Hyaluronik Asit Ayırma ve Saflaştırılması Yöntemleri

Fermentasyon ortamından hyaluronik asidin ayırma ve saflaştırma süreci genel olarak; ön arıtma, ayırma ve saflaştırma olarak üç adımda gerçekleştirilir (şekil 2.7.) [91].

1.  n arıtma; asidifikasyon, ısıtma, seyreltme ve filtrasyon işlemlerini bünyesinde barındırır.
 - a. Asidifikasyon: Fermentasyon karışım önce trikloroasetik asit ile asidik, sonrasında ise sodyum hidroksit ile bazik hale getirilir ve seyreltilir. Bu işlem yaklaşık olarak 6 saat sürmektedir.
 - b. Isıtma: Çözelti 70 C'ye ısıtılıp, soğutulup sonra tekrardan seyreltilir. Bu işlem yaklaşık 6 saat sürmektedir.
 - c. Seyreltme ve filtreleme: Çözelti seyreltilip, kitosan ve diatomit üzerinden fitrelenir. Bu işlem yaklaşık 3 saat sürmektedir. HA içeren s z len sıvı bir sonraki basamağa aktarılır.
2. Ayırma; Alkollü sedimantasyon, setilpiridinyum klorür (CPC) ve ultrafiltrasyon basamaklarını bünyesinde barındırır.
 - a. Alkollü sedimantasyon: Bir  nceki basamaklardan geçen çözelti etanol ile muamele edilir ve santrifüjlenir.   kelti alınıp tekrardan su ile çözülür. Bu işlem yaklaşık 2 saat sürmektedir.

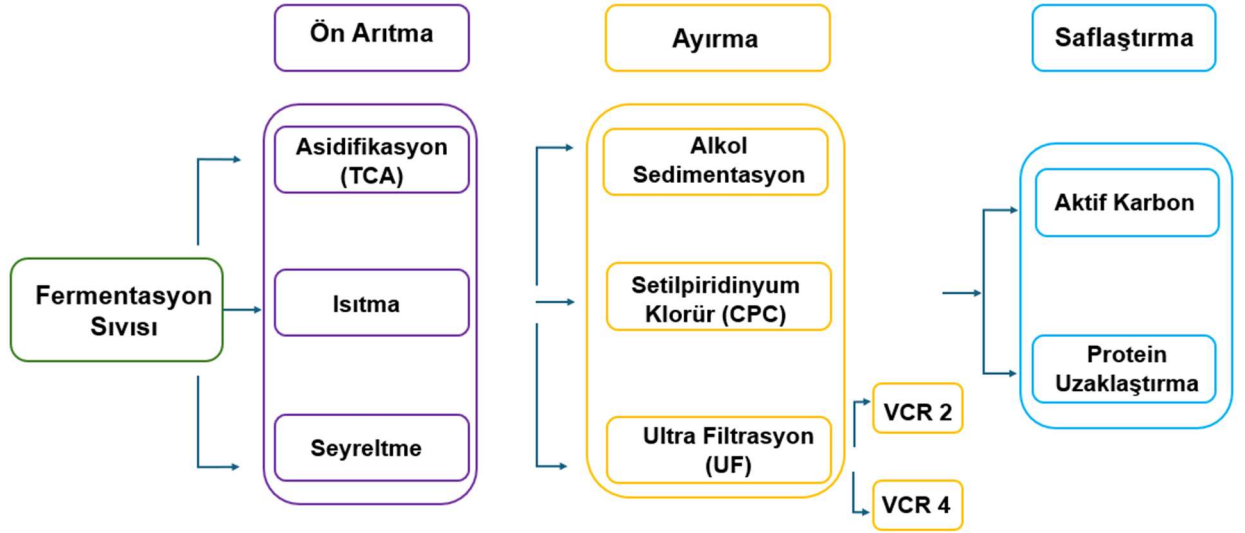
- b. Setilpiridinyum klorür: CPC eklenen çözelti devamında santrifüj edilir, çökelti toplanır ve tekrardan çözülür.
- c. Ultrafiltrasyon: Ultrafiltrasyon membranı (MWCO 50KD) kullanılarak filtre edilir.

3. Saflaştırma;

- a. Aktif karbon: Aktif karbon eklenerek karıştırılma ve süzme basamağıdır.
- b. Protein uzaklaştırma: Kloroform ve bütanol karışımıyla sıvı sıvı özütleme basamağıdır. Organik faz alınıp sulu faz ile işlem birkaç defa daha tekrar edilir.

Tüm bu işlemlerin sonucunda %62 verime varan seviyelerde HA elde edilir. Ayrıca %95'lik verimle de protein yapıdan uzaklaştırılmış olur [92]. Hyaluronik asidin ayrıştırılması ve saflaştırılması hem son ürünün kalitesini hem de maliyetini belirlediği için çok önemlidir.

Ayrılan ve saflaştırılan polimerin molekül ağırlığı ve saflık derecesi kullanılacağı yeri belirleyen noktalardandır. Ayırma ve saflaştırma sürecinin kısaltılarak; daha az kimyasal kullanımı, daha az zaman ve çevreci yöntemler geliştirme çalışmaları yoğun olarak devam etmektedir.



Şekil 2.7. HA ayırma ve saflaştırma işlemleri

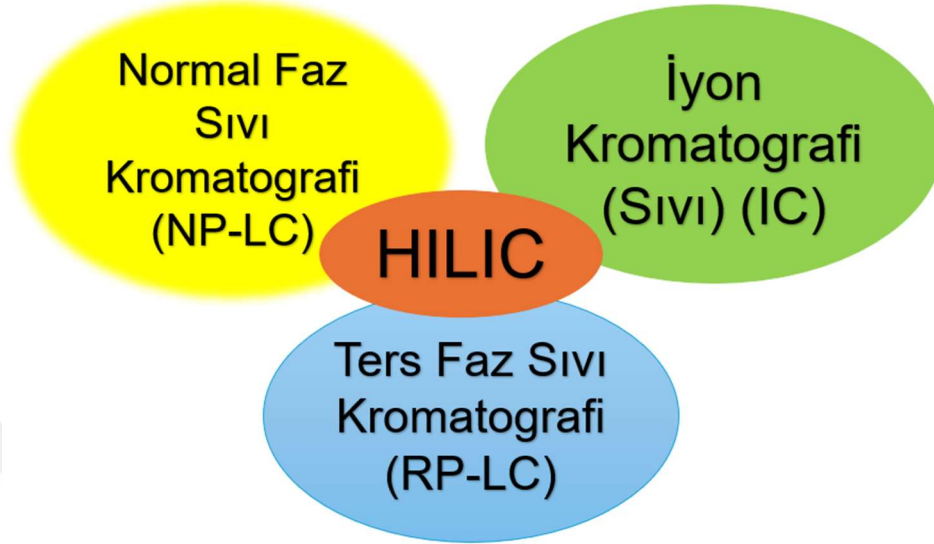
2.2. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofilik; suya karşı ilgiye sahip, suyu seven, su ile etkileşime giren anlamına gelmektedir. Kökeni Yunanca hydros ‘su’ ve philia ‘dostluk’ kelimelerinin birleşimiyle oluşmuştur. Hidrofilik moleküller veya hidrofilik kısımlar temel olarak iyonik gruplara sahip polar bileşiklerdir. Polar protik çözücü olan su, hidrojen bağı yapma eğilimindedir. Hidrofilik moleküller de su ile hidrojen bağı yaparak suyun içerisinde çözünürler. Hidrofilik maddelerin birbirleri arasındaki etkileşimden kaynaklı hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC), kromatografinin bir alt dalı olarak ortaya çıkmıştır. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde analizi yapılacak hedef molekül, immobilize hidrofilik grup taşıyan sabit faz üzerinde adsorplanır.

2.2.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Tarihi ve Gelişimi

Önceleri, HILIC’in normal faz sıvı kromatografisinin bir çeşidi olduğu kabul edilmiştir. Fakat HILIC’in ayırma mekanizmasının normal faz sistemindeki kadar basit değildir. 1975 yılında ilk nesil HILIC dolgu malzemeleri ortaya çıkarken; HILIC kısaltması ilk olarak 1990 yılında Alpert tarafından önerilmiştir [93]. İlerleyen yıllarda kendine özgü farklı bir teknik olarak tanınmış ve polaritesi çok yüksek bileşikler ayırmadaki potansiyeli ile 2000’li yıllarında başında popülerliği artmaya

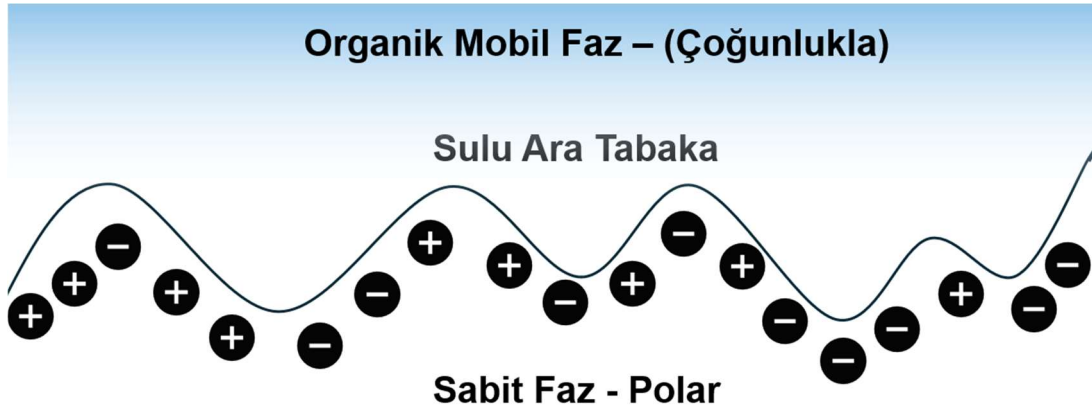
başlamıştır. 2003'ten sonra ise konu üstüne yapılan çalışmalar artarak devam etmiştir [94].



Şekil 2.8. HILIC yönteminin diğer kromatografik yöntemlerle karşılaştırılması

2.2.2 Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Temelleri

HILIC tekniğinde polar özellikli dolgu maddesi kullanılırken [95], hareketli faz ters faz kromatografisi çözücülerini gibi polar özelliklidir [96]. HILIC ile ayrıca iyonik bileşiklerin analizi de yapılabilinmektedir (Şekil 2.8.). Günümüzde HILIC yaygın olarak kullanılan bir ayırma ve saflaştırma yöntemi olmasına rağmen, etkileşimin temelini oluşturan tutunma mekanizmaları halen tartışılmaktadır [97]. En kabul gören model; su ile zenginleştirilmiş ve dolgu malzemesi üstüne immobilize halde olan ligand ile elüent arasındaki bölünme mekanizmasıdır [98, 99]. Bölünme mekanizması tüm temeli de açıklamada yetersiz kalmaktadır. Çünkü farklı fonksiyonel gruplar farklı etkileşimler oluşturmaktadır [100]. Bu bağlanma HILIC için çok yönlü bir tutunma mekanizması olduğu söylenebilir. Bu mekanizma içerisindeki etkileşimler; dihidrojen bağı, dipol dipol etkileşim, elektrostatik etkileşimler gibi adsorpsiyon süreçleridir (şekil 2.9.) [101].



Şekil 2.9. HILIC ayırım mekanizmasının şematik göstermi

2.2.3. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisindeki Parametreler

HILIC'deki tuz derişimi, pH, sıcaklık, kullanılan ligand türü, kolon dolgu malzemesi gibi bir çok parametre analizi doğrudan etkileyebilmektedir [101 - 105] . Yapılacak olan analize göre optimum koşullar sağlanarak en iyi sonuç elde edilir.

2.2.3.1. Ligand Çeşidi

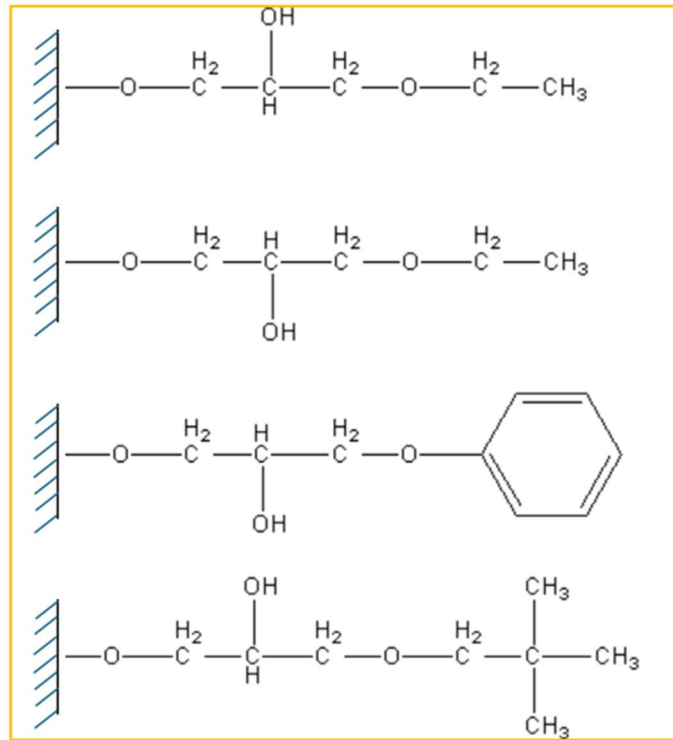
Akademi ve kolon firmaları tarafından ilgi duyulan HILIC yöntemindeki sabit fazlar ticari olarak piyasaya sürülmüş ve kullanılabilir haldedir. Literatüde 50'den fazla sabitin fazın kullanıldığı belirtilmiştir [106]. HILIC'de en çok kullanılan sabit faz modifiye edilmemiş silikadır. Tip A, Tip B ve Tip C olmak üzere 3 farklı silika jel vardır. Asit ve bazların ayırımında kullanılırlar. Tip C silikalar; silanol grupları yerine silikon hidrür (Si-H) gruplarına sahiptir ve polariteleri daha düşüktür [107].

Silika yüzeyinin kimyasal modifikasyonu ile modifiye silika jel sabit fazları üretilir. Siyano, diol, amino, amid gibi farklı fonksiyonel gruplar ile yüzey modifiye edilebilir (Şekil 2.10.)

- Amino - Aminopropil modifiyeli silikalar; genellikle karbohidratların analizinde ve asidik bileşikler için kullanılır. Dezavantajları; tamponda dengelenmesi yavaştır ve sulu fazlarda sınırlı kararlılık göstermektedir [99].

- Diol modifiyeli silikalar; hidrojen bağı yapma kapasiteleri yüksektir ve yüksek polarite sunar. Genel olarak çok fazla tercih edilmeyen bir modifiye ajandır [98].
- Amid grubu modifiyeli silikalar; birçok farklı HILIC uygulamasında kullanılan oldukça popüler ürünlerdir [108]. Eluent pH'larına karşı duyarlılığı azdır.
- Siyano modifiyeli silikalar; hidrojen bağı dönörü değildir ve hidrofilitikleri düşüktür. Polar bileşikler için tutunma kabiliyeti düşüktür. Bazı özel uygulamalarda siyano modifiyeli silikalar kullanılmaktadır [109].

Zwitteriyonik fazlar nispeten yeni olan ama kullanımı artışta olan polar bir sabit faz türüdür. Yapısında hem pozitif hem de negatif iyon bulunduran polimerik ligandlardır. Yükün polimerin ucunda veya başında olmasına göre farklı seçicilik gösterirler [110 - 112]. Ters faz kromatografisine göre farklı seçicilik göstermesi ve polar bileşikler üzerindeki güçlü tutulma kabiliyeti nedeniyle HILIC'in popülerliği artmaktadır. Her yöntem gibi tutunma kabiliyeti sadece liganda göre değil; sıcaklık, pH ve hareketli faz gibi etmenlere göre de değişmektedir.



Şekil 2.10.HILIC uygulamalarında tercih edilen fonksiyonel sabit faz örnekleri

2.2.3.2. Tuz Derişimi ve Türünün Etkisi

Literatürde artan tuz derişimi ile HILIC'te artan etkileşim olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur [96]. Tampon derişiminin artmasıyla artan alıkonma genel eğilimi, bir hidrofilik bölüşme (dağıtma, dağılım) süreci ile ilişkilendirilmiştir. HILIC için bölüşme modeli, sabit fazda su zengini bir sıvı tabakasının varlığını varsayar. Hareketli fazdaki organik çözücünün yüksek seviyeleri, tuzu suca zengin sıvı tabasını tercih etmeye iter. Bu, sıvı tabakanın hacminin veya hidrofilikliğinin artmasına neden olur ve böylece daha güçlü alıkonmalara yol açar.

Tuz derişimi ve türünün etkisini inceleyen çalışmalarda çeşitli sınırlamalar ile karşılaşılmaktadır. Bunlar [113];

- Yüklü standartların kullanılması. Bu durum tuzun elektrostatik etkilerini görmeyi sınırlandırmaktadır.
- Farklı bileşikler üstünde farklı etkilerin görülmesi. rnek olarak salisilik asitte artan amonyum tuzu ile etkileşimin azaldığı grlmştir [114].
- Amonyum asetat ve amonyum format tuzları genel olarak incelenmiştir.
- Fosfat ve sülfat tuzları çözünürlüklerinin sınırlı olabileceğinden kaynaklı olarak kullanılmamıştır.
- Tuz derişiminde sınırlı bir aralığın inceleniyor olmasıdır. Genel olarak 2 – 20 mM aralığı incelenmiştir. Bu aralığın dışında nasıl bir mekanizma gerçekleştiği detaylı olarak araştırılmamıştır.



Çökelme Etkisinde (tuz dışlama – salting out) Artış

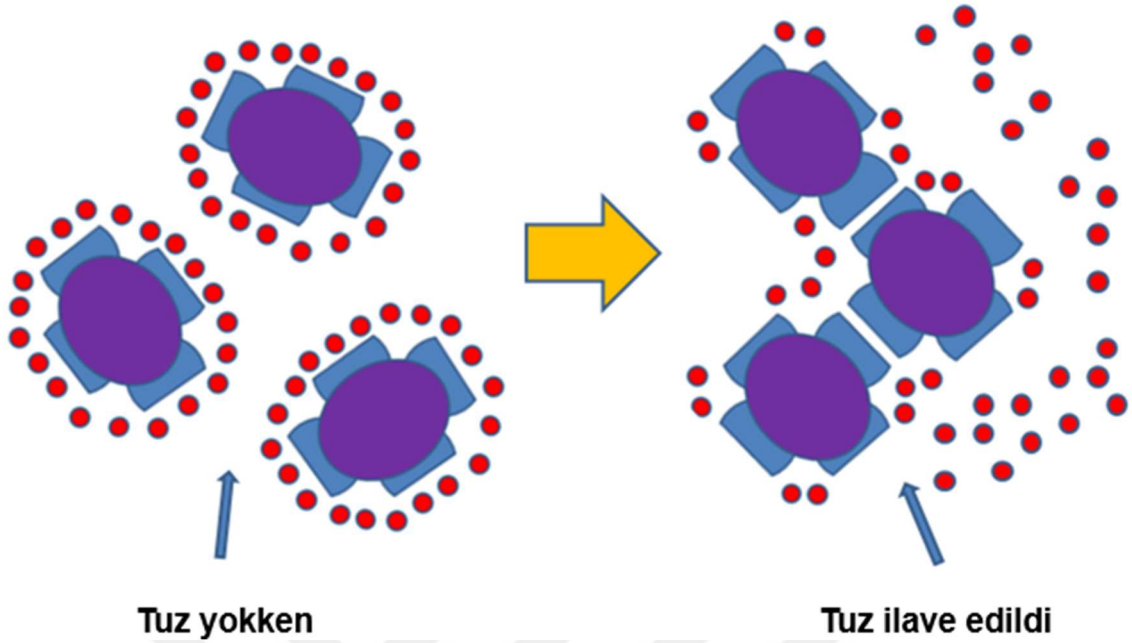
Anyonlar: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COOH^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-

Kasyonlar: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Ca^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}

Kaotropik Etkide (tuz çözme – salting in) Artış



şekil 2.11. Hoffman tuz serisi



Şekil 2.12. Analit – analit etkileşimine tuz varlığının etkisi

Sodyum, potasyum ve amonyum sülfat yüksek çöktürme etkisine sahip olmasına rağmen, bu tuzlar hidrofobik etkileşimi teşvik eder (Şekil 2.12.). Nötral pH'lardaki su ve seyreltik tampon ile bağlı biyomoleküller elüe edilir.

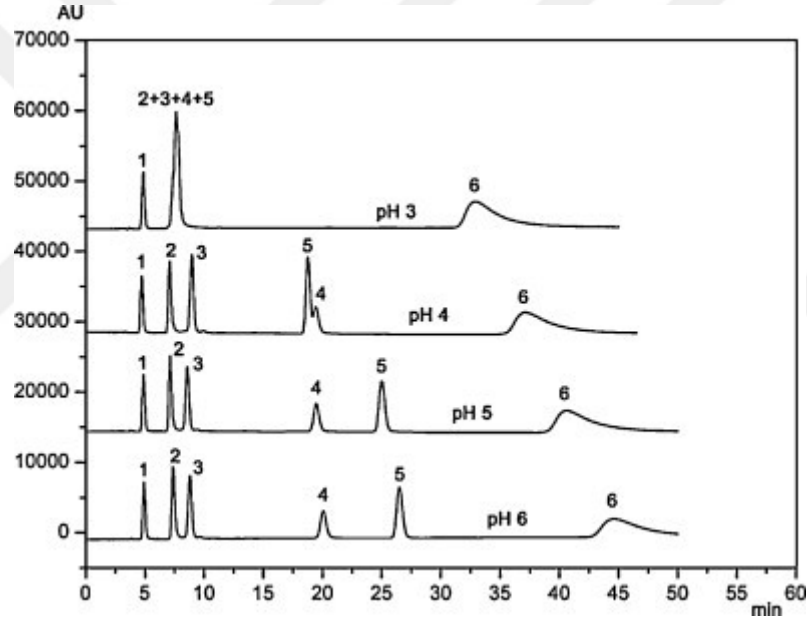
Adsorpsiyon kapasitesindeki önemli artış, tuz derişiminin çökelme sınırının üzerine çıkmasıyla görülebilir. Yüksek tuz derişiminde biyomoleküllerin çöktürülmesine tuz dışlama (salting out) denilir (Şekil 2.11.). Bu işlem biyomoleküllerin çözünürlüğünü azaltır. Fakat yapılarında herhangi bozulmaya sebebiyet vermez. Düşük tuz derişiminde biyomoleküllerin çözünmesine ise tuz çözme (salting in) adı verilmektedir.

2.2.3.3. pH etkisi

Ortam pH değerinin hidrofilik etkileşim kromatografisi üzerindeki etkisini göz önünde bulundurmak gerekir. Polar çözücülerin ve sabit fazın yük durumunu değiştirebileceği için pH önemli bir faktördür. Genel olarak bakıldığında HILIC'de yüklü çözücüler daha güçlü tutunur. Bunun nedeni de yüksüz formlarına göre daha

hidrofilik olmalarıdır [96]. Ortam pH'ı, istenilen ayrımı elde etmek için kullanılabilecek önemli bir parametredir.

Diol fazında suda çözünür vitaminlerin tutunmalarına yönelik pH'ın etkisini inceleyen Stalika ve çalışma arkadaşları [115]; nikotinamid, piridoksin ve riboflavinin yük durumlarında pH'ın değişimiyle bir etkilenme olmadığı, pH 3 – 6 aralığında aynı tutunmayı gösterdiğini rapor etmişlerdir. Deprotosyonun artması nedeniyle daha yüksek pH'larda nikotinik asit ve L-askorbik asidin tutunmasında artış olduğu rapor edilmiştir. pH 3 ve pH 4'de eş tutunma gözükürken; pH 5 ve pH 6'da ayırım daha iyi hale gelmiştir (Şekil 2. 15.).



Şekil 2.13. Farklı pH değerlerinde karışımdaki moleküllerin tutunma sürelerindeki değişimi gösteren HPLC kromatogramı [115].

Hareketli faz pH'ı dışında sabit fazın yük durumu da tutunmayı ve seçiciliği etkileyebilir. Bunun nedeni de yüklü çözücüler, yüklü sabit fazlarla elektrostatik etkileşime girerek; çekme veya itme etkisi gösterebilir. Ortam pH'sı; hem hareketli faz, hem sabit faz hem de üstüne çalışılan molekülü etkileyen bir parametredir. Bu üçlü etkileşim içerisinde tutunma ve seçicilik değişiklik göstererek farklı sonuçlara sebep olur.

2.2.3.4. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık ayırımı etkileyen önemli parametrelerden biridir. Bu durumu; hedef molekülün difüzyonuna, hareketli fazın viskozitesine, hedef molekülün hareketli faz ve sabit faz arasındaki transfer entalpisine etki ederek ortaya çıkartır. Bunun temelini ise termodinamik ilkeler oluşturmaktadır. Genel olarak sıcaklıktaki artış difüzyon katsayısını da arttırarak genişleyen pikleri daha dar hale getirmeyi başarabilir. Aynı zamanda yüksek sıcaklıkla birlikte tutunma daha da zayıflayabilir. Sıcaklık değişimiyle hedef molekülün yapısındaki fonksiyonel grupların seçiciliğe etkisinin önemli boyutlara çıkar [116, 117]. Sıcaklık ile gözlenen seçicilik değişiklikleri; hedef molekülün moleküler yapısına ve hedef molekül ile sabit faz arasındaki etkileşimlerin farklılıklarına bağlıdır [118]. Sıcaklık; hedef molekülün hareketli fazdan sabit faza geçiş entalpisini değiştirmekle birlikte, hedef molekülün farklı konfigürasyonları arasındaki dönüşümünü de etkiler. Özellikle karbonhidratların analizinde bu durum bir avantaja dönüşür. Karbonhidrat analizinde yüksek sıcaklıkla; hedef molekülün farklı konfigürasyonlarına sahip izomerleri ayırt edilemez ve geniş veya bölünmüş olan pikler tek bir pike indirgenebilir [119, 120]. HILIC içerisinde sıcaklığın bu etkisinin tam tersi olarak artan sıcaklıkla birlikte tutunma daha da artabilir. Yükselen sıcaklıkla azalan tutunmaya ters olan bu durum normal davranışa göre tutarsız olarak nitelendirilebilir [118].

2.2.3.5. Hareketli Faz Çözücüleri Etkisi

HILIC'de su ile asetonitril, metanol, izopropanol, tetrahidrofuran ve etanol gibi organik çözücüler birlikte kullanılabilir. HILIC'teki tutunmanın üzerine hareketli faz bileşiminin etkisi klasik ters faz kromatografisindeki göre önemli ölçüde farklıdır. Hareketli faz HILIC'de sabit fazdan daha az hidrofilik olabilir. Genel olarak hedef molekül yapısında polariteyi arttıran fonksiyonel gruplar veya hidrofilliği artırıcı fonksiyonel gruplar bulunması sabit fazla olan etkileşimi de artırma eğilimindedir. HILIC yönteminde kullanılan organik çözücüler; polar protik ve polar aprotik olarak ikiye ayrılabilir. Polar protikler; metanol, izopropanol, asetik asit ve etanol gibi çözücülerdir. Polar aprotik çözücüler ise asetonitril ve tetrahidrofuran gibi

çözücülerdir. Polar protikler hem hidrojen bağı veren hem de alan, polar aprotikler sadece hidrojen bağı alan özelliktedir. Polar protikler hidrojen bağı yapma ilgilerinden kaynaklı HILIC sabit faz yüzeyinde bulunan polar bölgelere rekabetçi bir şekilde yaklaşabilirler. Bu durum yüzeydeki su tabakasını bozup çözücünün yerini almasıyla birlikte daha hidrofobik bir yüzeyin oluşmasıyla sonuçlanabilir. Bu durum da güçlü hidrofilik yapıdaki moleküller daha zayıf bir tutunma alanı bulur [121]. Hareketli fazın bileşimi ile sıcaklığın etkileri birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir. Etkileşimi iyileştirmek için bu iki parametrenin birlikte optimizasyonu uygun bir yaklaşımdır [122].

2.3. Çekirdek – Kabul Partiküller

HPLC yönteminde rutinde monolitik ve partikül olmak üzere 2 çeşit dolgu malzemesi kullanılmaktadır. Monolitik dolgu malzemesi yek pare yapıda olup, silika ve polimerik yapıların kullanıldığı bir malzeme türüdür. Partikül dolgu malzemelerinde en çok kullanılan malzeme ise silika kürelerdir. Genel olarak dolgu malzemelerinin yüksek verimlilikte ve hızlı ayırım yapmaları, yüksek çözünürlük ve düşük geri basınç sergilemeleri ana hedef olarak istenir [123].

Dolgu malzemesi olarak çeşitli polimer ve seramik mikroküreler kullanılmasına rağmen en çok kullanılan ve araştırılan malzemeler silika mikrokürelerdir. Partiküllerin özellikleri (gözenek büyüklüğü, parçaçık büyüklüğü, yüzey alanı, karbon yükü, üretim teknoloji gibi) doğrudan performansını etkiler. Örnek olarak; küçük gözenekli veya gözeneksiz partiküllerde kısa difüzyon yoluyla bant genişlemesi azalırken, daha hızlı kütle transferi gerçekleşir ve tutunma partikül yüzeyinde meydana gelir [124]. Bu tarz bir partikülde yüzey alanı düşük olduğu için etkileşim, dolayısıyla seçicilik ve tutunma azdır. Yüzey alanı arttıkça etkileşimin gerçekleşebileceği alan da artmaktadır. Yeterli kütle transferinin gerçekleşebilmesi için gözenek boyutunun 7 nm'den büyük olması gerekmektedir. Bununla birlikte moleküler yapısı büyük biyomoleküller için 100 nm'ye kadar büyük gözeneklere sahip partiküller gerekebilir [125].

2.3.1. Çekirdek - Kabuk Partikül Tarihi

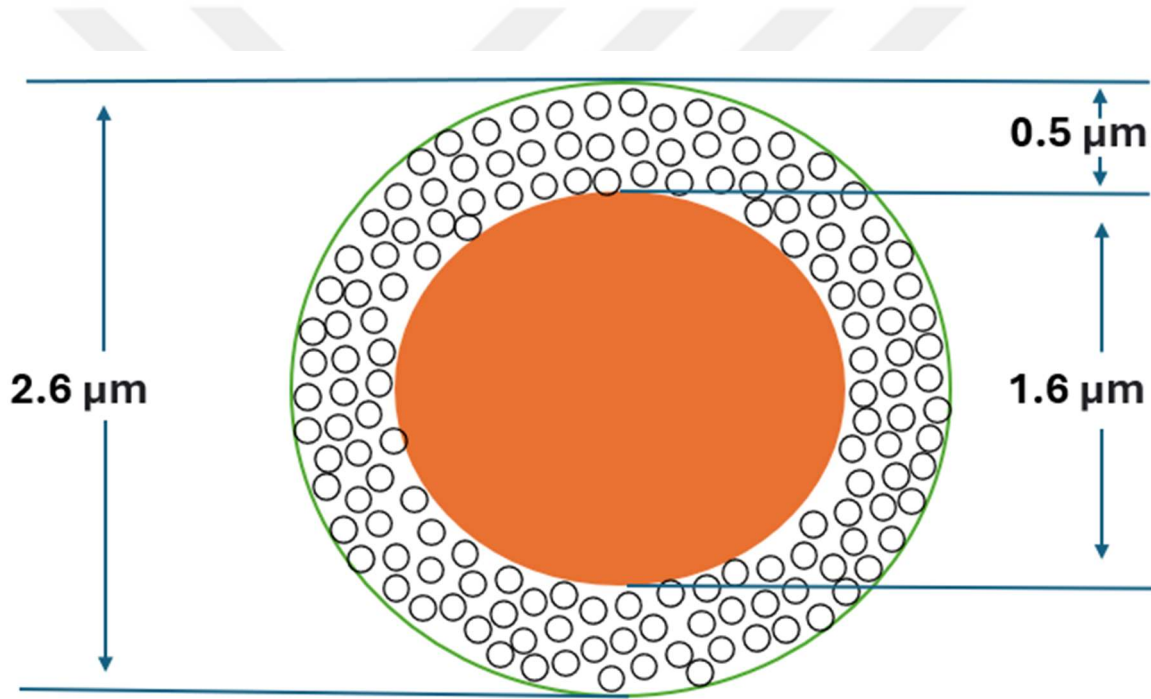
Molekül ağırlıkları daha düşük, buharlaşma kapasitesi yüksek hidrokarbon, petrokimyasallar ve yağlar gibi moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için gaz kromatografisi sistemi ilk kullanılan sistemdir. Molekül ağırlığı yüksek ve buharlaşma kapasitesi düşük moleküller için sıvı kromatografi sistemi geliştirilmiştir [126]. 1960'ların sonlarında partiküllerin yüzeyini farklı bir film tabakasıyla kaplama fikri Parish tarafından ortaya atılmış [127]; devamında Knox kaplama üstüne çalışmalarda bulunmuştur [128]. Horváth ve Lipsky tamamen gözenekli parçacıklar yerine peliküler (kabuk yapılı) parçacıkların güzel sonuçlar verdiğini göstermiştir [129, 130]. Devam eden süreçte Kirkland tarafından daha kalın bir tabakayla partikülü kaplayarak yapılan çalışmalar başlamış ve özellikle makromoleküller üstüne ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır [131, 132]. Bu parçacıkların daha yüksek mekanik dayanıma sahip olması ve simetrik küresel şekilleriyle; düzensiz şekilli veya monodispers olmayan silika partiküllere göre tekrarlanabilirlik ve kararlılığı yüksek sonuçlar elde edilirken adına da kontrollü yüzey gözenekli sabit faz denilmiştir [131, 133].

Ticarileşen dolgu malzemeleri ilk başlarda 100 µm civarlarındayken, 40 – 50 µm, ardından 20 – 10 ve 5 µm'ye düşmüştür. [128, 134, 135]. 1980'lerin başlarında 5 µm'luk partiküllere gelinirken, 1990 ve 2000'li yıllarda 3 µm, 2 µm, 1,7 µm ve 1,5 µm'luk partiküller üretilmiştir. 1 µm'luk partiküller de son 10 yıldır var olmakla birlikte, yüksek geri basıç oluşturmalarından ve ayırım güçlerinde önemli bir pozitiflik olmadığı için kısıtlı ticareti başarı eldi edilmiş ve rağbet görmemişlerdir [136]. Son 10 yıllık süreçte çekirdek – kabuk kavramı tekrardan popüler olarak ticari kolonlar arasında yüksek sıralamalara ulaşmaya başlamıştır.

1960'lı yıllarda başlayan tarih boyunca çeşitli partiküller sentezlenmiş, denenmiş, ticarileşmiş, popüleritesini kaybetmiş ve tekrardan önem kazanmıştır. Bu süreç içerisinde; peliküler ya da yüzey gözenekli partikül (SPP), kontrollü gözenekli malzeme (CPM) ya da füzyon çekirdek partikülleri (FCP) isimlerini alırken bu isimler artık yerini çekirdek – kabuk (core-shell) veya sadece kabuk (shell) isimlerine bırakmıştır.

2.3.2. Çekirdek – Kabuk Partikül Yapılı Kolon Dolgu Malzemeleri

Son yıllarda tekrardan popüler olan çekirdek – kabuk partiküller, yüksek akış hızlarına ulaşabilen ve nispeten düşük geri basınç sergileyen özellikleri ile yüksek verimli ayırım için kullanılmaktadır [137]. Çekirdek ve kabuk yapısı partikül boyutu ve morfolojisini belirlerken; kabuk yapısı afinite gösteren fonksiyonel bölgeyi oluşturur. Örnek olarak; 2,7 μm çekirdek kabuk partikülün yapısını 1,7 μm 'luk çekirdek kısım ve 0,5 μm 'luk kabuk yapısı oluşturur (Şekil 2.14.). Böylece 2 μm -altı (sub-2 μm) boyutlu partikülün ayırım gücü ve tutunma değerlerine ulaşılırken; 3 μm boyutlu partikülün yapmış olduğu geri basınç değerlerine yakın bir basınçla karşılaşılır [138].

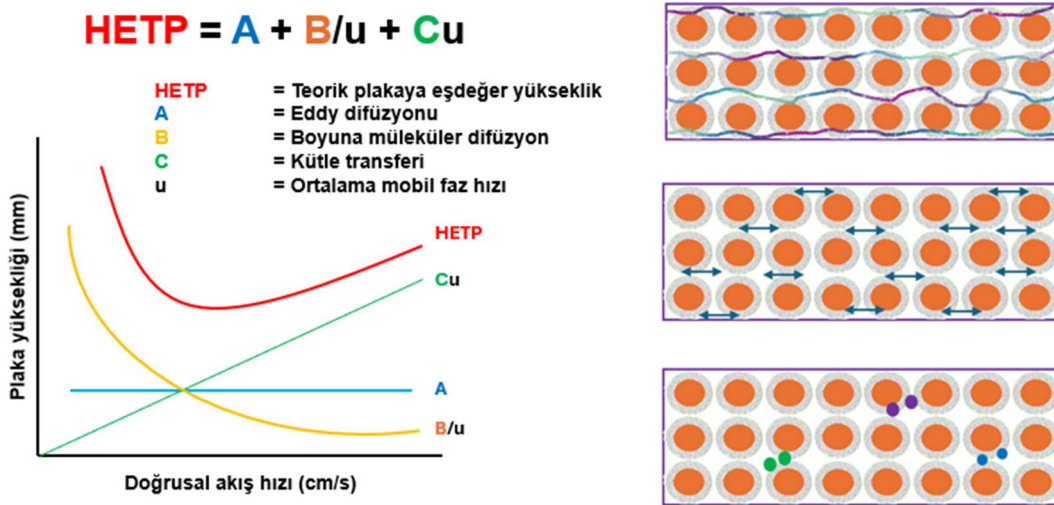


Şekil 2.14. Silika çekirdek – kabuk partikülün şematik diagramı

Çekirdek – kabuk partikül morfolojisi başlarda azalan kütle transfer direnci ve monodispers dağılım avantajlarıyla popüler olsa da sadece bunlarla sınırlı olmayan avantajları vardır. Bu avantajlardan bahsetmeden önce sabit bir yatak ortamında hareket eden moleküllerin dağılıma mekaniğini belirleyen van Deemter denkleminin incelenmesi gerekmektedir. Partiküllerden oluşan kolon içerisinde akış dinamiği van Deemter denklemi ile açıklanır. Denklemin sonucu H değeri olan teorik plaka yüksekliğini oluşturur. Plaka yüksekliğinin küçük olması teorik plaka

sayısını artırır. Teorik plaka sayısının yüksekliği ise doğrudan kolonun ayırım gücünü gösteren bir değerdir.

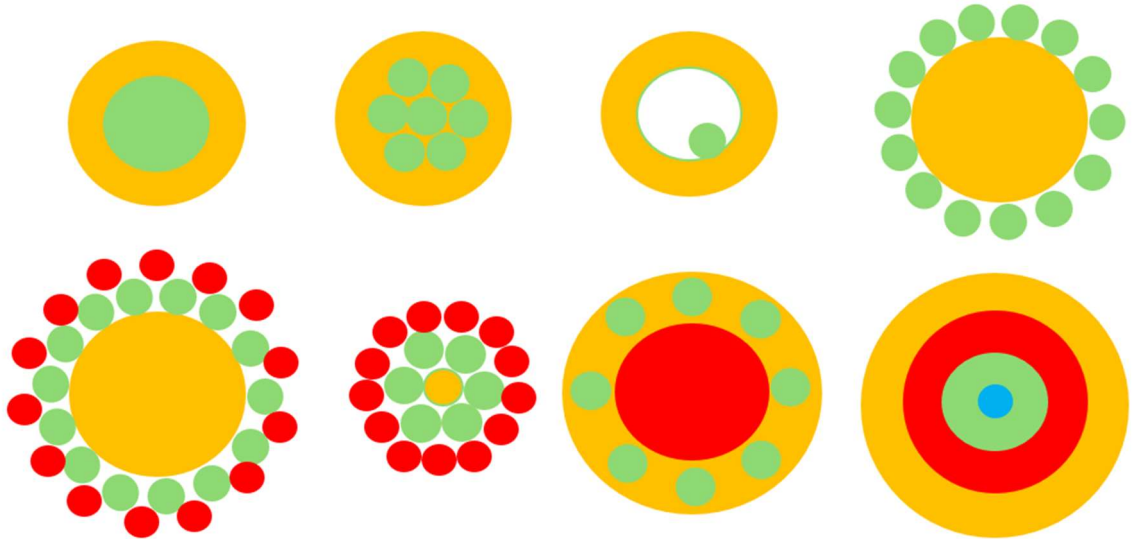
van Deemter denklemi içinde A, Eddy difüzyonunu simgeler. Partiküller ne kadar monodispers bir yapıda ise akış o kadar doğrusal olacaktır. Doğrusallığın azalmasıyla birlikte H değeri artacak, dolayısıyla teorik plaka yüksekliği artacaktır. Plaka yüksekliğinin artması teorik plaka sayısını azaltacak ve kolonun ayırım gücünü düşürecektir. Bundan kaynaklı olarak monodispers yapıları kolonlarda akış doğrusala yakın bir şekilde gerçekleşerek H'nin düşük değerlerde olması sağlanmış olur. B sembolü boyuna difüzyonun terimidir. Boyuna difüzyonun artmasıyla birlikte H değeri artacak ve dolayısıyla teorik plaka sayısı azalacaktır. Bu değer artması aynı zamanda kromatogramda piklerin yayvanlaşmasına; azalması ise piklerin sivrilmesine neden olmaktadır. C sembolü hareketli fazdan sabit faza olan sınırlı zaman içindeki kütle transferini simgeler. Monodispers olmayan partiküllerde; büyük partikülde kütle transferi fazla olup ve daha uzun sürede partikülden geçiş gözlemlenir. Bununla birlikte küçük partikülde kütle transferi daha kısa sürede olacağı için partikülü geçmek daha hızlı olacaktır. Kütle transfer değerinin artması H'yi arttıracak, dolayısıyla teorik plaka sayısını düşürecektir (Şekil 2.15.). Bu değer artması aynı zamanda kromatogramda piklerin yayvanlaşmasına, değer azalması ise piklerin sivrilmesine neden olmaktadır.



Şekil 2.15. van Deemter eşitliği ve kolon akış profilinin şematik gösterimi

Çekirdek – kabuk yapısındaki partiküllerin avantajlarından birisi daha küçük gözenek hacminin boyuna difüzyon değeri olan B 'yi azaltarak hem teorik plaka sayısını arttırmak hem de dik ve simetrik pikler elde etmeyi sağlamasıdır. Kısa difüzyon yolu ile birlikte hızlı kütle transferiyle birlikte C değeri azalarak hem teorik plaka sayısı artacak hem de pikler dikleşecektir [139, 140]. Monodispers yapıyla birlikte A değeri olan Eddy difüzyonu da azalacak, teorik plaka sayısının artmasıyla seçicilik artacaktır. Çekirdek bölgesinin kalınlığı ile kabuk kısmının kalınlığı ayırım parametrelerini önemli ölçüde etkiler. Gözenekli kabuğun kalınlığının azalmasıyla birlikte daha hızlı kütle transferi ve hızlı elüsyonla birlikte kolon verimliliği de artabilir [141, 142].

Çekirdek ve kabuk; aynı bileşiklerden, farklı bileşiklerden veya aynı bileşiğin farklı türevlerinden oluşabilir. Şekil 2.16.'da da görüldüğü gibi çekirdek; tekli, çoklu, boşluklu, tek çekirdekli, çok çekirdekli gibi çeşitli yapılarda olabilir. Aynı şekilde kabuk da tek bir katman, çok katman, çok küçük kürelerin birleşimi gibi farklı yapılarda olabilir. Çekirdek kabuk partiküller genellikle iki veya daha çok aşamalı süreçlerle sentezlenir. Çekirdek kısmı önce sentezlenip, devamında ise kabuk yapısı veya yapıları partikül üzerinde oluşturulur [143].



Şekil 2.16. Çekirdek – kabuk yapılarda uygulanan farklı çekirdek ve kabuk kombinasyonları

Farklı malzeme ve yapıların istenilen özelliklerini bir araya getirerek kompleks bir etki göstermek amacıyla çekirdek – kabuk partiküller üstünde çalışmalar yapılmaktadır. Örnek olarak; silika kabuk ile kaplanan nanopartiküller, su ortamında kararlılığı ve biyoyuumluluğu sağlarlar [144, 145]. Çalışılacak bölgeye ve istenilen etki mekanizmalarına göre çeşitli çekirdek – kabuk kombinasyonlu partiküller kullanılmaktadır.

2.3.3. Çekirdek – Kabuk Partikül Sentez Yöntemleri

Çekirdek kabuk partiküllerin büyük bir yüzdesi katman-katman yöntemiyle sentezlenmektedir [137]. Bu yöntemde elektrostatik etkileşimler temel olmak üzere hidrojen bağları, van der Waals ve benzeri etkileşimleri kullanılarak katmanlar bir araya getirilir. Bu teknik; kompozitler ve mikrokapsüller oluşturmak için yaygın olarak kullanılır [146]. Bu yöntem ile çeşitli boyutlarda çekirdek – kabuk partiküller üretilir. Kabukta farklı gözenek boyutuna sahip tabaka farklı moleküller için kullanılır. Küçük moleküller için 8 – 10 nm, $M_n < 15$ kDa'dan küçük olan moleküller için 16 nm, $M_n < 500$ kDa için ise 40 nm boyutundaki gözenekli bir kabuk kullanılabilir [147 - 149].

Katman – katman yönteminden farklı olarak çekirdek üzerindeki kabuk farklı sentez yöntemleriyle de oluşturulabilir. Silika, polimer ve daha farklı mikrokürele çekirdek olarak kullanılıp, üzerine kabuk kısmı sentezlenir. Örnek olarak; polimerizasyon ile silika çekirdek – polimer kabuk parçacıklar [150], çöktürme polimerizasyonu ile çekirdek – kabuk hibrit partiküller veya boşluklu partiküller [151], silika – metal – organik çerçeveli (MOFs) çekirdek kabuk partiküller [152, 153], şekillendirilmiş nanoparçacık – kabuk nanoküreleri içermektedir [154]. Stöber yöntemi; silika mikroküreler veya nanoküreler hazırlamak için amonyak gibi alkali bir katalizör varlığında su, alkol ve tetraalkoksisilan içeren bir sistemde gerçekleştirilen sentez çeşididir [155]. Normalde Stöber yöntemi ile gözeneksiz küreler üretilirken; CTAB, setiltrimetilamonyum bromür veya farklı non-iyonik yüzey aktif maddelerin kullanılmasıyla gözenekli küreler de elde edilebilir [153, 156]. Stöber yöntemiyle farklı şekillerdeki partiküller üstüne de silika kaplama yapılabilir [157, 158].

Yerinde (in-situ) polimerizasyon ve çözelti – jelleşme (sol - gel) yöntemleriyle karmaşık yapılı çekirdek – kabuk mikroküreler sentezlenmiştir. Manyetik çekirdek - altın katkılı kabuklu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-Au}$ silika mikroküreler reaktant içermeyen immünosensör olarak çalışılmıştır [159]. Tek bir kap içerisinde sentez yöntemleri de mevcuttur. Tek kap yönteminde ölçeklendirme basitliği, maliyet ve kalite kontrol kolaylığı açılarından avantajlar sağlamakla birlikte ticari olarak geliştirilen partiküller tek kap içerisinde sentez yöntemi çok fazla kullanılmamıştır [160].

Mikroakışkan yöntemi ile sentezlenen partiküller yüksek monodispers özelliğe sahiptirler. Bu özelliklerinden kaynaklı olarak özellikle ticari HPLC kolonlarının performansları arttırmak için, emülsiyonlar, çift emülsiyonlar, karmaşık morfoloji ve bileşimlerde partiküller oluşturmak için kullanılmıştır [161 - 163]. Geleneksel emülsifikasyon yöntemlerinde polidispers kürecikler oluşurken, mikroakışkan yöntemiyle son derece homojen monodispers parçacıklar üretilebilir [164].

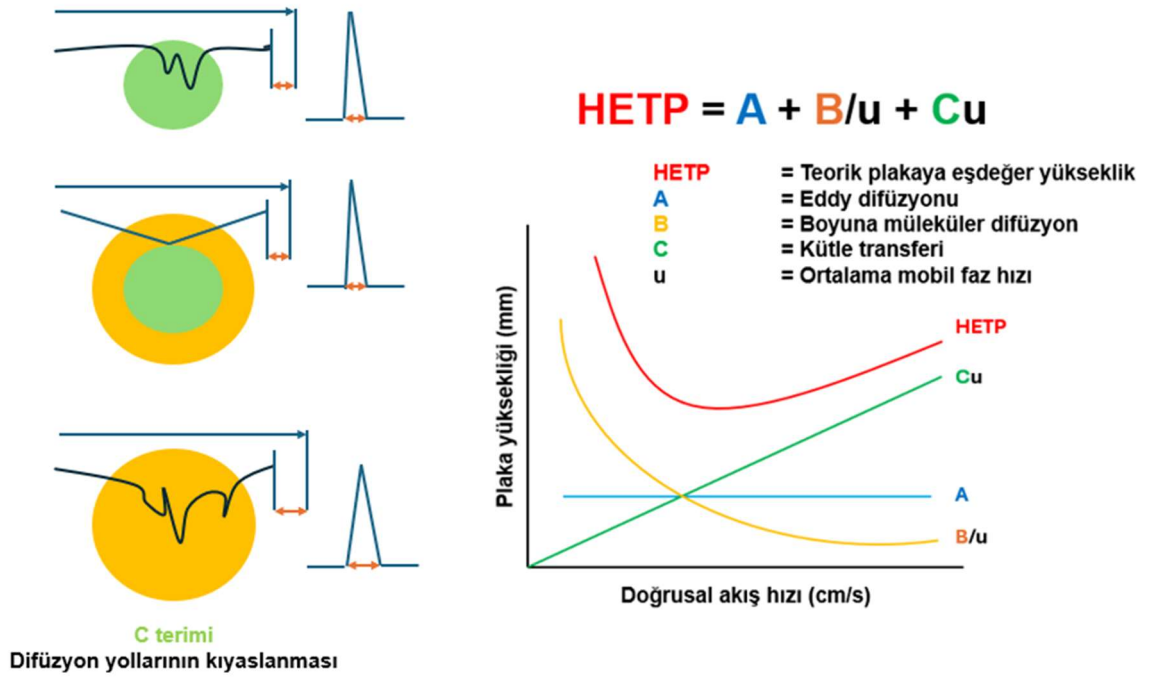
2.3.4. Çekirdek – Kabuk Partiküllerin Temelleri

Çekirdek – kabuk partikül morfolojisi başlarda azalan kütle transfer direnci ve monodispers dağılım avantajlarıyla popüler olsa da sadece bunlarla sınırlı olmayan avantajları vardır. Bu avantajlar üstüne değinebilmek için sabit bir yatak ortamında hareket eden moleküllerin dağılma mekaniğini belirleyen van Deemter denklemiyle koordine etki gösteren özellikleri de vardır.

Çekirdek – kabuk partiküllerin karakteristik özellikleri arasında; tutunma süresi, tutunma faktörü ve doygunluk kapasitesi yer almaktadır. Çekirdek – kabuk partiküllerde sabit faz hacim fraksiyonu standart partiküllere göre çok daha düşüktür. Bundan kaynaklı olarak tutunma süresi çekirdek – kabuk partiküllerde standart partiküllere kıyasla daha azdır. Böylelikle hareketli fazdaki çözücü derişiminin daha az hale getirilmesini ve daha az analit ile çalışabilme imkânı sunar. Bu durum da akışın doğrusal veya doğrusala yakın gerçekleşmesini sağlamış olur. Böylelikle Eddy difüzyon katsayısının düşmesi sağlanır.

Akış partiküllerin etrafında ve aralarında gerçekleşir. Partikülün boyutu yatak geçirgenliğini belirleyen parametredir. Bununla birlikte partiküllerin şekilleri ve gözenekliliği akışa karşı gösterdikleri direnci de belirler [165]. Partikül kolonlar, çekirdek – kabuk kolonlardan daha fazla geçirgenliğe sahiptir. Bu da boyuna difüzyonun artmasına sebep olarak van Deemter eşitliğini etki etmektedir.

Dış veya film kütle transfer katsayısı C_f ve tanecik içi kütle transfer katsayısı C_p 'nin toplamı kütle transfer direnci C 'yi oluşturur. C_f terimini hedef molekülün tanecikler içerisine girmede karşılaştığı zorlukları, C_p değeri ise tanecik içerisine girdikten sonra çıkana kadar olan zamanı hesaplar. Çekirdek – kabuk partiküllerde kabuk kısmı ince bir tabaka olduğu için bu tabakaya girmek için ve girince çıkmak için gereken değerlerin toplamı C , standart partiküllere göre düşüktür. Bu da van Deemter eşitliğine etki ederek teorik plaka sayısını arttırmaktadır.



Şekil 2.17. van Deemter eşitliğinde C terimi ve difüzyon yollarının kıyaslanması.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Gerçekleştirilen deneysel çalışmaları beş ana işlem altında toplamak mümkündür. Bu ana işlemler:

- Çekirdek olarak kullanılacak amfifilik polimerlerin ve silika kabuk kısımlarının sentezi,
- Yalancı spesifik ligand L-aspartik asit ve polimer çekirdek – silika kabuklu (mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2) partiküllerin karakterizasyonu,
- Çekirdek – kabuk partiküller ile sulu çözeltilerden hyaluronik asit adsorpsiyonu ve desorpsiyonunun incelenmesi,
- Çekirdek – kabuk partiküller ile sulu çözeltilerden hyaluronik asit adsorpsiyonunun kesikli ve sürekli sistemde incelenmesi,
- mod-SiO₂@P2 partikülleri ile sürekli sistemde hyaluronik aside karşı seçicilik çalışmaları

3.1. Kimyasal Malzemeler

Modifiye silika çekirdek – kabuk partiküller (mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2) sentezlenirken çekirdeği oluşturacak ana malzemeler metil metakrilat (MMA) ve poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA) Fluka AG (İsviçre) firmasından sağlandı. L-askorbik asit, Sigma Chemical Co., ABD firmasından termin edildi. Monomerler kullanılacak ana dek buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi. İyonik olmayan yüzey aktif madde Synperonic®F108, katyonik yüzey aktif madde setiltrimetil amonyum bromür (CTAB), başlatıcı olarak kullanılan 2-2-azobis(2-metilpropiyonamid) dihidroklorit (AAPH), silika kaynağı olarak kullanılan tetraetil ortosilikat (TEOS), bağlama ajanı olarak kullanılan 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve diğer kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta seçildi ve Merck AG (Darmstadt, Almanya) isimli firmadan temin edildi. Deneylerde kullanılan su; ultra saf su özellikte kullanıldı.

3.2. Amfifilik Çekirdeğin Sentezi

P1 olarak adlandırılan amfifilik polimer çekirdek partiküllerinin sentez yöntemi şu şekildedir; Schlenk reaktörüne MMA (2,0 mL, 18,70 mmol) ve PEGMA (M_n : 2000 Da, 0,50 g) konuldu ve sonrasında manyetik karıştırıcı altında 65°C'ye, PEGMA eritilip çözelti oluşturana kadar beklendi. Başka bir Schlenk reaktöründe; deiyonize ultra saf su (10 mL), iyonik olmayan yüzey aktif madde (Synperonic®F108, 0,10 g) ve katyonik yüzey aktif madde CTAB (0,10 g) eklenmiştir. Mekanik karıştırıcı yardımıyla 800 rpm karıştırma hızında oda sıcaklığında katılar çözününceye kadar muamele edildi. Sulu yüzey aktif madde karışımı üzerine çözelti monomer karışımı 800 rpm'lik karıştırma hızı ve oda sıcaklığı koşulları altında damla damla homojen bir emülsiyon oluşturuncaya kadar yavaşça eklendi. Reaktöre radikal polimerizasyon başlatıcısı olan APPH (10 mg) eklendi ve karışım 10 dakika boyunca azot gazı altında degaze edildi. Reaktör önceden ısıtılmış 75°C'lik yağ banyosuna alındı, 800 rpm'de 24 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra polimer soğuk dietil eter içerisinde çöktürüldü ve elde edilen kirli beyaz çökelti THF içerisinde çözündürülüp, sonrasında soğuk dietil eter içerisinde tekrardan çöktürülerek saflaştırıldı. Böylelikle çekirdek olacak P1 partikülleri elde edilmiş oldu.

P2 olarak adlandırılacak amfifilik polimer çekirdek partiküllerinin sentez yöntemi ise; P1 amfifilik polimer çekirdeğin sentez yöntemiyle aynı olmakla birlikte, oluşan polimer çekirdeklerin boyutunu büyütebilmek adına eklenen kimyasal maddelerin miktarlarında farklılık vardır. Schlenk reaktörüne MMA (1,50 mL, 18.70 mmol) ve PEGMA (M_n : 2000 Da, 0,50 g) konuldu ve sonrasında manyetik karıştırıcı altında 75°C'ye ısıtılarak, PEGMA eritilip bir çözelti oluşturana kadar beklendi. Başka bir Schlenk reaktöründe; deiyonize ultra saf su (10 mL), iyonik olmayan yüzey aktif madde (Synperonic®F108, 0,10 g) ve katyonik yüzey aktif madde CTAB (0,10 g) eklendi. 300 rpm karıştırma hızında oda sıcaklığında katılar çözününceye kadar tutuldu. Sulu yüzey aktif madde karışımına çözelti monomer karışımı 300 rpm'lik karıştırma hızı ve oda sıcaklığı koşulları altında damla damla homojen bir emülsiyon oluşturuncaya kadar eklendi. Reaktöre radikal polimerizasyon başlatıcısı olan APPH (20 mg) eklendi ve karışımın 10 dk boyunca azot gazı altında degaze edildi. Reaktör önceden ısıtılmış 75°C'lik yağ banyosuna alındı,

300 rpm'de 24 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra polimer soğuk dietileter içerisinde çöktürüldü ve elde edilen kirli beyaz çökelti THF içerisinde çözündürülüp, sonrasında soğuk dietil eter içerisinde tekrardan çöktürülerek saflaştırıldı. Böylelikle çekirdek olacak P2 partikülleri elde edilmiş oldu.

3.3. Amfifilik Polimer Çekirdeğin SiO₂ Kabuk İle Kaplanması

Stöber reaksiyon yöntemi ile amfifilik polimer P1 çekirdek üzerine mezo-gözenekli silika kabuk kaplandı. Bunun için; 0,20 g amfifilik polimer, etanol/su (v/v: 40/40 mL) karışımı içerisinde dağıtıldı (disperse edildi) ve 10 dakika boyunca homojen bir emülsiyon elde edilene kadar sonike edildi. Bundan sonra, katyonik yüzey aktif madde CTAB (0,10 g) silika kabul üzerinde mezo-gözenekli yüzey oluşturma ajanı olarak eklendi. Kaplama sırasında parçacıkların birleşerek çökmesini engellemek amacıyla iyonik olmayan yüzey aktif madde Synperonic®F108 (0,10 g) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 280 rpm karıştırma hızında 1 saat boyunca karıştırıldı. Silika kaynağı olarak kullanılan TEOS (1,5 mL) damla damla eklenmesinden sonra Stöber reaksiyonunu başlatmak için çözeltiye derişik amonyak (%25 hacmen, 1,0 mL) eklendi. Çözelti oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldı ve sonuç partikülle 6000 rpm'de santrifüj edilerek toplandı. Toplanan beyaz renkli katı, silika partikülün gözeneklerindeki yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması için geri soğutucu altında 1 mL derişik HCl içeren 50 mL etanol çözeltisi içersine eklendi. Son ürün santrijüfle toplanıp etanolle yıkandı ve yüksek vakum altında kurutuldu [166]. Sonuç ürün olan SiO₂@P1 çekirdek kabuk partiküller elde edildi.

Stöber reaksiyon yöntemi ile amfifilik polimer P2 çekirdek üzerine de mezo-gözenekli silika kabuk ayrıca kaplandı. Bunun için; 0,20 g amfifilik polimer, etanol/su (v/v: 40/40 mL) karışımı içerisinde dağıtıldı (disperse edildi) ve 20 dk boyunca homojen bir emülsiyon elde edilene kadar sonike edildi. Bundan sonra, katyonik yüzey aktif madde CTAB (0,10 g) silika kabul üzerinde mezo-gözenekli yüzey oluşturma ajanı olarak eklendi. Kaplama sırasında parçacıkların birleşerek çökmesini engellemek amacıyla iyonik olmayan yüzey aktif madde Synperonic®F108 (0,10 g) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 180 rpm

karıştırma hızında 1 saat boyunca karıştırıldı. Silika kaynağı olarak kullanılan TEOS (5 mL) damla damla eklenmesinden sonra Stöber reaksiyonunu başlatmak için çözeltiye derişik amonyak (%25 hacmen, 3,0 mL) eklendi. Çözelti oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldı ve sonuç partikülle 6000 rpm’de santrifüj edilerek toplandı. Geri soğutucu altında 10 mL derişik HCl içeren 50 mL etanol çözeltisi içerisinde eklendi. Son ürün santrijüfle toplanıp etanolle yıkandı ve yüksek vakum altında kurutuldu [166]. Sonuç ürün olan SiO₂@P2 çekirdek kabul partiküller elde edildi.



Şekil 3.1. Çekirdek kabuk partikül hazırlama sistemleri: A-) Mekanik karıştırmalı sentez ve B-) Polimerizasyona katılmayan maddelerin geri soğutucu ile uzaklaştırılması

Çizelge 3.1. mod-SiO₂@P1 partikülünün polimerizasyon içeriği ve işlem koşulları

Polimer karışımı (Amfifilik P1 çekirdeği)	Polimerizasyon koşulları
MMA (2,0 mL, 18,70 mmol) PEGMA (M _n : 2000 Da, 0.50 g) Deiyonize ultra saf su (10 mL) CTAB (0,10 g) Synperonic®F108, 0,10g APPH (10 mg)	Karıştırma hızı: 800 rpm Sıcaklık ve zaman: 75°C - 24 saat.
P1 çekirdeğin SiO ₂ kabuk ile kaplanması	Kaplama koşulları
0,20 g amfifilik polimer Etanol/su (v/v: 40/40 mL) Synperonic®F108, 0,10g CTAB (0,10 g) TEOS (1,5 mL) Derişik amonyak (%25 hacmen, 1,0 mL)	Karıştırma hızı: 280 rpm Sıcaklık ve zaman: 25°C - 24 saat
L-Aspartik asit ile yüzey modifikasyonu	Yüzey modifikasyon koşulları
Çekirdek – kabuk partiküller (0,50 g) APTES (100 µL, 0,428 mmol) Trietilamin (100 µL) Epiklorohidrin (40 µL, 0,37 mmol) L-Aspartik asit (0,040 g)	Karıştırma hızı: 280 rpm Sıcaklık ve zaman: 80°C - 12 saat. Karıştırma hızı: 150 rpm Sıcaklık ve zaman: 50°C - 12 saat.

Çizelge 3.2. mod-SiO₂@P2 partikülünün polimerizasyon içeriği ve işlem koşulları.

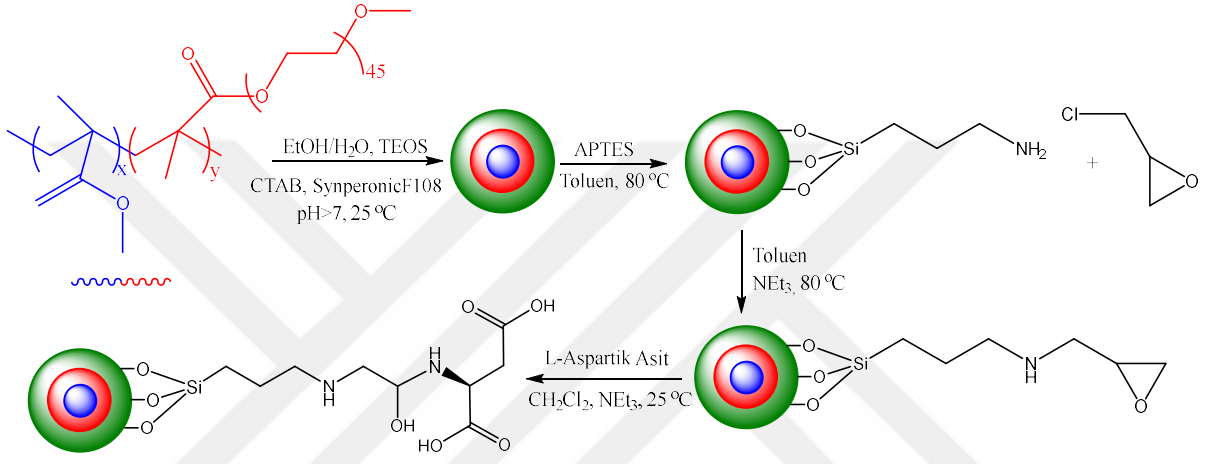
Polimer karışımı (Amfifilik P2 çekirdeği)	Polimerizasyon koşulları
MMA (1,50 mL, 18,70 mmol) PEGMA (M _n : 2000 Da, 0,50 g) Deiyonize ultra saf su (10 mL) CTAB (0,10 g) Synperonic®F108, 0,10g APPH (20 mg)	Karıştırma hızı: 300 rpm Sıcaklık ve zaman: 75°C - 24 saat.
P1 çekirdeğin SiO ₂ kabuk ile kaplanması	Kaplama koşulları
Amfifilik polimer (0,20 g) Etanol/su (v/v: 40/40 mL) Synperonic®F108, 0,10g CTAB (0,10 g) TEOS (5,0 mL) Derişik amonyak (%25 hacmen, 3,0 mL)	Karıştırma hızı: 180 rpm Sıcaklık ve zaman: 25°C - 24 saat.
L-Aspartik asit ile yüzey modifikasyonu	Yüzey modifikasyon koşulları
Çekirdek – kabuk partiküller (0,50 g) APTES (300 µL, 0,428 mmol) Trietilamin (300 µL) Epiklorohidrin (120 µL, 0,37 mmol) L-Aspartik asit (0,12 g)	Karıştırma hızı: 280 rpm Sıcaklık ve zaman: 80°C - 12 saat. Karıştırma hızı: 150 rpm Sıcaklık ve zaman: 50°C - 12 saat.

3.4. L-Aspartik Asit ile Silika Yüzey Modifikasyonu

Çekirdek – kabuk partiküller (0,50 g) 5,0 mL'lik kuru tolüen içerisinde ultrasonik su banyosunda sonike edildikten sonra reaktöre alındı. Partiküller yüzeyine fonksiyonel amin gruplarının kovalent olarak bağlanması için APTES (100 µL, 0,428 mmol) reaktöre eklendi ve gece boyunca geri soğurucu altında bırakıldı. Daha sonra amin-fonksiyonelli modifiye silika partiküller 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan partiküller iki defa etanolde yıkanıp, vakum altında kurutuldu. Sonraki aşama olarak; takılan amin grupları, L-aspartik asidin amin grupları ile kolay bir şekilde immobilize olması için epoksi işlevselliğine dönüştürüldü. Burada, amin fonksiyonelize edilmiş silika partiküller 10 mL tolüen içerisinde disperse edilip, 5 dk sonike edildi. Daha sonra trietilamin (100 µL) reaktöre eklendi, ardından epiklorohidrin (40 µL, 0,37 mmol) eklendi. Karışım gece boyu manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 80°C'de tutuldu. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulup, santrifüj edildi. İki defa etanolde yıkandı. Epoksi modifiyeli silika partiküller Schlenk reaktörüne konuldu. Diklorometan (2,0 mL) reaktöre eklendi ve 10 dk sonike edildi. Trietilamin (100 µL) ve L-aspartik asit (0,040 g) reaktöre eklenmesiyle birlikte; 50°C'de gece boyu karıştırılarak tutuldu. Son olarak, L-aspartik asit fonksiyonel ligandlı çekirdek – kabuk silika partiküller (mod-SiO₂@P1) 6000 rpm değerinde santrifüj edilip, etanolde yıkandı ve vakum altında kurutuldu [167].

Daha büyük çekirdek kabuk partiküllerin (SiO₂@P2) yüzey modifikasyonu ise şu şekilde gerçekleştirildi. Çekirdek – kabuk partiküller (0,50 g) 5,0 mL'lik kuru tolüen içerisinde ultrasonik su banyosunda sonike edildi, reaktöre alındı. Partiküllere aktif amin gruplarını takabilmek için APTES (300 µL, 0,428 mmol) reaktöre eklendi. Gece boyunca geri soğurucu altında bırakıldı. Daha sonra amin-fonksiyonelli modifiye silika partiküller 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan partiküller iki defa etanolde yıkanıp, vakum altında kurutuldu. Sonraki aşama olarak; takılan amin grupları, L-aspartik asidin amin grupları ile kolay bir şekilde immobilize olması için epoksi işlevselliğine dönüştürüldü. Burada, amin fonksiyonelize edilmiş silika partiküller 10 mL tolüen içerisinde disperse edilip, 15 dk sonike edildi. Daha sonra trietilamin (300 µL) reaktöre eklendi, ardından epiklorohidrin (120 µL, 0,37 mmol) eklendi. Karışım gece boyu manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 80°C'de

tutuldu. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulup, santrifüj edildi. İki defa etanolde yıkandı. Epoksi modifiyeli silika partikülle Schlenk reaktörüne konuldu. Diklorometan (2,0 mL) reaktöre eklendi ve 15 dk sonike edildi. Trietilamin (300 µL) ve L-aspartik asidin (0,12 g) reaktöre eklenmesiyle birlikte; 50°C'de gece boyu karıştırılarak tutuldu. Son olarak, L-aspartik asit fonksiyonel ligandlı çekirdek – kabuk silika partiküller (mod-SiO₂@P2) 6000 rpm değerinde santrifüj edilip, etanolde yıkandı ve vakum altında kurutuldu [167].



Şekil 3.2. mod-SiO₂@P1 partikül sentez mekanizması

3.5. Hibrit Çekirdek - Kabuk Partiküllerin Karakterizasyonu

3.5.1. FTIR ile Yapı Analizi

SiO₂@P1, Mod-SiO₂@P1 ve Mod-SiO₂@P2 çekirdek – kabuk partiküllerinin yapısındaki karakteristik fonksiyonel gruplar FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) ile analiz edildi. Analiz öncesi partikül numuneleri etüvde 18 saat kurutuldu. 3 mg partikül, 97 mg KBr ile karıştırılarak homojen hale getirildi ve bu karışım pelet haline dönüştürüldü. Hazırlanan peletlerden FTIR analizi yapılarak spektrumları elde edildi.

3.5.2. Termogravimetrik Analiz

Partikül yapısından sıcaklıkla birlikte uzaklaşan grupların analizi için termogravimetrik yöntem (TGA-50, Shimadzu, Japan) kullanıldı. TGA numune

hücresi içerisinde konan örnekler 800°C'ye kadar ısıtıldı. Bu süreç içerisinde kaybolan kütleler izlendi.

3.5.3. Yüzey Morfolojisi

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) yardımıyla mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek kabuk partiküllerin yüzey morfolojisi incelendi. SEM görüntüsü almak için sentezlenen partiküller SEM plakası üstüne yerleştirildi. İnce altın bir tabakayla kaplanan yüzey vakum altına alındı. Hazır edilen örneklerin SEM'de farklı büyüklükte görüntüleri alındı (Tescan-GAIA3+ Oxford XMAX-150, Çekya).

3.5.4. Yüzey Alanı Ölçümleri

Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) cihazı yardımıyla mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek kabuk partiküllerin yüzey alanı ölçümleri yapıldı. Cihazın numune ölçme kısmına partiküller tartılarak konuldu. 90°C'de 11 saat boyunca numuneler azot gazı ortamında tutuldu. -210°C'de gaz adsorpsiyonu yapıldı, desorpsiyon ise 25°C'de gerçekleştirildi. Yüzey alanı hesaplanması azot gazının desorpsiyon aşamasında elde edilen veriler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.5. Partikül Boyut Analizi

Partikül boyutlarının belirlenmesi için dinamik şık saçılım yöntemi (DLS) yöntemi kullanıldı (Malvern Setasizer Nano-ZS90 with a fixed scattering angle of 90°, İngiltere). Numuneler cihazın küvetine eklendi ve su – silika – polimer üçlü modeli kullanılarak ölçümler alındı.

3.6. Adsorpsiyon – Desorpsiyon Çalışmaları

3.6.1. Hyaluronik Asitin Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu – Kesikli Sistem

Sentezlenen mod-SiO₂@P1 hibrit çekirdek – kabuk partiküller üzerine hyaluronik asidin sulu çözeltiden adsorpsiyonu kesikli sistemde incelendi. Hyaluronik asit derişimi (0 – 500 mg/L) ve sıcaklık değişiminin (15°C - 40°C) çekirdek – kabuk

hibrit partikül üzerindeki adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi pH: 7,0'de incelendi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası çözeltideki hyaluronik asit derişimi 205 nm dalga boyunca ölçüldü (Shimadzu UV-1280). Adsorpsiyon kapasitesi uygun kütle dengesi kullanılarak hesaplandı. Tüm deneyler ve ölçümler istatiksel amaçla üç kez tekrarlandı.

Fonksiyonel ligand L-aspartik asit ile hyaluronik asit arasında gerçekleşen etkileşimin kinetiği, izoterm modeli ve termodinamik verileri açığa çıkarıldı. Kütle-denge denklemi ile adsorpsiyon kapasitesi hesaplandı.

$$q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.1)$$

Bu denklemde; q (mg/g) partikül birim kütlesinin adsorpladığı hyaluronik asit miktarının mg/g cinsinden göstergesidir. Hyaluronik asit başlangıç derişimi C_0 (mg/mL), belirli bir süre uygulandıktan sonraki hyaluronik asit derişimi ise C olarak tanımlanır. Sulu çözeltinin hacmi V (mL) ve kullanılan partikül kütlesi m (g) şeklindedir.

3.6.2. Hyaluronik Asitin Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu – Sürekli Sistem

Sentezlenen mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partiküller üzerine hyaluronik asidin sulu çözeltiden adsorpsiyonu hem kesikli hem de sürekli sistemde incelendi. Hyaluronik asit derişim (0 – 500 mg/L) değişiminin çekirdek – kabuk hibrit partikül üzerindeki adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi pH: 7,0 ve temas süresi 60 dk olacak şekilde incelendi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrası çözeltideki hyaluronik asit derişimi 205 nm dalga boyunca ölçüldü (Shimadzu UV-1280). Adsorpsiyon kapasitesi uygun kütle dengesi kullanılarak hesaplandı. Tüm deneyler ve ölçümler istatiksel amaçla üç kez tekrarlandı.

Fonksiyonel ligand L-aspartik asit ile hyaluronik asit arasında gerçekleşen etkileşimin kinetiği, izoterm modeli ve termodinamik verileri açığa çıkarıldı. Kütle-denge denklemi ile adsorpsiyon kapasitesi yukarıdaki formül (3.1) ile hesaplandı.

Sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partiküller 100 mg tartılıp plastik bir kolona doldurulmuştur. Doldurulan kolon üzerine farklı (1,0 – 4,0 mL/dk) akış hızında hazırlanan çözelti peristaltik pompa yardımıyla verildi. Farklı sürelerdeki (0 - 60 dk) mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partiküller adsorplanan hyaluronik asit değerleri (mg/g) 205 nm’de ölçüldü.

3.6.3. Desorpsiyon Çalışmaları

Analitlerin sabit fazdan desorpsiyonu; etkileşimlerin tersine çevrilebilirliğinin ve partiküllerin yeniden kullanılabilirliğinin gösterilmesi açısından en önemli parametrelerden birisidir. Bu bağlamda; 1,0 M glisin hidroklorür kullanılarak mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek kabuk partiküllerden hyaluronik asit desorpsiyonu gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak kullanılan glisin hidroklorür çözeltisi; 25°C’de ve 6 dakika boyunca hyaluronik asit adsorbe edilmiş partiküllerle etkileştirildi. Desorpsiyon etkisini ise partiküller ve hyaluronik asit üzerindeki hidrojen bağlarını ve tamamlayıcı yüklü grupları bloke ederek gösterdi. Önceden belirtildiği gibi hyaluronik asit derişimi 205 nm’de ölçüldü. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak adsorplanan ve desorbe olan hyaluronik asit miktarından desorpsiyon oranı hesaplandı.

$$\text{Desorpsiyon \%} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamındaki Hyaluronik Asit}}{\text{Adsorplanan Hyaluronik Asit}} \times 100 \quad (3.2)$$

Tekrar kullanılabilirlik çalışması için, sentezlenen aynı mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek kabuk partiküller 5 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutuldu. Deneysel işleyiş aynı şekilde uygulandı. Her bir adım arasında 50 mM NaOH ve deiyonize su ile partikül yüzey yenilenmesi ve temizlenmesi için yıkandı.

3.7. HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları

Lizat çözeltisi içerisinde hyaluronik asit adsorpsiyonu sürekli sistem deneylerinin kromatografik doğrulaması olarak HPLC çalışmaları yapıldı. Bu bağlamda öncelikle farklı hyaluronik asit derişimleri (0 – 500 mg/L) ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Sürekli sistem çalışmalarında kullanılan lizat'ın, lizat içerisine 300 ppm hyaluronik asit eklenilen örneğin, sentezlenen mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partikülleri üzerinden geçirilen lizat + hyaluronik asit içeren çözelti örneğinin ve mod-SiO₂@P2 tutunmuş hyaluronik asitin desorpsiyon çözeltisinin kromatogramları alındı (Shimadzu, Prominence LC-20A). Kromatografik analiz koşulları olarak ise; mobil faz: su – metanol (80 : 20), akış hızı: 1.0 mL/dk, pH: 7,0 sıcaklık 25 °C, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kullanılan kolon: Cosmosil C18-AR-II 5µm 150 x 4.6mm (Nacalai, Japon) ve dedektör olarak PDA (Foto Diyot Sıralı) dedektör kullanıldı. 2,0 mL lik viallere enjeksiyon için hazırlanan numuneler; viallere konmadan önce 0.45µm 25mm hidrofilik PTFE şırıngaucu filtreden filtre edildi. Tüm deneyler ve ölçümler istatistiksel amaçla üç kez tekrarlandı.

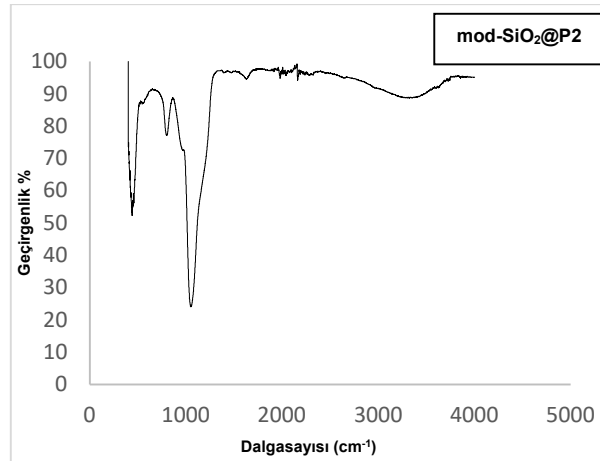
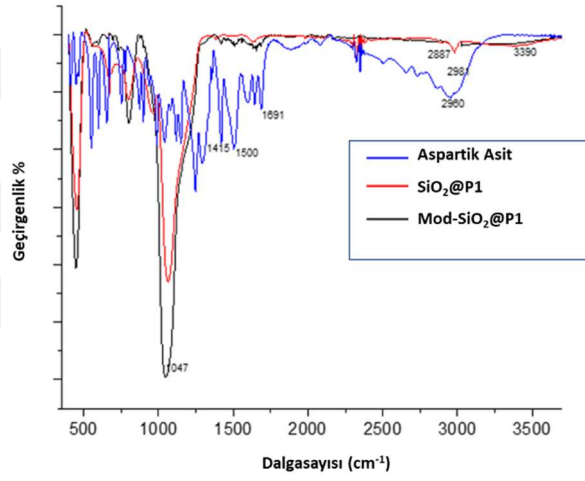
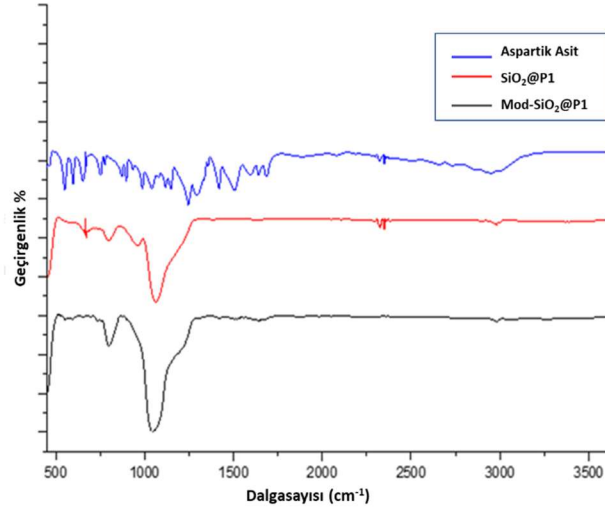
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hibrit Çekirdek – Kabuk Partiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR Analizleri

Amfifilik polimer olan P1 ve P2 çekirdek olarak kullanılmış ve üzeri silika ile kaplanarak hibrit silika çekirdek – kabuk partiküller elde edilmişti ($\text{SiO}_2@\text{P1}$ ve $\text{SiO}_2@\text{P2}$). Amfifilik bir şablon ajanının varlığı; silika çekirdeği içerisinde hidrofobik bölgeler oluşturarak misel partiküllerinin kararlılığını artırır ve hidrofobik fonksiyonel grupların/moleküllerin silika çekirdeğine doğru difüzyonunu artırır. Çekirdek kabuk partiküllerin hyaluronik aside karşı olan afinitesini iyileştirmek ve arttırmak için silika yüzeyi, daha önceden belirtildiği gibi çok aşamalı bir modifikasyon işlemi kullanılarak L-aspartik asit ile fonksiyonelleştirildi. Sonuç ürün olan $\text{mod-SiO}_2@\text{P1}$ ve $\text{Mod-SiO}_2@\text{P2}$, L-aspartik asit fonksiyonel gruplu çekirdek – kabuk hibrit partiküller sentezlendi.

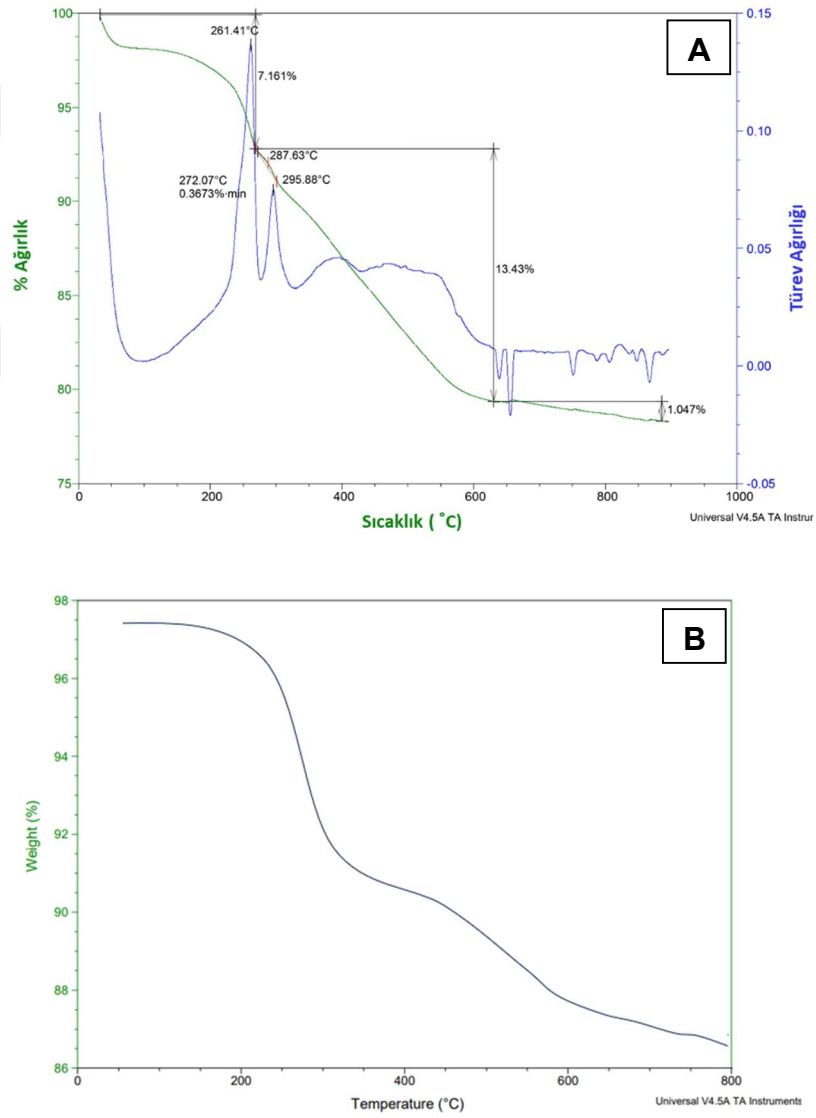
FTIR spektrofotometre yöntemi ile fonksiyonel ligand olan L-aspartik asidin yapısal karakterizasyonu gerçekleştirildi. L-aspartik asit yapısına ait FTIR spektrumu Şekil 4.1.'de verilmiştir. NH bükülmesi (1500 cm^{-1}), amidin CO gerilmesi (1585 cm^{-1}), asitten kaynaklı, $\text{O}=\text{C}-\text{O}^-$ gerilmesi (1798 cm^{-1}), NH bükülmesi (1514 cm^{-1}), asitten kaynaklı $\text{O}=\text{C}-\text{O}^-$ bükülmesi (1229 cm^{-1}) ve karbona bağlı OH bükülmesi (1415 cm^{-1}) spektrumda görülmektedir. $-\text{C}=\text{O}-$ karbonil grubunun gerilmesi ($1670 - 1691 \text{ cm}^{-1}$), $-\text{CH}_2$ gruplarının varlığına işaret eden $-\text{CH}$ gerilmeleri ($2800 - 2950 \text{ cm}^{-1}$), Si-O-Si gerilmesi güçlü ve keskin bir pik olarak (1047 cm^{-1}) görülmektedir.



Şekil 4.1. Aspartik asit, SiO₂@P1, mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 yapılarına ait FTIR spektrumları

4.1.2. Termogravimetrik Analiz

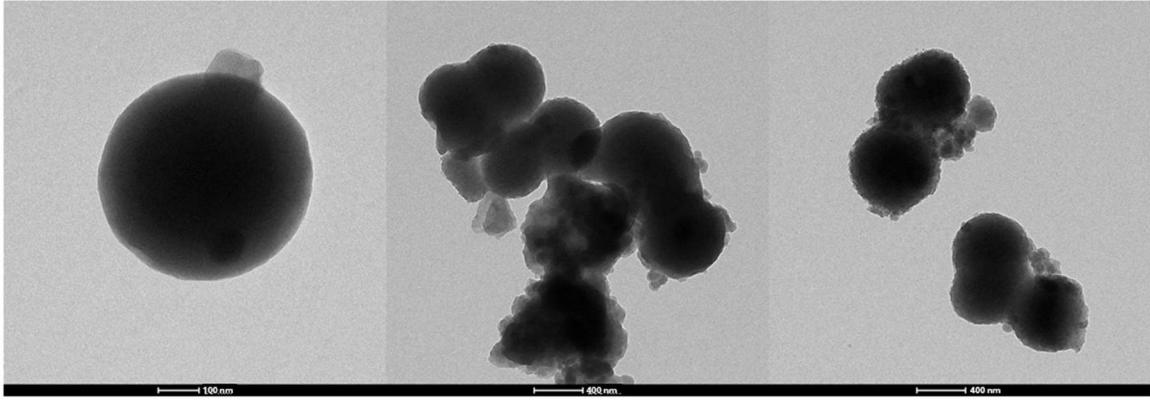
mod-SiO₂@P1 partiküllerinin termogravimetrik analizleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. 200°C'ye kadar gerçekleşen %2'lik bir kütle kaybı adsorbe olmuş nemin kaybindan kaynaklanmaktadır. 225°C'de, silika jeldeki fonksiyonel grupların uzaklaşmasından dolayı keskin bir kütle kaybı gözlemlendi ve 287°C'de ikinci bir kütle kaybı rampası gözlemlendi. Bu kayıp fonksiyonel polar grupların öncelikle kopmasından kaynaklanmıştır. 600°C'ye kadar %13,43'lük bir kütle kaybı gözlemlendi ve bu iç çekirdeğin ayrışmasıyla ilişkilidir. 600-800°C arasındaki küçük kütle kaybı, yüzey silanol gruplarının hidratlanmasından kaynaklanmaktadır.



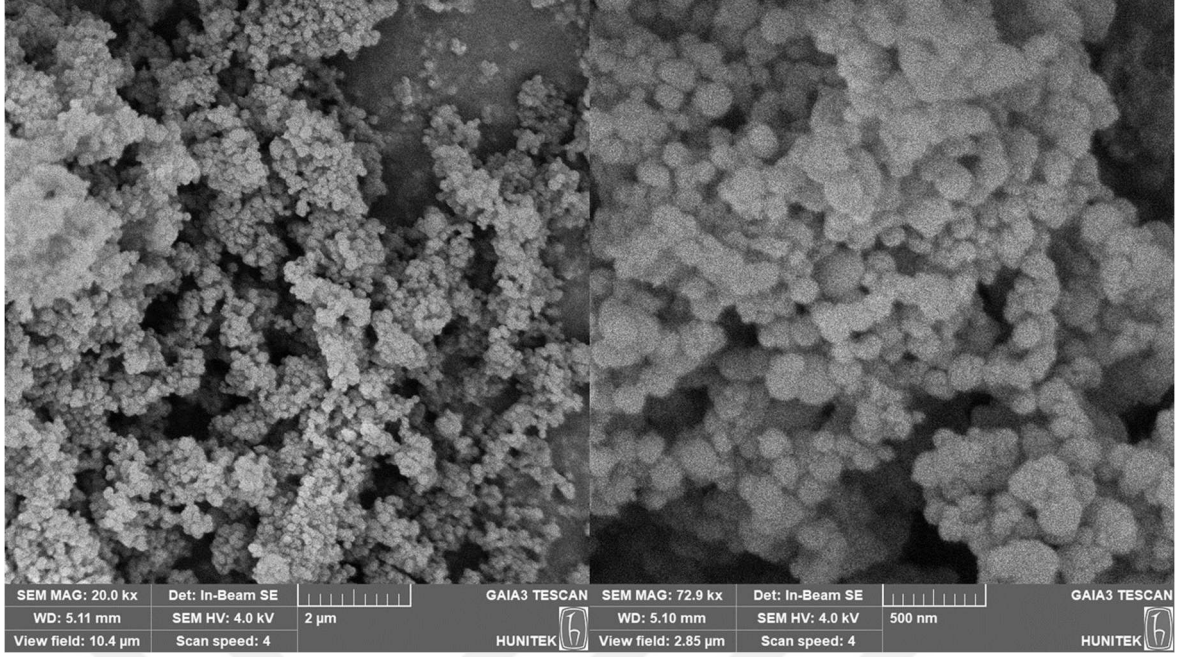
Şekil 4.2. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partiküllerinin termogramları

4.1.3. Yüzey Morfolojisi

Hibrit çekirdek-kabuk partiküllerinin yüzey morfolojileri TEM ve SEM analizleri ile araştırıldı. Bu analizler çerçevesinde mod-SiO₂@P1'in yüksek kontrastlı TEM görüntüleri Şekil 4.5'te verilmektedir. Amfifilik polimerin SiO₂ kabuğu ile kaplanmasından sonra küresel partiküller elde edildiği açıkça belirlendi. Daha küçük polimer zincirlerinin kaplanması nedeniyle nispeten daha küçük boyutlu partiküller de oluştu. Ortalama partikül boyutu, TEM analizi ile 600 nm olarak belirlendi. Ayrıca, modifiye edilmiş silika yapının (mod-SiO₂@P1) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, Şekil 4.6.'da bireysel küresel partiküllerin varlığını gösterdi. Kürelerin yüzeyi düzgün olup, nano boyutlu silika birikimi veya pıhtılaşma gözlemlenmediği özellikle vurgulanmalıdır.

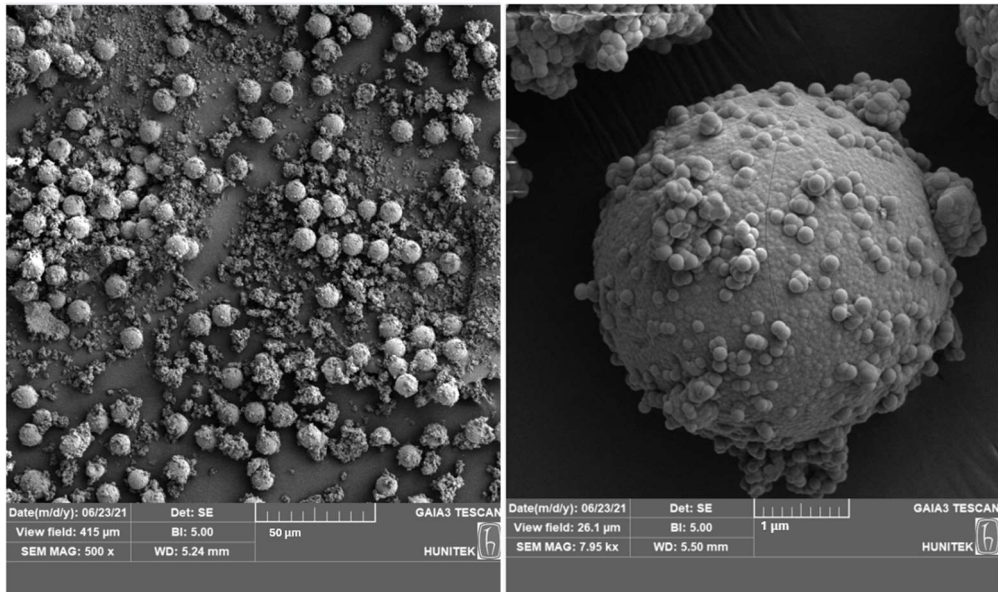


Şekil 4.3. SiO₂@P1 partiküllerinin TEM görüntüsü



Şekil 4.4. mod-SiO₂@P1 partiküllerinin SEM görüntüsü

Ayrıca, mod-SiO₂@P2 partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, Şekil 4.7.'de de bireysel küresel partiküllerin varlığını gösterdi. Daha büyük bir çekirdek üstüne silika kaplanmasıyla oluşan partiküller düzgün küresel şekilli ve yüksek monodispersitede elde edildi. Kürelerin yüzeyi düzgün olup, nano boyutlu silika birikimi yüzeyde kısmen gözlemlendi.



Şekil 4.5. mod-SiO₂@P2 partiküllerinin SEM görüntüsü.

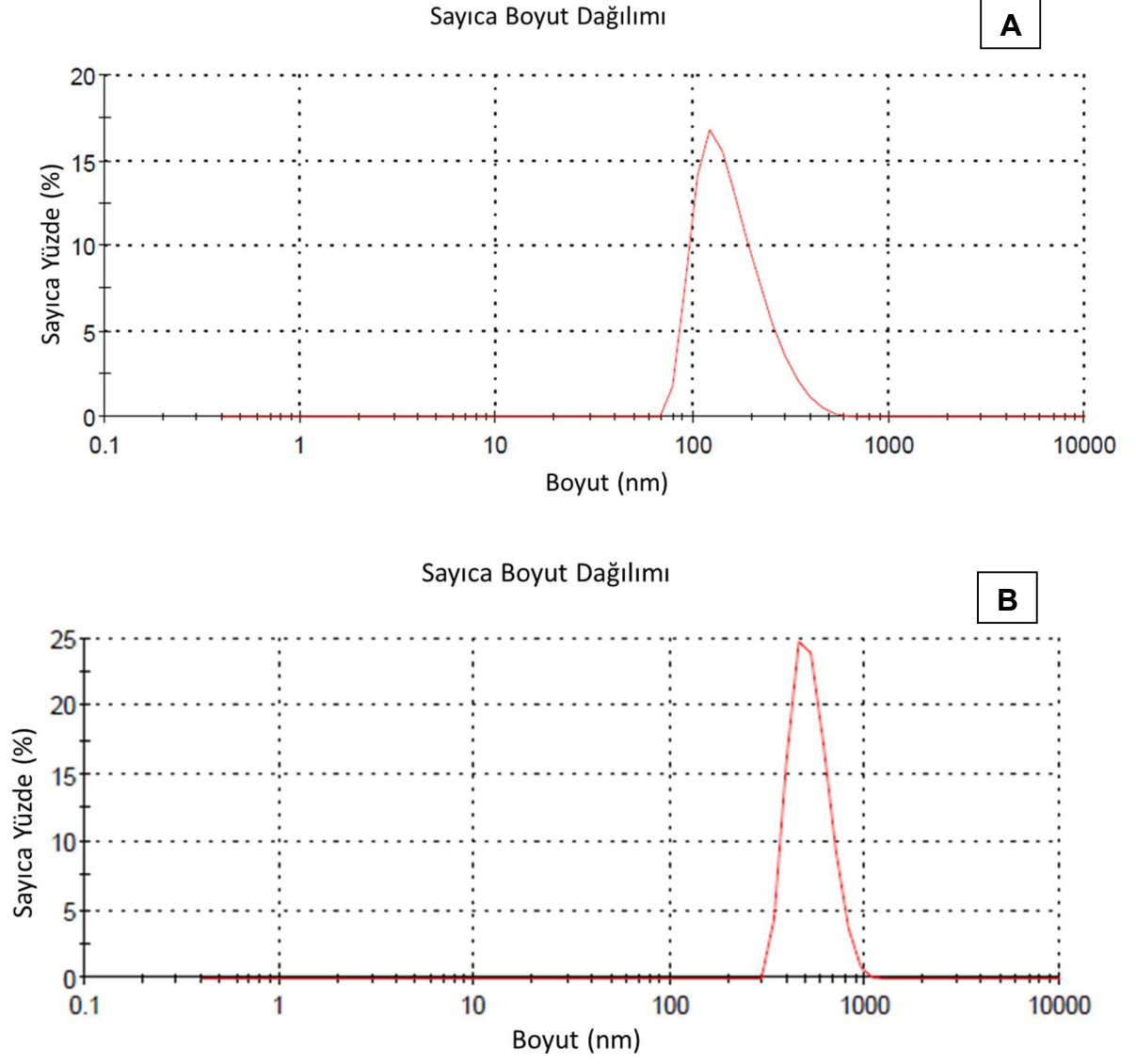
4.1.4. Yüzey Alanı Ölçümü

mod-SiO₂@P1'in yüzey alanı, BET yöntemi kullanılarak N₂ adsorpsiyon / desorpsiyon izotermi ile 240 m²/g olarak ölçüldü. Mezo-gözenekli yapılara özgü olan ve H3-histeri döngüsü içeren Tip IV izoterm gözlemlendi. Gözenek boyutu ve hacmi sırasıyla 3,6 nm ve 0,68 cm³/g olarak belirlenerek mezo-gözenekli yapının varlığına teyit edildi.

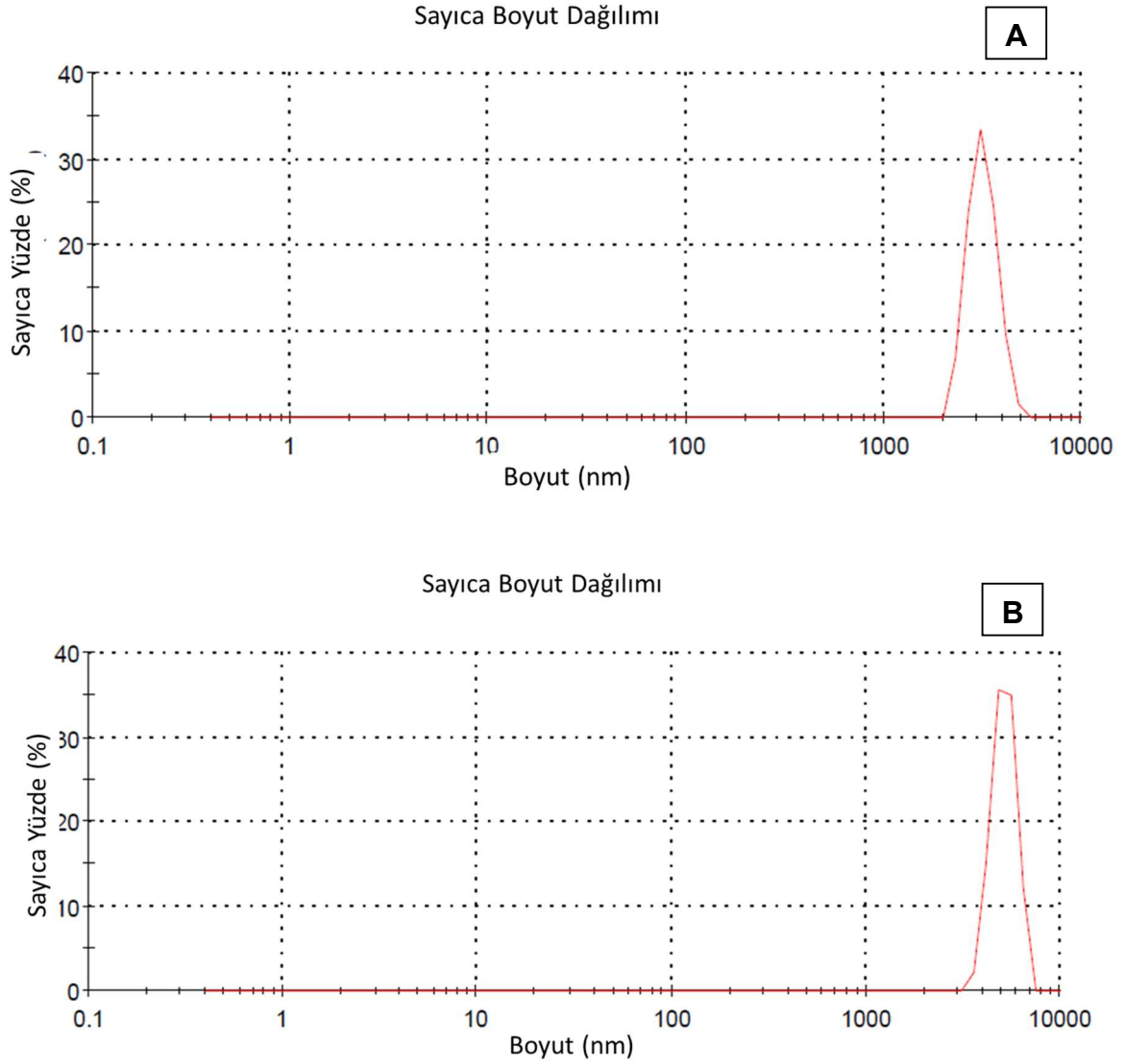
Diğer taraftan, mod-SiO₂@P2'in yüzey alanı, BET yöntemi kullanılarak N₂ adsorpsiyon / desorpsiyon izotermi ile 440 m²/g olarak ölçüldü. Mezo-gözenekli yapılara özgü olan ve H3-histeri döngüsü içeren Tip IV izoterm benzer şekilde gözlemlendi. Gözenek boyutu ve hacmi sırasıyla 12,2 nm ve 1,03 cm³/g olarak belirlenerek mezo-gözenekli yapının varlığı ikinci yapıda da ortaya koyuldu.

4.1.5. Partikül Boyut Analizi

Amfifilik polimer (P1) ve SiO₂ kaplı polimerin (SiO₂@P1) disperse hidrodinamik çapları, etanolde dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi ile doğrulanarak 254, 7 (±64,6) nm ve 600,2 (±121,9) nm olarak bulundu. Amfifilik polimer (P2) ve SiO₂ kaplı polimerin (SiO₂@P2) suda bulunan partikül boyutları ise 3193 (±432,4) nm ve 5306 (±457,1) nm olarak bulundu. Şekil 4.3.'de ve şekil 4.4.'de DLS spektrumları gösterilmektedir. Spektrumlarda da görüldüğü üzere; P1 partikülünün üzeri yaklaşık olarak 345 nm'lik bir kabukla kaplanırken, P2 partikülünün üzeri yaklaşık olarak 2100 nm'lik bir kabukla kaplandığı belirlendi.



Şekil 4.6. (A) P1 ve (B) SiO₂@P1 partiküllerinin DLS spektrumları



Şekil 4.7. (A) P2 ve (B) SiO₂@P2 partiküllerinin DLS spektrumları

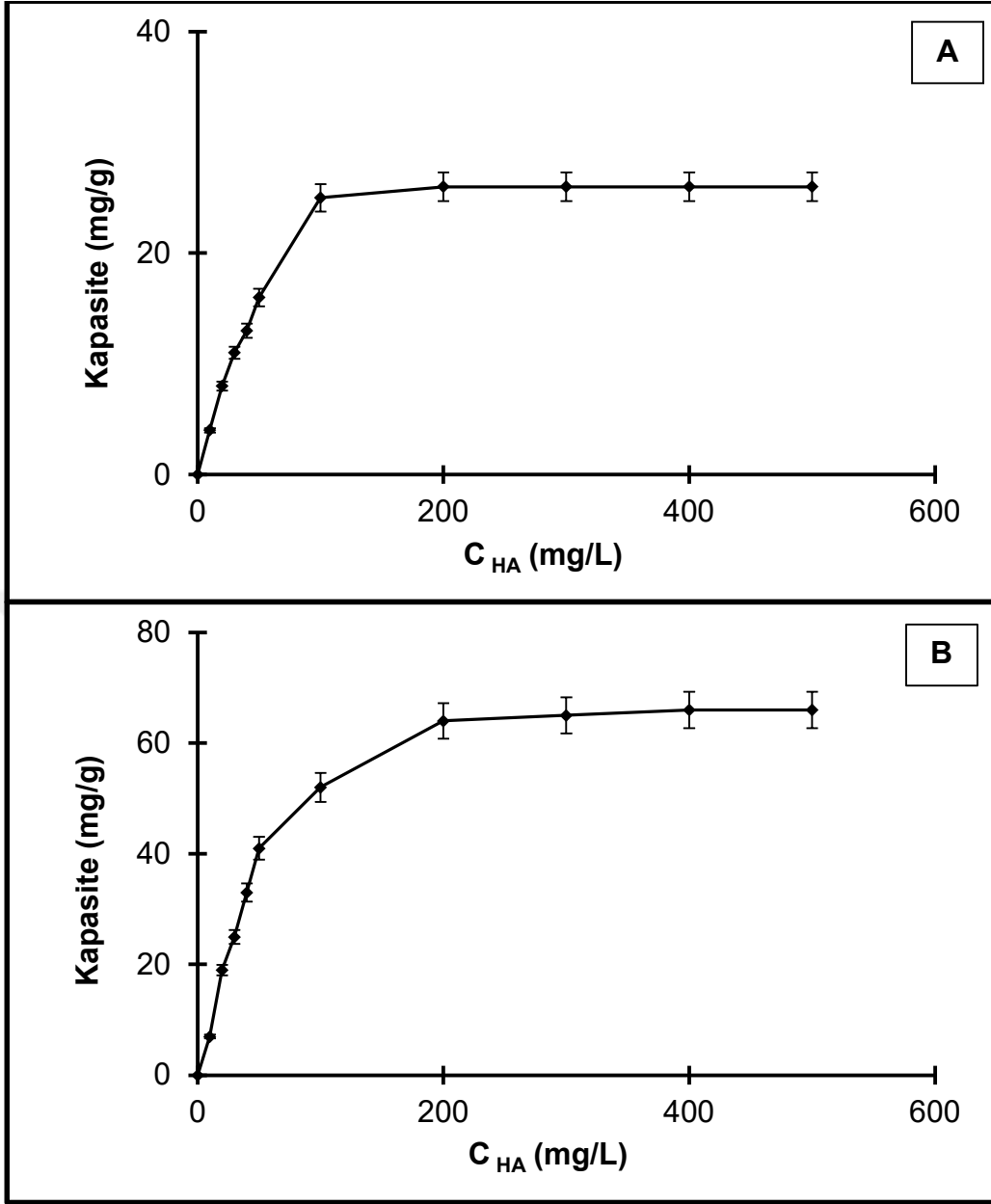
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları – Kesikli Sistem

4.2.1. Hibrit Partiküllere Hyaluronik Asit Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon çalışmaları başlığı altında hem kesikli hem de sürekli sistem deneyleri gerçekleştirildi. Kesikli sistem deneylerinde hyaluronik asit derişimi, sıcaklık, pH ve etkileşim süresinin adsorpsiyon kapasitesin etkisi araştırıldı. Ayrıca, seçici olmayan etkileşimlerin gösterilmesi amacıyla modifiye edilmemiş çekirdek – kabuk partiküllerin adsorpsiyon özellikleri incelendi. Aşağıda her bir parametreye ait sonuçlar tartışıldı ve uygun matematiksel modeller ile izoterm ve kinetik analizler yapıldı.

4.2.1.1. Hyaluronik Asit Derişim Etkisinin İncelenmesi

HA derişiminin mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek-kabuk partiküllerine HA adsorpsiyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu bağlamda, 0 ile 500 mg/L derişim aralığındaki HA çözeltileri çekirdek-kabuk partikülleri ile etkileşime sokuldu ve adsorpsiyon kapasitesi değerleri Şekil 4.8.'da gösterildi. Grafik, HA'nın başlangıç derişiminin, HA ile çekirdek-kabuk partikül arasındaki adsorpsiyon ilişkisi üzerindeki etkisini temsil etmektedir. Sonuçlardan da görülebileceği gibi, denge adsorpsiyon kapasitesi değerine mod-SiO₂@P1 partiküllerde 100 mg/L HA derişiminden sonra ulaşıldı. Diğer taraftan mod-SiO₂@P2 partiküllerde ise denge adsorpsiyon kapasitesi değerine 300mg/L HA derişiminden sonra ulaşıldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, HA'nın partiküller üzerindeki L-aspartik asit gibi aktif spesifik ligandlarla etkin bir şekilde etkileşime girdiğini ve yüzeyin tamamen dolmasıyla bu derişimden sonra etkileşim için boş nokta kalmadığını göstermektedir. Diğer yandan, adsorpsiyon sürecinin ana itici gücü olan, sıvı ve katı fazlar arasındaki HA derişim farkı dinamik bir denge durumuna ulaştı. Bu bağlamda, en yüksek adsorpsiyon kapasitesi gözlemlenmiş dinamik adsorpsiyon süreci devam etse de adsorbe edilen ve elüsyon edilen molekül miktarları eşittir. Sonuç olarak, en verimli başlangıç HA derişimi mod-SiO₂@P1 partiküller için 100 mg/mL ve mod-SiO₂@P2 partikülleri için 300 mg/mL olarak belirlendi.

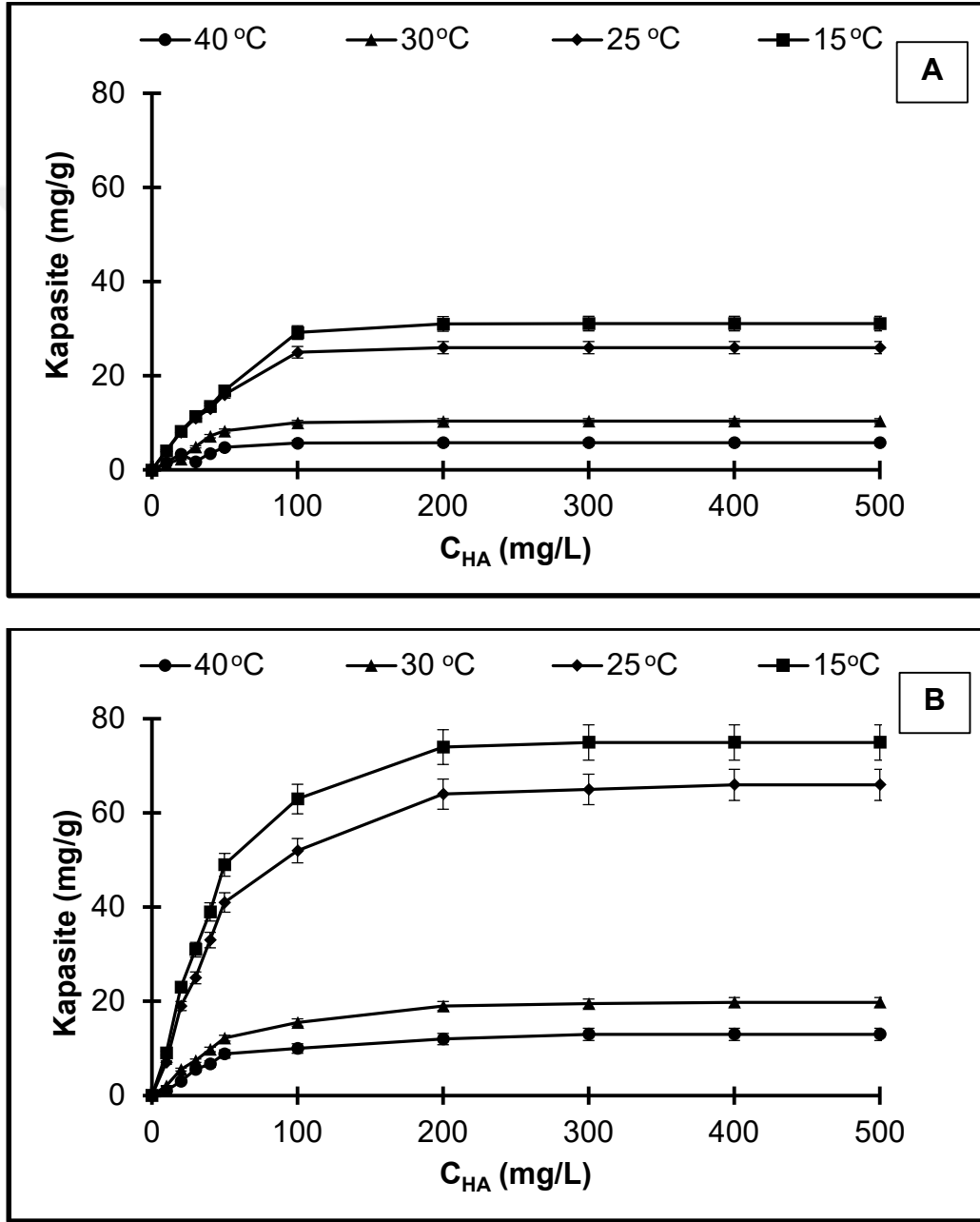


Şekil 4.8. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine derişimin etkisi (pH: 7.0, t: 60 dk, (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2)

4.2.1.2. Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Farklı sıcaklıklarda mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek-kabuk partikülleri ile 0 mg/L ile 500 mg/L arasındaki derişim değerlerinde HA çözeltilerinin adsorpsiyon sonuçları da incelendi. Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi, HA'nın adsorpsiyon değerleri artan sıcaklıkla azalma eğilimindedir. Sıcaklık etkisi, adsorpsiyon sürecini kontrol eden etkileşimi ortaya çıkarmak için kritik bir parametredir. İyonik ve hidrojen bağları baskın etkileşimlerse, adsorpsiyon

kapasitesindeki değişiklikler sıcaklıkla ters orantılıdır [168, 169]. Buna karşılık, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri baskın etkileşimlerse, adsorpsiyon kapasitesindeki değişiklikler sıcaklıkla doğru orantılıdır [170]. Bu bağlamda, hidrofilik etkileşimler göz önüne alındığında, sulu çözeltilerden hidrofilik partiküller aracılığıyla HA'nın adsorpsiyonunun artan sıcaklıkla azaldığı beklenmektedir.

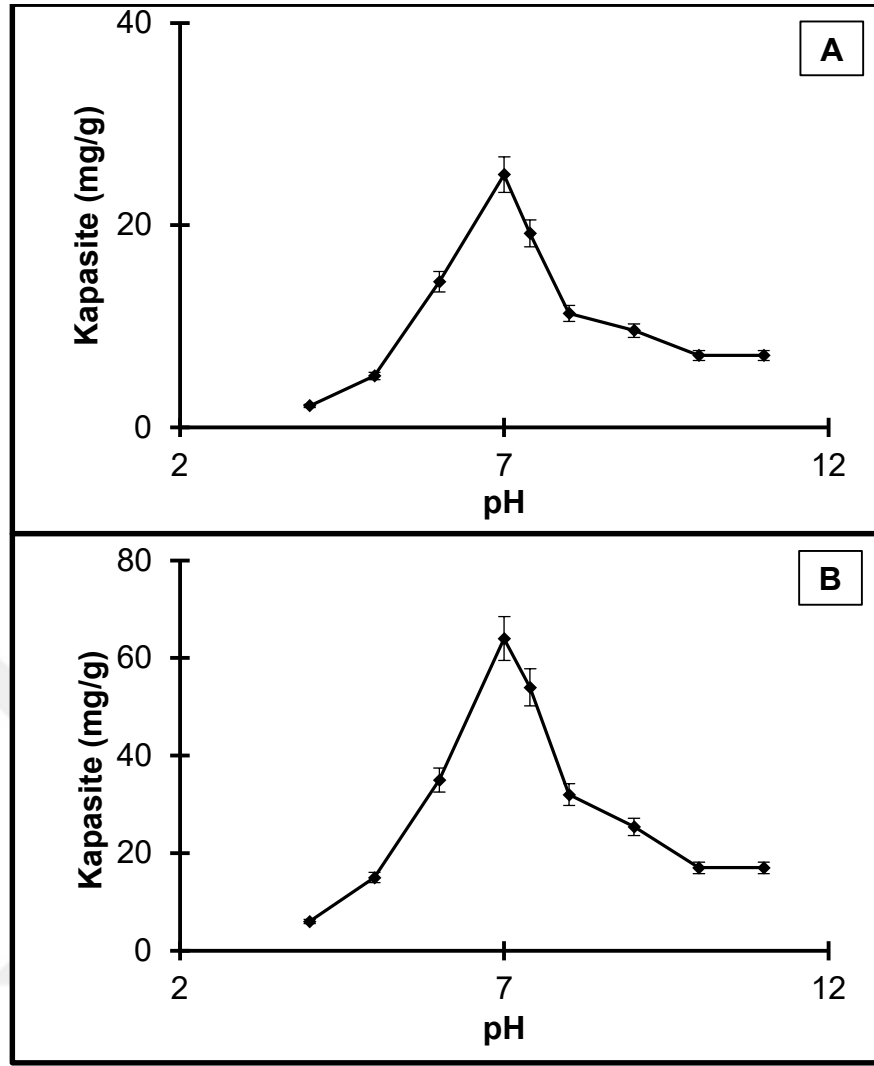


Şekil 4.9. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi (pH: 7.0, t: 60 dk (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2)

4.2.1.3. pH Etkisinin İncelenmesi

HA'nın mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk hibrit partikülleri aracılığıyla adsorpsiyonuna pH'ın etkisi araştırıldı. Bu bağlamda, pH değeri 4.0 ile 11.0 arasında değişen HA çözeltileri hibrit çekirdek-kabuk partikülleri ile etkileşime sokuldu (Şekil 4.10.). Şekilde görüldüğü gibi ortamın pH değerinin HA ve çekirdek-kabuk partikülü arasındaki adsorpsiyon ilişkisini doğrudan etkilediği belirlendi. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere, optimum pH 7.0 olarak belirlendi. Bu değer in öncesinde ve sonrasında, aynı yüklerin itici etkisi nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Ayrıca, yüzeydeki ligandlarla etkileşime girmek için hidronyum ve hidroksit iyonlarının rekabet ettiği gözlemlendi.



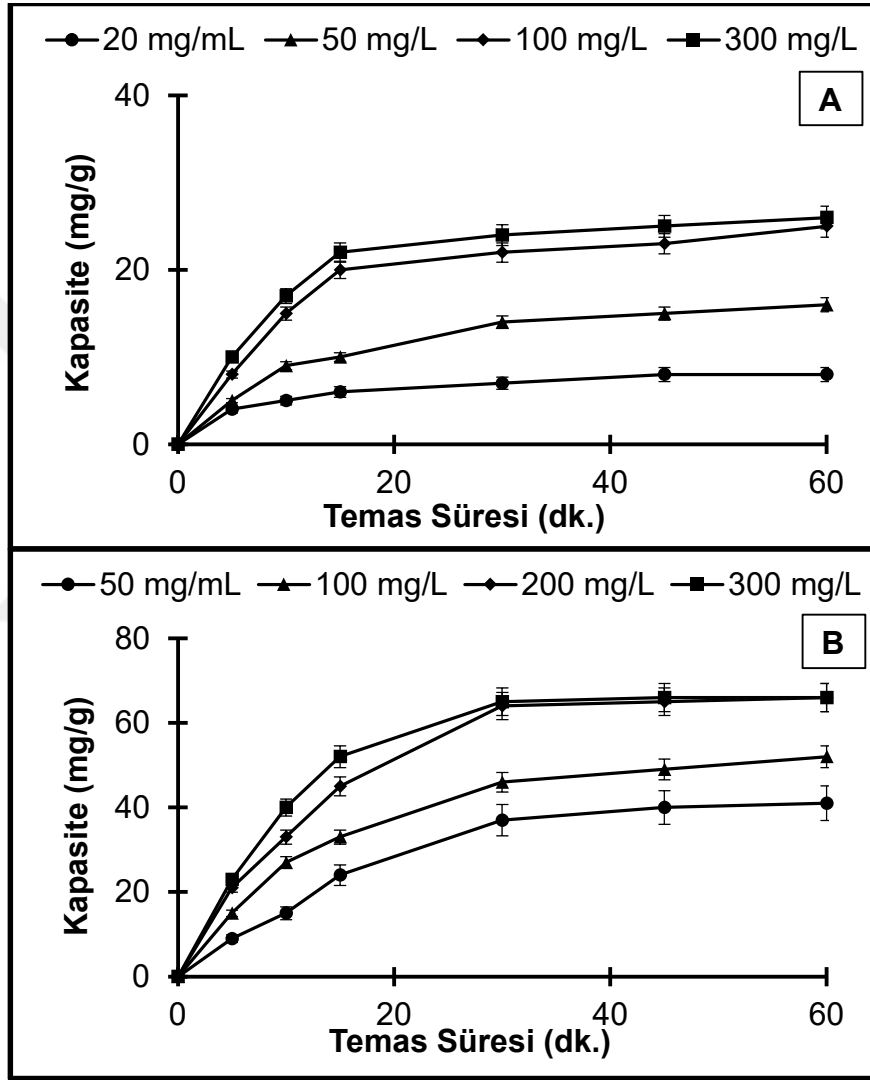


Şekil 4.10. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine pH etkisi ((A) mod-SiO₂@P1, C_{HA}: 100 mg, T: 25°C, t: 60 dk ve (B) mod-SiO₂@P2, C_{HA}: 300 mg, T: 25°C, t: 60 dk)

4.2.1.4. Temas Süresi Etkisinin İncelenmesi

Adsorpsiyon / saflaştırma sürecinde, etkileşim süresi hem yöntem maliyeti hem de işlem hızını doğrudan etkileyen önemli bir parametredir. Bu bağlamda; mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk partikülleri aracılığıyla HA'nın adsorpsiyonuna temas süresinin etkisi de araştırıldı. HA çözeltilerinin partiküllerle 0-60 dakika aralığında etkileşime girmesi gözlemlendi (Şekil 4.11.). Burada, adsorpsiyon kinetiği ile derişim arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla dört farklı derişimde HA çözeltileri kullanıldı. Elde edilen eğriler, sadece 30 dakikada tamamlanan oldukça hızlı adsorpsiyon kinetiklerini ortaya koydu. Ayrıca, derişim artışının beklenildiği ve daha önce belirlendiği gibi adsorpsiyon kinetiğini

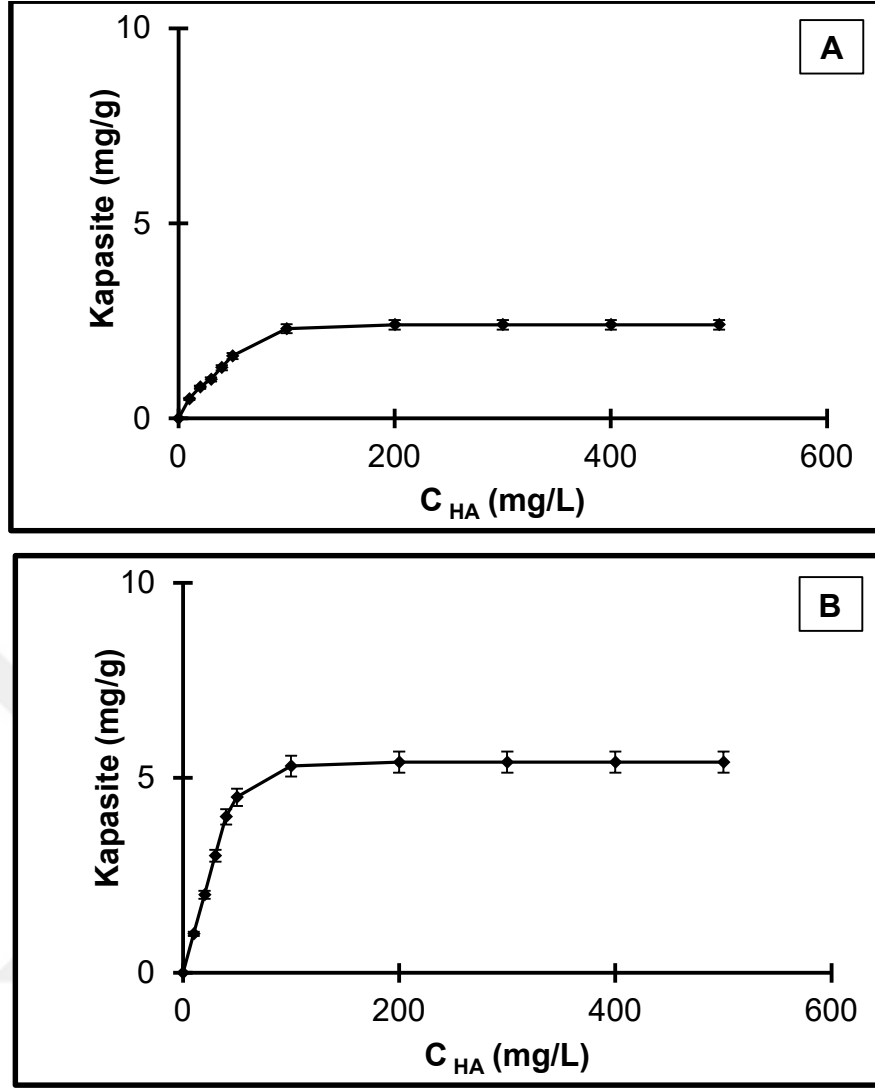
kolaylaştırdığı görüldü. Hızlı adsorpsiyon süreci, ligand ve analit arasındaki afinitenin yanı sıra kabuğun mezo-gözenekli yapısından dolayı liganda kolay erişilebilirliği ortaya koydu. Ayrıca, SiO_2 'nin amfifilik doğası, yüzeydeki sınır tabakasını kalınlaştırarak HA moleküllerinin sıvı ve katı fazlar arasında kolayca dağılımını sağlayarak adsorpsiyon kinetiğini de iyileştirdiği gözlemlendi.



Şekil 4.11. Hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine temas süresi etkisi ((A) mod-SiO₂@P1: 100 mg, T: 25°C, pH: 7.0 ve (B) mod-SiO₂@P2: 100 mg, T: 25°C, pH: 7.0)

4.2.2. Modifiye Edilmemiş Silika Partikül Üzerine HA Adsorpsiyonu (SiO₂@P1 – SiO₂@P2)

Seçici lignd olarak L-aspartik asitin adsorpsiyon kapasitesine etkisinin araştırılması için hyaluronik asit (HA) derişiminin modifiye edilmemiş SiO₂@P1 ve SiO₂@P2 partiküller üzerindeki adsorpsiyon çalışmaları da araştırıldı. Bu bağlamda, 0 ila 500 mg/L derişim aralığındaki HA zelteleri modifiye edilmemiş silika partikülleri ile etkileşime sokuldu ve adsorpsiyon kapasitesi değerleri şekil 4.12.'de gösterildi. Grafik, HA'nın başlangıç derişiminin adsorpsiyon ilişkisi üzerindeki etkisini temsil etmektedir. Sonuçlardan da görülebileceği gibi, denge değeri SiO₂@P1 partiküller için 100 mg/L HA derişiminden sonra elde edillirken ve modifiye edilmemiş silika partikülün adsorpsiyon kapasitesi 2,4 mg/g'dir. SiO₂@P2 partiküller için 300 mg/L HA derişiminden sonra elde edilirken ve modifiye edilmemiş silika partikülün adsorpsiyon kapasitesi 5,5 mg/g'dır. Silikanın yüzeyi doğal olarak hidroksil grupları içermektedir. Bu hidroksil grupları aracılığıyla HA ile bazı hidrofilik etkileşimler yoluyla bir miktar etkileşim oluşurken; ancak bu etkileşim sınırlı düzeydedir. Bu sonuç, HA'nın partiküller üzerindeki aktif özgül ligand olan L-aspartik asit ile yüzeyi modifiye edilmiş silika partiküllerde, modifiye edilmemiş silika partiküllerine göre daha verimli bir şekilde etkileşime girdiğini teyit etmektedir.



Şekil 4.12. Modifiye edilmemiş (A) SiO₂@P1 ve (B) SiO₂@P2 partikülleri üstüne HA adsorpsiyonu (t: 60 dk, T: 25°C, pH: 7.0, partikül: 100 mg)

4.2.3. Adsorpsiyon Termodinamikleri

Termodinamik; kimyasal kompozisyon, basınç, sıcaklık gibi değişkenlerin bir fonksiyonu olarak maddenin davranışını tanımlar. Sistemlerin kimyasal durumunun bir süreklilik tanımlamasıdır. Elementel haldeki süreçleri atomik ölçekte veya mikroskobik ayrıntıları atomik boyutta tanımlayamaz ve ön göremez. Buna bağlı olarak mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek kabuk partikülleri üzerine hyaluronik asit adsorpsiyonu arasındaki termodinamik değişkenlerin hesaplanması için, sıcaklık değişimi ve hyaluronik asit derişimi verileri üzerinde değerlendirme yapıldı.

Sıcaklıkla değişebilen denge sabitleri kullanılarak ΔG (kJ/mol.K), ΔH (J/mol) ve ΔS (J/mol.K) termodinamik değerleri hesaplanabilmektedir.

Sıcaklık fonksiyonu olarak denge sabiti adsorpsiyondaki entalpi değişimine göre aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$d \ln b / dT = \Delta H / RT^2 \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; ΔH adsorpsiyon entalpisi (J/mol), gaz sabiti olarak R (J/mol.K), b ise Langmuir sabitidir. Langmuir sabiti (b)'nin sıcaklıkla olan etkileşimi ΔH değerinin pozitif veya negatif olmasına göre incelenir. ΔH pozitif değerli ise endotermik bir adsorpsiyon oluşmaktadır. Eğer ΔH negatif değerli ise ekzotermik bir tepkime olacaktır. Pozitif değerli hallerdeki durumlarda sıcaklıkla beraber Langmuir sabiti artacak, negatif değerli hallerdeki durumlarda sıcaklığın artmasıyla Langmuir sabiti azalım yönüne doğru kayacaktır.

İş için enerji olarak kimyasal tepkimenin sahip olduğu enerjinin kullanılabilmesiyle alakalı Gibbs Serbest Enerjisi (G) kullanılır. Sistemdeki serbest enerjisi (G)'yi sistem sıcaklığı T (K) ile entropisi (S) çarpımının, sistem entalpisi (H) ile toplamı vermektedir.

Reaksiyonun serbest enerjisi (ΔG) ise aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.2)$$

Langmuir sabiti (b) ve serbest enerjiyi (ΔG) sıcaklıktaki değişimler değiştirdiğine göre şu şekilde ifade edebilir.

$$\Delta G = - RT \ln b \quad (4.3)$$

$$-RT \ln b = \Delta H - T\Delta S \quad (4.4)$$

-RT'ye her iki taraf da bölündüğünde eşitlik aşağıdaki forma bürünmüş olur.

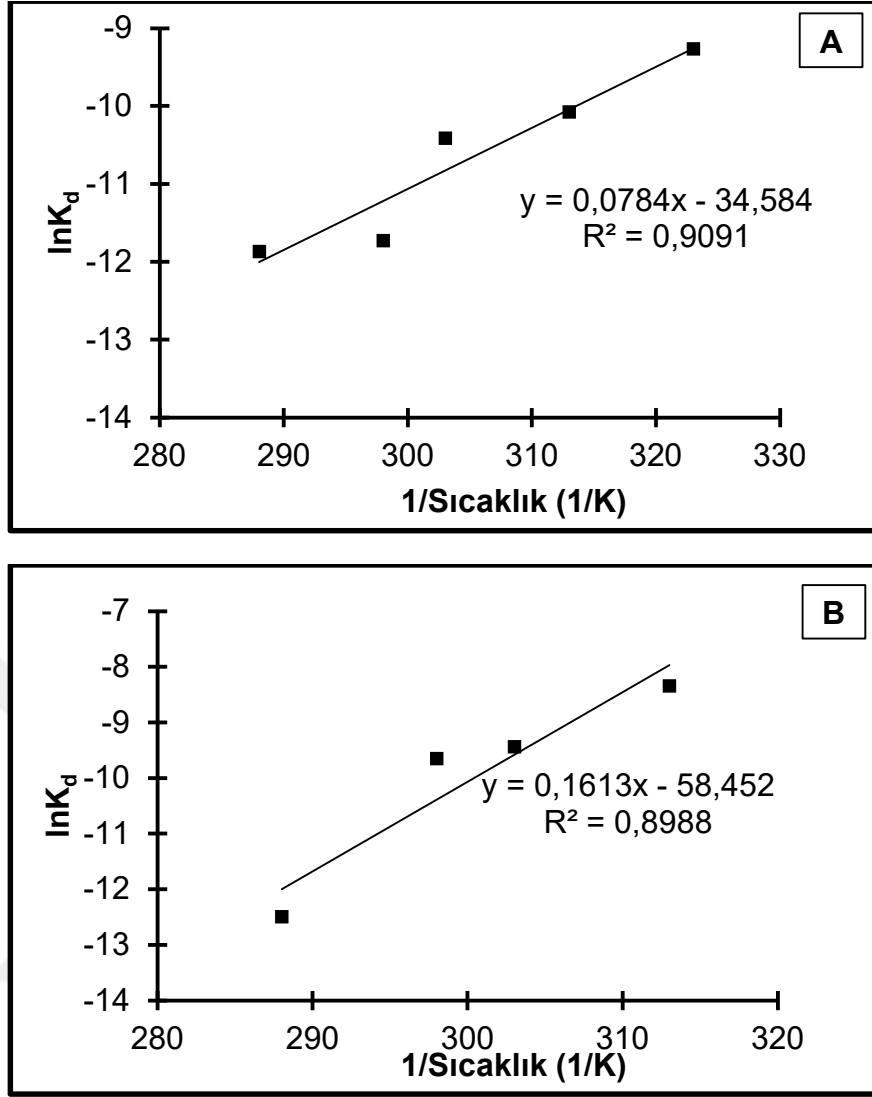
$$\ln b = \Delta S / R - \Delta H / RT \quad (4.5)$$

$\ln b$ 'ye karşılık $1/T$ grafiği çizilmesi sonucu oluşan doğrunun eğimi adsorpsiyon entalpisini (ΔH) ve kayma değerinden de adsorpsiyon entropisi (ΔS) hesaplanır [170].

Aşağıdaki eşitlikle ifade edilen van't Hoff denkleminde göre;

$$\ln K_{eq} = - \Delta H/R \times 1/T + \Delta S/R \quad (4.6)$$

$\ln K_{eq}$ 'ya karşı çizilen $1/T$ grafiğinde eğim= $-\Delta H/R$ yi, kesim noktası ise $\Delta S/R$ yi vermektedir.



Şekil 4.13. van't Hoff eğrisi için çizilen grafik (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2)

van't Hoff eşitliğine göre mod-SiO₂@P1 partikülleri için $\Delta H = -0,653$ J/mol ve $\Delta S = -287,55$ J/mol.K değerleri 25°C'de hesaplandı. ΔH 'ın negatif değerde olması adsorpsiyonun ekzotermik bir süreçle işlediğini göstermektedir. Negatif ΔS değeri ise adsorpsiyon sürecinin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir. ΔG ise 29,056 kJ/mol.K olarak hesaplandı. Bu veriler dâhilinde ekzergonik bir sistem ile adsorpsiyon oluştuğu anlaşıldı. Bir başka deyişle iç enerji isteyen bir sistemdir ve serbest enerjinin açığa çıkması ile gerçekleşir (Şekil 4.13.)

Benzer şekilde van't Hoff eşitliğine göre mod-SiO₂@P2 partikülleri için $\Delta H = -1,341$ J/mol ve $\Delta S = -485,95$ J/mol.K değerleri de 25°C'de hesaplandı. ΔH 'ın negatif

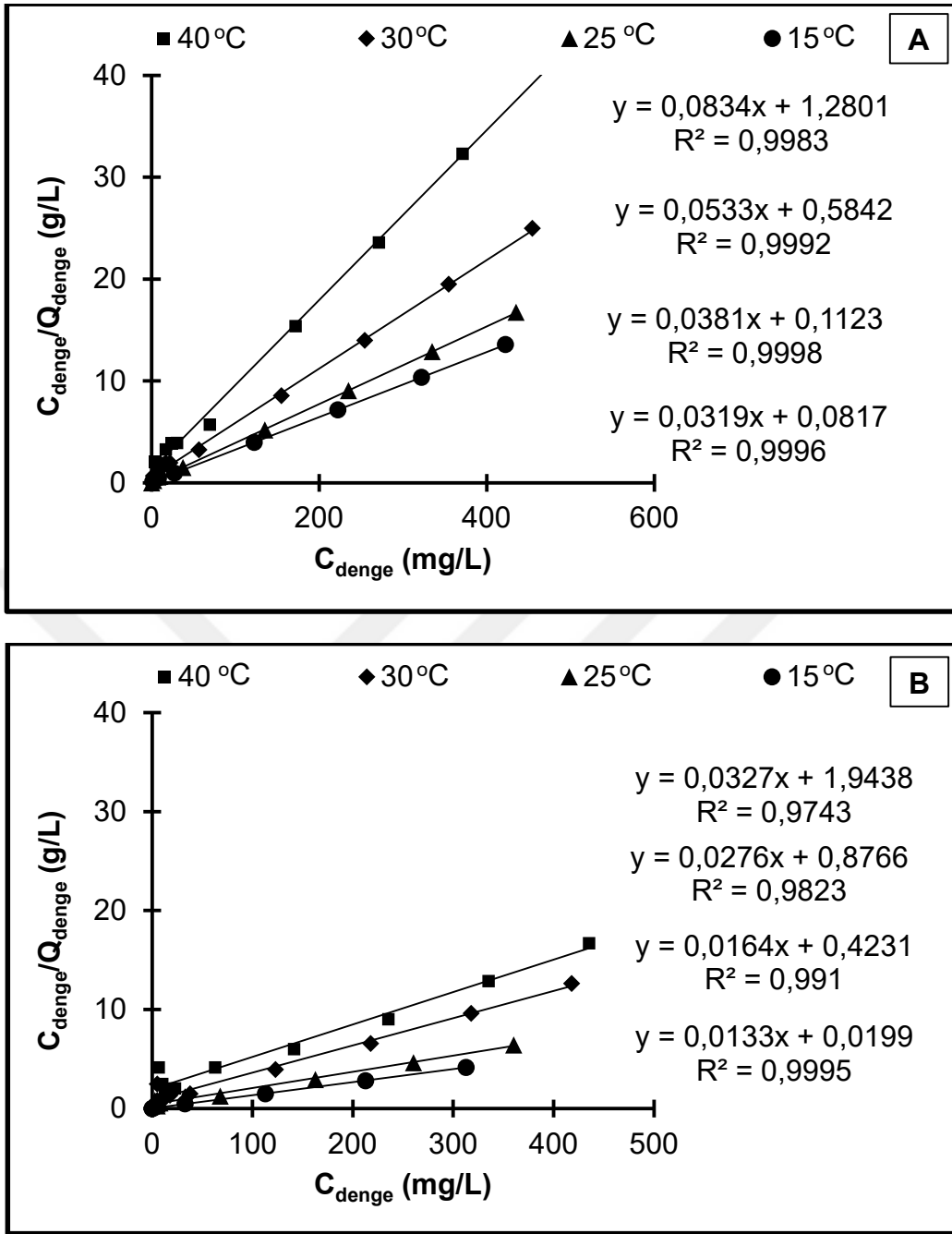
değerde olması adsorpsiyonun ekzotermik bir süreçle işlediğini göstermektedir. Negatif ΔS değeri ise adsorpsiyon sürecinin kendiliğinden gerçekleştiğine işaret etmektedir. ΔG ise 23,905 kJ/mol.K olarak hesaplandı. Bu veriler dâhilinde de yine ekzergonik bir sistem ile adsorpsiyon oluşmaktadır. Bir başka değişle iç enerji isteyen bir sistemdir ve serbest enerjinin açığa çıkması ile gerçekleşir (Şekil 4.13.).

4.2.4. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi; denge halinde olan çözeltideki iyonlar ile iki katı faza adsorplanan iyonların miktarı arasındaki bağlantıyı tanımlar. Başka bir değişle adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon türünü karakterize etmek için kullanılır. Adsorpsiyon modellerinden Langmuir'in temelinde; moleküllerin sayısı belirli alanlara ve bu alanlarda tek bir molekülün adsorplanabileceğini ilkesi yer alır. Komşu bölgelerdeki adsorplanan moleküller arasında herhangi bir etkileşim olmadığı ve adsorpsiyon noktalarının enerjilerinin eşit olduğu varsayılır [171]. Aşağıdaki eşitlikte Langmuir İzoterm modeli tanımlanmıştır. Dengedeki sonuçların eşitliğe göre uygulanmasıyla birlikte sonuçta doğrusal bir grafik elde ediliyorsa, bu sistemdeki adsorpsiyon modelinin Langmuir modeline uygun olabileceği anlamına gelmektedir.

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{mak} \cdot b) + C_{eq}/Q_{mak} \quad (4.7)$$

Bu eşitlikteki; Q adsorplanmış hyaluronik asit miktarını (mg/g), C_{eq} denge hyaluronik asit derişimini (mg/L), b Langmuir sabitini ve Q_{max} adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Y eksenini kesen nokta $1/Q_{max} \cdot b$ değerini ve eğimin $1/Q_{max}$ değerini, C_{eq}/Q_{eq} 'ya karşı çizilen C_{eq} grafiği ile hesaplamak mümkündür.



Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklardaki (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülleri için Langmuir izoterm modelleri

Yukarıdaki şekillerde farklı sıcaklık değerlerindeki mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 partiküllerinin adsorpsiyonlarının verileri grafiğe geçirilerek elde edilen sonuçlar gösterildi. Her iki partikül ve her dört sıcaklık için de kolerasyon katsayısı (R^2) yüksektir ve bu doğrusal sonuçlar adsorpsiyonun Langmuir izotermine uygun bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.13.)

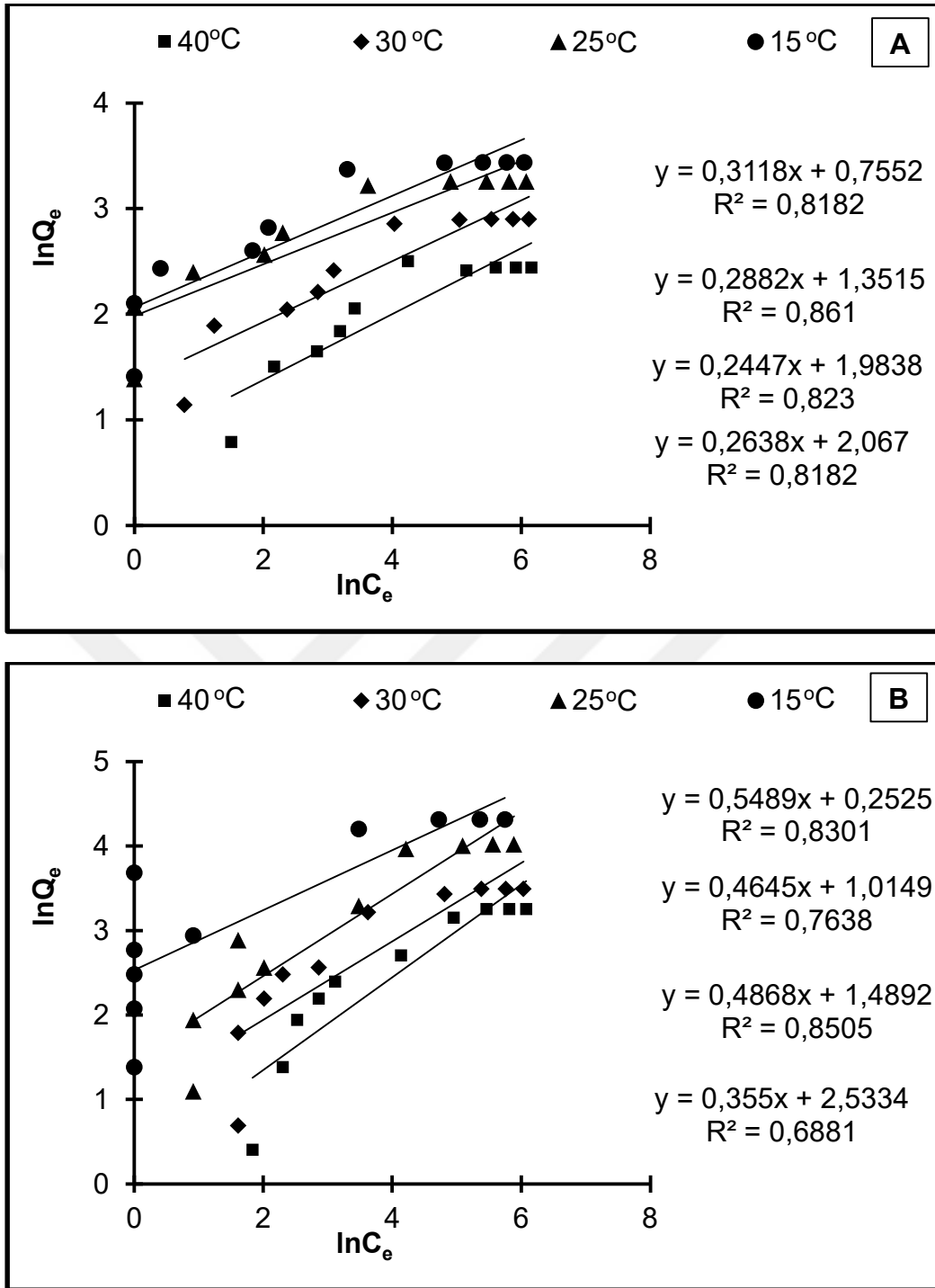
Bilinen en eski adsorpsiyon dengesini sağlayan eşitliklerden diğeri de Freundlich adsorpsiyon modelidir [172]. Langmuir izoterminin farklı bir formu olan Freundlich izotermi; homojen olmayan yüzeydeki adsorpsiyonu tanımlamada kullanılır. Freundlich; komşu bağlanma alanlarının bağlantı yapıp, yapmadığına bağlı olarak adsorpsiyon enerjisinin değiştiğini kabul etmektedir. Aşağıdaki eşitlik ile Freundlich tanımlanır.

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (4.8)$$

Bu eşitlikte Q_e adsorpsiyon miktarını (mg/g), C_e çözeltideki hyaluronik asit derişimini (mg/L), K_F ve n ise Freundlich sabitidir. Eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak doğrusal bir hale dönüştürülebilir

$$\ln Q_e = \ln K_F + 1/n \cdot \ln C_e \quad (4.9)$$

$\ln Q_e$ 'ya karşı çizilen $\ln C_e$ grafiğinin doğrusal şekilde olması Freundlich izoterm modeline uygun olabileceğini göstermektedir. Bu grafik ile birlikte y ekseninin kesim noktasından K_F değerini hesaplarken, eğimden ise n sabiti hesaplanmaktadır.



Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklardaki (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülleri için Freundlich izoterm modelleri

Yukarıdaki şekillerde mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 partikülleri için farklı sıcaklık değerlerindeki adsorpsiyonların verileri grafiğe geçirilerek elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Her iki partikül ve her dört farklı sıcaklık için de kolerasyon katsayısı (R^2), Langmuir modelindeki kolerasyon katsayılarından düşük bulundu. Bu nedenden dolayı adsorpsiyonun çok katlı bir tabakada olmadığı,

homojen bir yüzeyde gerçekleştiği sonucuna varıldı. Adsorpsiyon tek tabakalı şekilde gerçekleştiği belirlendi. Bu adsorpsiyon ilişkisinde Langmuir modeli, Freundlich'e göre daha uygun bir model olduğu anlaşıldı (Şekil 4.14.).

Çizelge 4.1. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülleri üzerine hyaluronik asit adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve kolerasyon katsayıları.

(A) Freundlich İzoterm Modeli				Langmuir İzoterm Modeli			
Sıcaklık	K _F mL/g	n	R ²	Q _{mak}	b, L/mg	K _d , mg/L	R ²
15°C	7.90	3.79	0.82	31.34	0.39	2.56	0.998
25°C	7.27	3.64	0.82	26.24	0.34	2.95	0.999
30°C	3.86	3.47	0.86	18.76	0.09	10.96	0.999
40°C	2.13	3.20	0.82	11.99	0.06	15.34	0.999
(B) Freundlich İzoterm Modeli				Langmuir İzoterm Modeli			
Sıcaklık	K _F mL/g	n	R ²	Q _{mak}	b, L/mg	K _d , mg/L	R ²
15°C	16.78	2.82	0.69	75,18	0.67	1.49	0.999
25°C	7.77	2.05	0.85	60.97	0.04	25.79	0.991
30°C	8.58	2.15	0.76	36.23	0.03	31.76	0.982
40°C	6.17	1.82	0.83	30.58	0.02	59.44	0.974

4.2.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Birinci ve ikinci derece kinetik modellerin elde edilen sonuçlara uygulanmasıyla birlikte mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 partikülleri için adsorpsiyon işlemini kontrol eden kütle aktarımı ve kimyasal tepkime gibi mekanizmalar araştırıldı. Adsorbent yüzey derişimlerine, ölçülen derişimin eşit olduğu durumlar kabul edilerek kinetik modeller uygulandı. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği, sıvı çözeltiden çözünen adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir. Aşağıdaki eşitlikle ifade edilir.

$$dq_t/dt=k_1(q_{eq}-q_t) \quad (4.10)$$

Eşitlikte yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti olarak k₁ (1/dak), q_e denge zamanında, q_t ise t anında adsorplanan hyaluronik asit (mg/g) miktarını

göstermektedir. Sınır olarak $t=0$ da $q_t=0$ ve $t=t$ anında $q_t=q_t$ olarak kabul edilmiş ve integral uygulanarak aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.11)$$

Eşitlik tekrardan düzenlenip, doğrusal forma dönüştürülerek aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\log(q_{eq}-q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.12)$$

Çizilen $\log(q_{eq})$ 'ya karşı t grafiğinin doğrusal olması kinetik modelin uygulanabileceğinin göstergesidir. Diğer taraftan, T ye karşı $\log(q_{eq}-q_t)$ grafiğinin kesim noktası, gerçek-birinci derece işlemde $\log(q_{eq})$ 'ya eşit olmalıdır. Ayrıca yalancı ikinci derece denklem olan ve adsorpsiyon denge kapasitesine dayanan eşitlik aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.13)$$

Yalancı-ikinci derece hız sabiti olarak k_2 (g/mg.g) şeklinde sembolize edilir. Sınır olarak $t=0$ da $q_t=0$ ve $t=t$ anında $q_t=q_t$ olarak kabul edilip uygulandığında aşağıdaki eşitlik elde edilir.

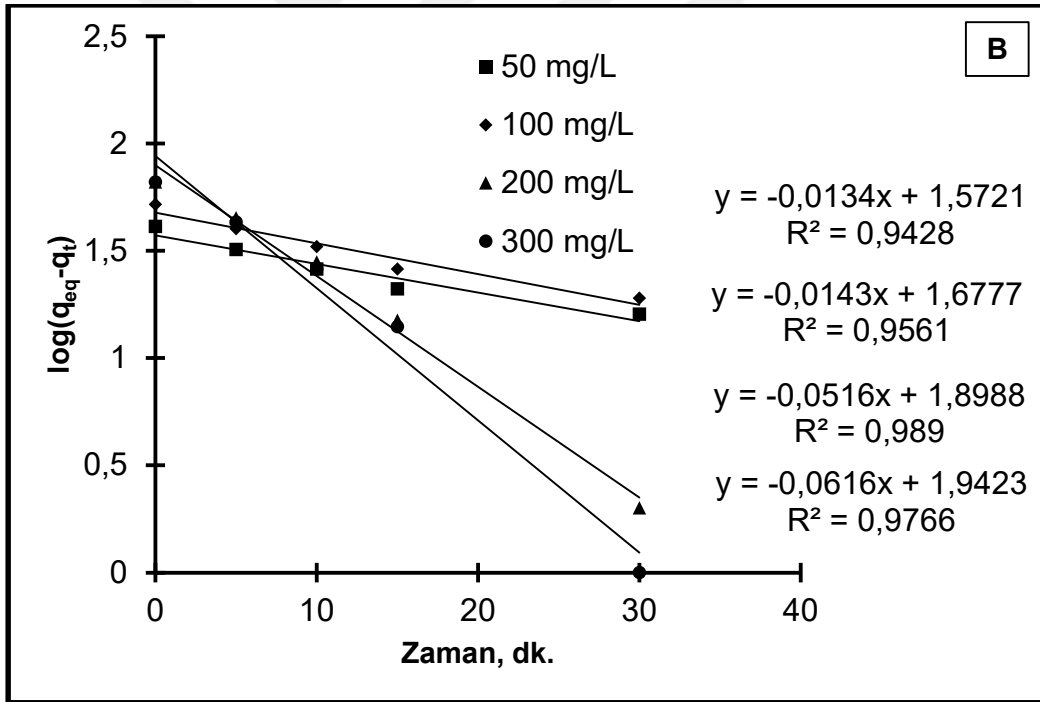
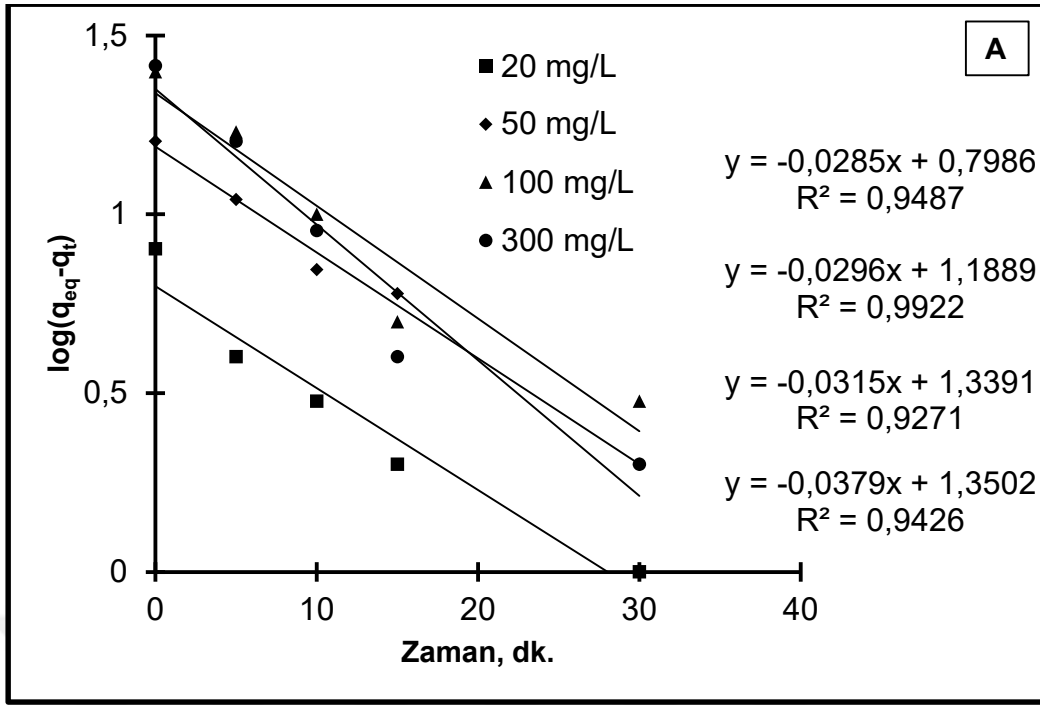
$$1/(q_{eq}-q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (4.14)$$

Bu eşitliğin doğrusal şeklindeki hali ise şu şekildedir;

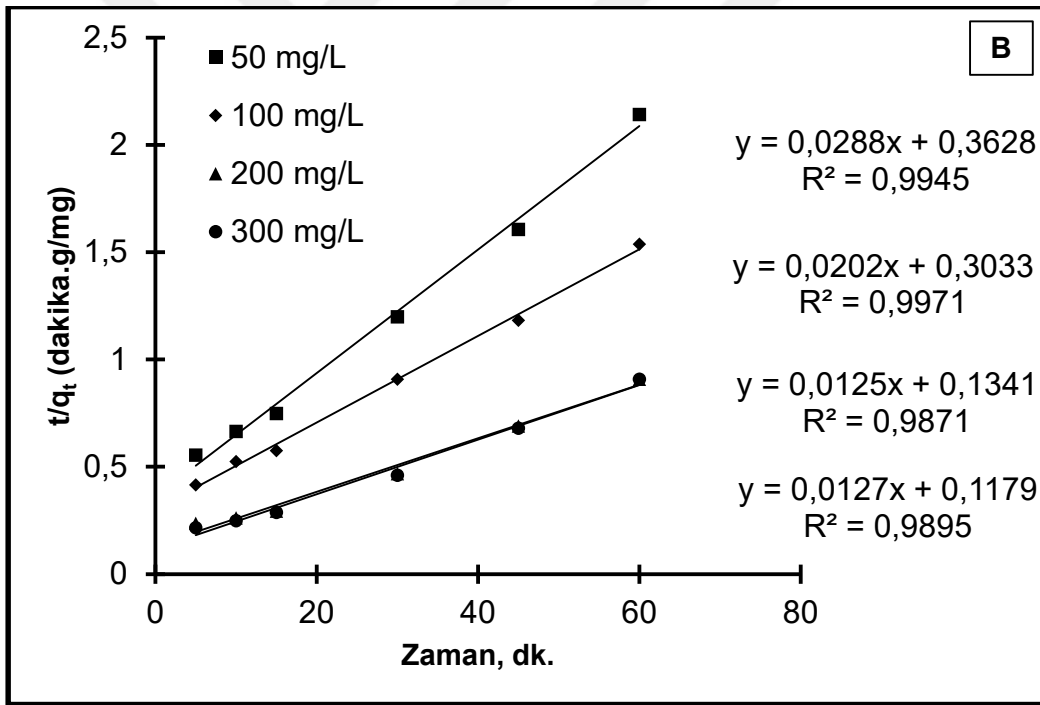
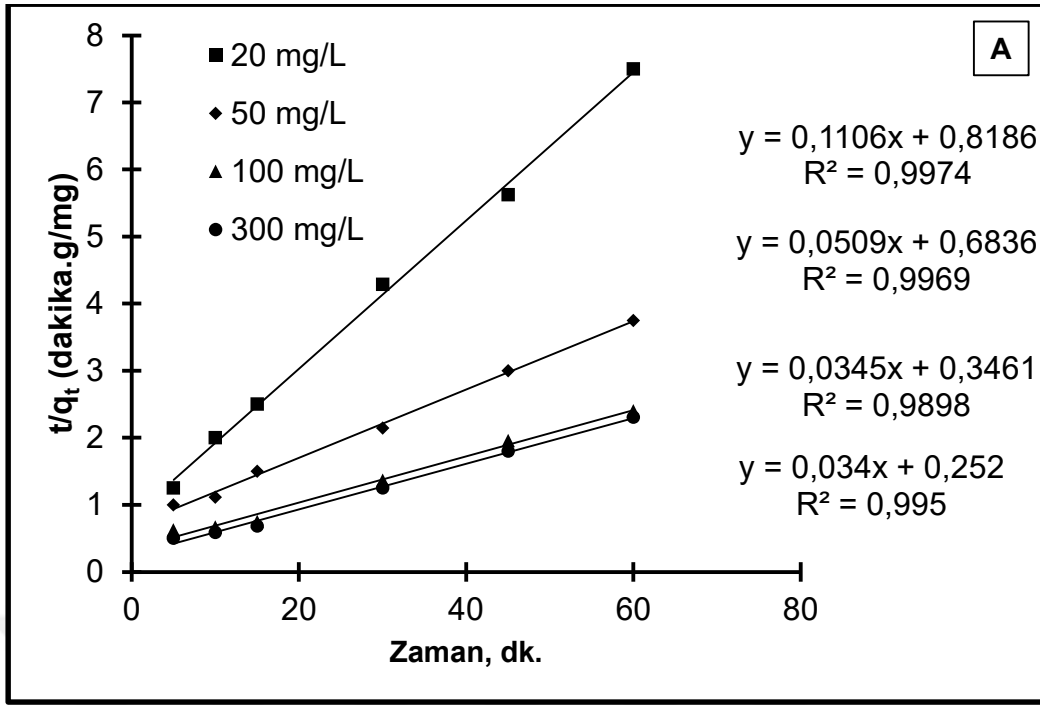
$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.15)$$

t/q_t 'ye karşı çizilen t grafiğinin doğrusal olması, ikinci derece kinetiğin uygulanabilmesi anlamına gelmektedir. Kesim noktası ve eğimden; hız sabiti k_2 ve denge adsorpsiyonu q_{eq} bulunur.





Şekil 4.16. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülleri için elde edilen verilerin yalancı-birinci derece kinetiği.



Şekil 4.17. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülleri için elde edilen verilerin yalancı-ikinci derece kinetiği.

Çizelge 4.2. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partikülü için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

A	C _{HA}	Q _{deneyssel}	Yalancı Birinci Derece Kinetik			Yalancı İkinci Derece Kinetik		
	(mg/L)	(mg/g)	K ₁ (1/dk)	q _e (mol/g)	R ²	K ₂ (1/dk)	q _e (mol/g)	R ²
	20	8	0.0656	6.16	0.949	0.0149	9.04	0.997
	50	16	0.0682	15.45	0.992	0.0038	19.66	0.997
	100	25	0.0725	21.83	0.927	0.0034	28.98	0.990
	300	26	0.0873	22.43	0.942	0.0053	29.41	0.995

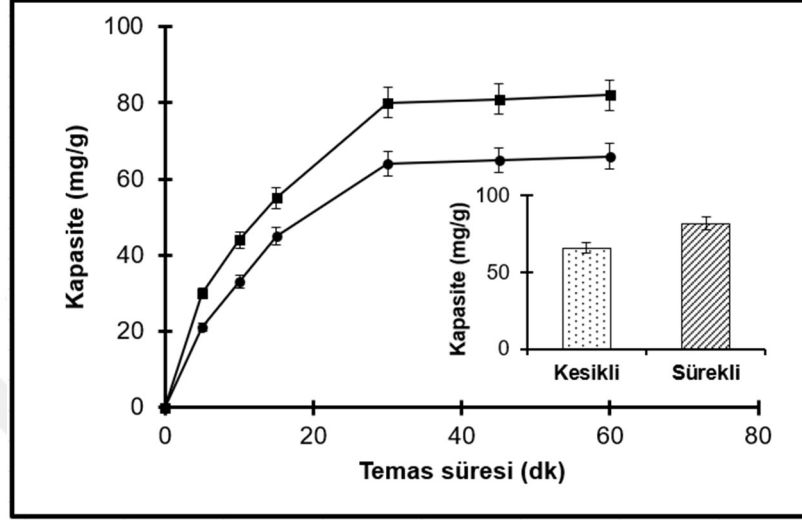
B	C _{HA}	Q _{deneyssel}	Yalancı Birinci Derece Kinetik			Yalancı İkinci Derece Kinetik		
	(mg/L)	(mg/g)	K ₁ (1/dk)	q _e (mol/g)	R ²	K ₂ (1/dk)	q _e (mol/g)	R ²
	50	28	0.0309	37.33	0.943	0.0029	34.72	0.994
	100	39	0.0329	47.61	0.965	0.0013	49.50	0.997
	300	66	0.1188	79.21	0.989	0.0012	80.00	0.987
	400	66	0.1418	87.56	0.976	0.0013	78.74	0.989

Deneyssel değerler ile yalancı-ikinci derece kinetik denkleminde elde edilen teorik q_e değeri benzer sonuçlar göstermektedir. Ayrıca korelasyon katsayısı da yüksektir. Farklı derişimlerde gözlemlenen R² değerleri bire yakın bir noktadır. Bu noktada mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 partiküllerinin ikinci-derece kinetik modele uygun olacağını göstermektedir. Difüzyon sınırlamaları bu sonuçlar ışığında hyaluronik asidin hibrit çekidek-kabuk partiküle adsorpsiyonunda ihmal edilebilir. Partiküllerin gözenekli yapısının çekirdek-kabuk yapısında olması hyaluronik asit çözeltisi üzerinde düzgün bir akışa olanak sağlamak ve bu durumu oldukça hızlı bir adsorpsiyona işaret etmektedir.

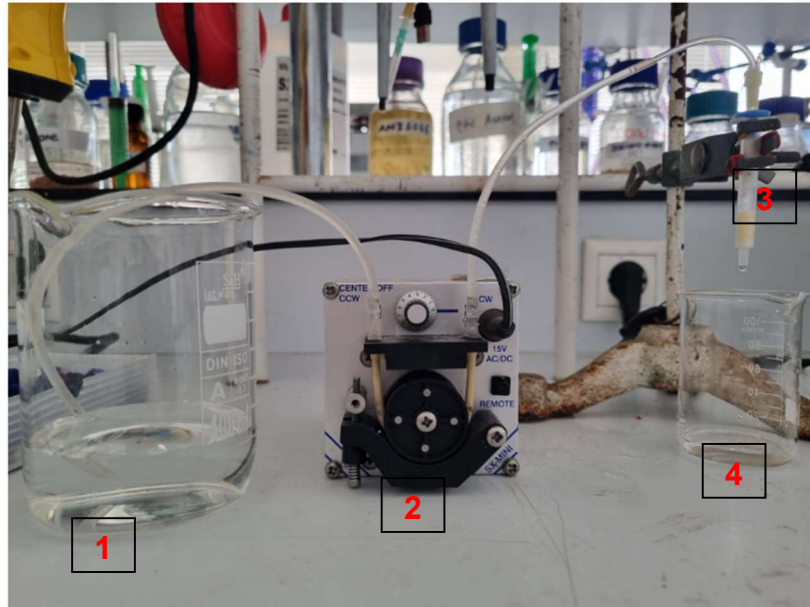
4.2.6. Kesikli – Sürekli Sistem Adsorpsiyon Karşılaştırma

Farklı sürelerle etikleşimin sonucunda kesikli ve sürekli adsorpsiyon kapasitesi değerleri hesaplandı ve karşılaştırıldı. İki durum göz önüne alındığında sürekli sistemdeki adsorpsiyon kapasitesi değeri kesikli sistemde elde edilen değerden daha yüksektir. Sürekli sistemde gerçekleşen mod-SiO₂@P2 partiküllerinin

adsorpsiyon kapasitesinin arttığı gözlemlendi. Bu durumun sebebi ise; akışın devamlı olmasının yarattığı süreklilik kütle transfer katsayısını da desteklediği belirlendi. Kütle transferinin artması doğrudan olarak adsorpsiyon kapasitesini de arttırdığı belirlendi.



Şekil 4.18. Kesikli ve sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partikülleri üzerine hyaluronik asit adsorpsiyon kapasitesi karşılaştırma (Derişim: 300 mg/L, pH: 7.0, T: 25°C, akış hızı: 1.0 mL/dk, partikül: 100 mg)

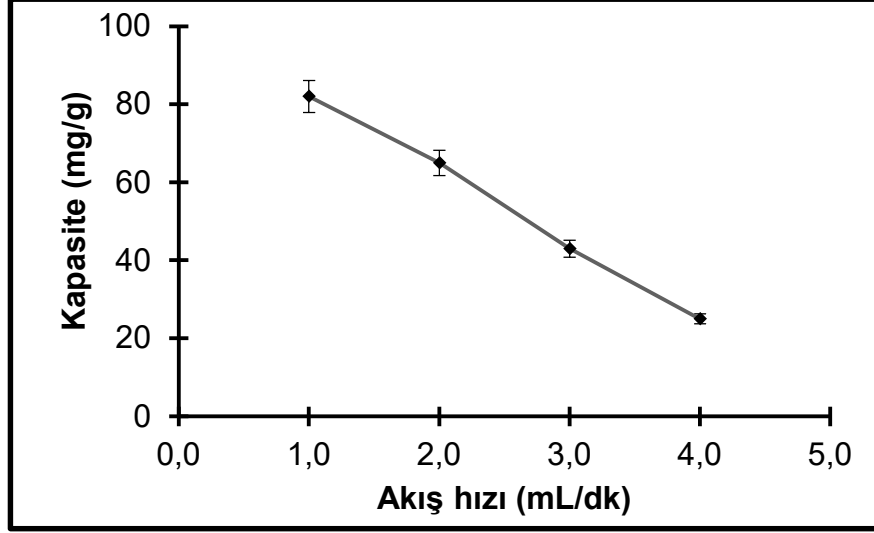


Şekil 4.19. Sürekli siste akış düzeneği

Şekil 4.19.'daki akış düzeneğinde sol tarafta hyaluronik asit çözeltisi (1- besleme çözeltisi) ortadaki pompa (2- peristaltik pompa) yardımıyla sağ taraftaki mod-SiO₂@P2 partikülleriyle doldurulmuş (3- dolgulu kolon) kolona taşınmakta ve kolondan geçen hyaluronik asitler fonksiyonel gruplara tutunarak ayrışmaktadır (4- toplama çözeltisi). Bu iş paketi kapsamında, kesikli sistemde belirlenen optimum koşullar uygulandı. Yeni bir parametre olarak, sürekli sistemdeki çözelti besleme akış hızının etkisi incelendi.

4.2.7. Sürekli Sistemde Akış Hızı Etkisi

Sürekli sistemde akış hızının mod-SiO₂@P2 partikülleri üzerindeki hyaluronik asit adsorpsiyonu üzerine etkisi incelendi. Akış hızı etkisinin gözlemlenmesi için 300 mg/L derişimdeki hyaluronik asit çözeltisi; 1,0-4,0 mL/dk akış hızlarında doldurulmuş kolondan geçirilmiş ve adsorpsiyon değerleri gözlemlenmiştir. Akış hızı değişimlerinin hyaluronik asit adsorpsiyonu üstündeki etkisi gösterildi (Şekil 4.20.). Hyaluronik asidin adsorpsiyon kapasitesi 1.0 mL/dk akış hızında 82 mg/g iken, akış hızı 4.0 mL/dk'ya geldiğinde 25 mg/g değerine geriledi. mod-SiO₂@P2 partikülü üstünde HA ile etkileşime girecek fonksiyonel gruplar akış hızının artmasıyla birlikte etkileşim için yeterli süreyi bulamamasından kaynaklı olarak adsorpsiyon kapasitesinde azalma gözlemlendi. Bu durum da aslında HA'nın kolondaki alıkonma süresinin azalması olarak karşımıza gelmektedir.



Şekil 4.20. Hyaluronik asit adsorpsiyonuna akış hızının etkisi (HA derişimi: 300 mg/L; pH: 7.0; Sıcaklık: 25°C, partikül: 100 mg).

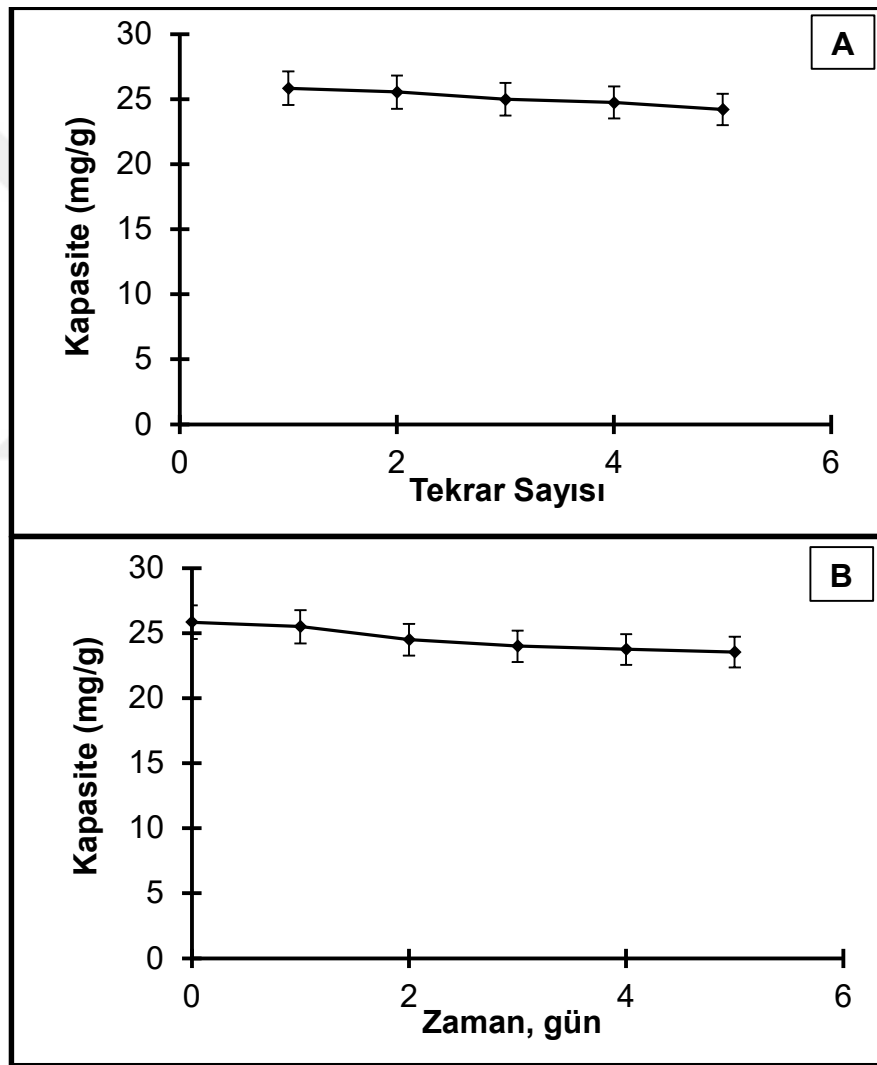
4.3. Desorpsiyon, Tekrardan Kullanılabilirlik, Kararlılık ve Seçicilik

4.3.1. Desorpsiyon, Tekrardan Kullanılabilirlik ve Kararlılık

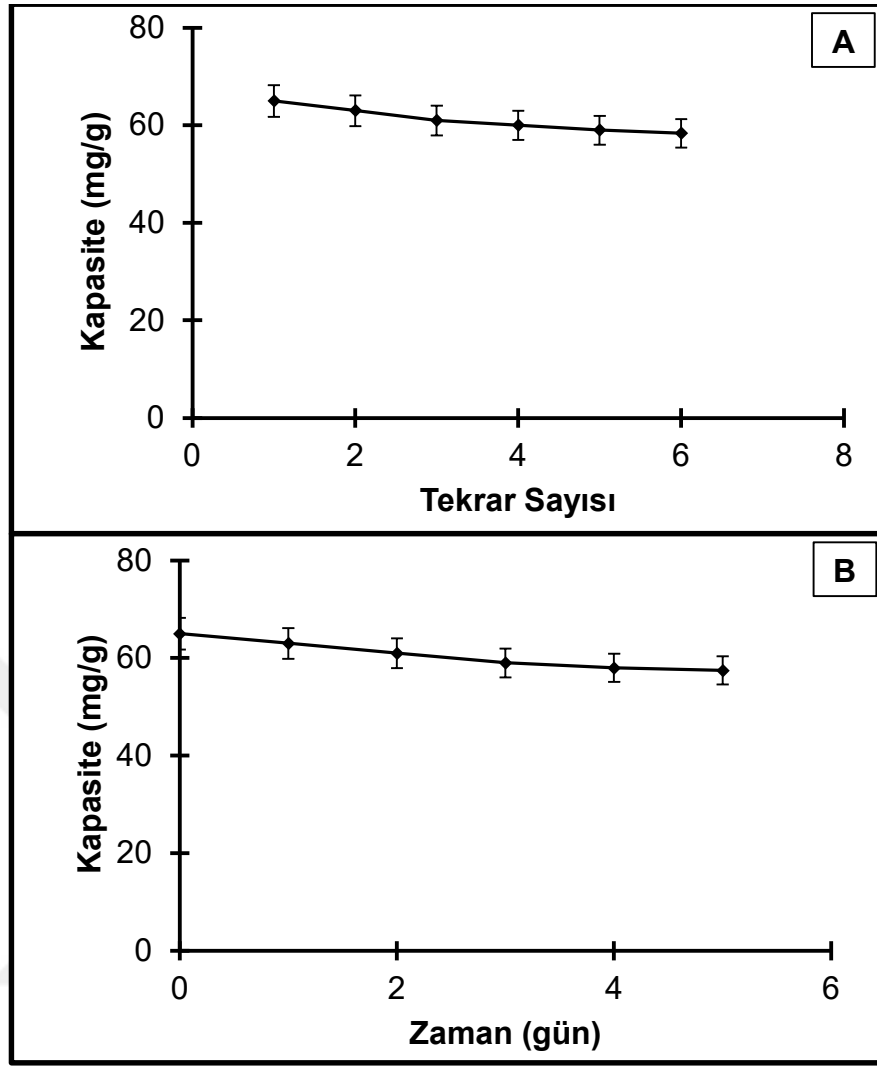
Desorpsiyondan sonra sentezlenen partiküllerin yeniden kullanılabilirliği de, geliştirilen hibrit çekirdek-kabuk partiküllerinin maliyet etkinliğini değerlendirmek amacıyla incelendi. Bu amaçla, 1,0 M glisin hidroklorür kullanılarak bir kesikli sistemde HA desorpsiyonu gerçekleştirildi ve aynı partiküller kullanılarak beş ardışık adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü uygulandı. Döngülerden sonra kapasitede önemli bir azalma gözlenmedi. Beşinci tekrarın sonunda mod-SiO₂@P1 partiküllerinin adsorpsiyon kapasitesi sadece %6,3'lük bir azalımla adsorpsiyon kapasitesini 24,22 mg/g olarak korudu. Diğer taraftan beşinci tekrarın sonunda mod-SiO₂@P2 partiküllerinin adsorpsiyon kapasitesinde ise sadece %8,6'lık bir azalmayla birlikte adsorpsiyon kapasitesini 58,36 mg/g olarak koruduğu gözlemlendi. Sonuçlar, bu partiküllerin HA adsorpsiyonu için önemli bir adsorpsiyon kabiliyeti kaybı olmadan tekrar tekrar kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışma bu aşamada ayrıca, HA'nın mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk partiküllerinden desorpsiyon kinetiği de incelendi. Bu çalışmada, adsorpsiyona maruz kalan partiküllerin salım / elüsyon durumları ölçülerek hyaluronik asidin partiküllere bağlı kalma kararlılığı gözlemlendi. Bu bağlamda

örnekler 0-5 gün arasında incelendi. Sonuçlara göre, mod-SiO₂@P1 partiküllerin 5 gün içerisinde %8,9'luk bir adsorpsiyon kaybı gözlemlendi ve 5. gün sonunda adsorpsiyon kapasitesi 23,55 mg/g olarak korundu. Öte yandan mod-SiO₂@P2 partiküllerinde ise 5 gün içerisinde %10,2'lik bir adsorpsiyon kaybı gözlemlendi ve 5. gün sonunda adsorpsiyon kapasitesi 57,48 mg/g olarak korundu. Bu da HA'nın partiküllere bağlanmasının önemli bir adsorpsiyon kabiliyeti kaybı olmadan kararlı kaldığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar; Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.21. mod-SiO₂@P1 partikülü için (A) tekrar kullanılabilirlik ve (B) desorpsiyon kinetiği çalışmaları (C_{HA}: 100 mg, pH: 7.00, t: 60 dk., T: 25°C)



Şekil 4.22. mod-SiO₂@P2 partikülü için (A) tekrar kullanılabilirlik ve (B) desorpsiyon kinetiği çalışmaları (C_{HA}: 300 mg, pH: 7.00, t: 60 dk., T: 25°C)

4.3.2. Seçicilik

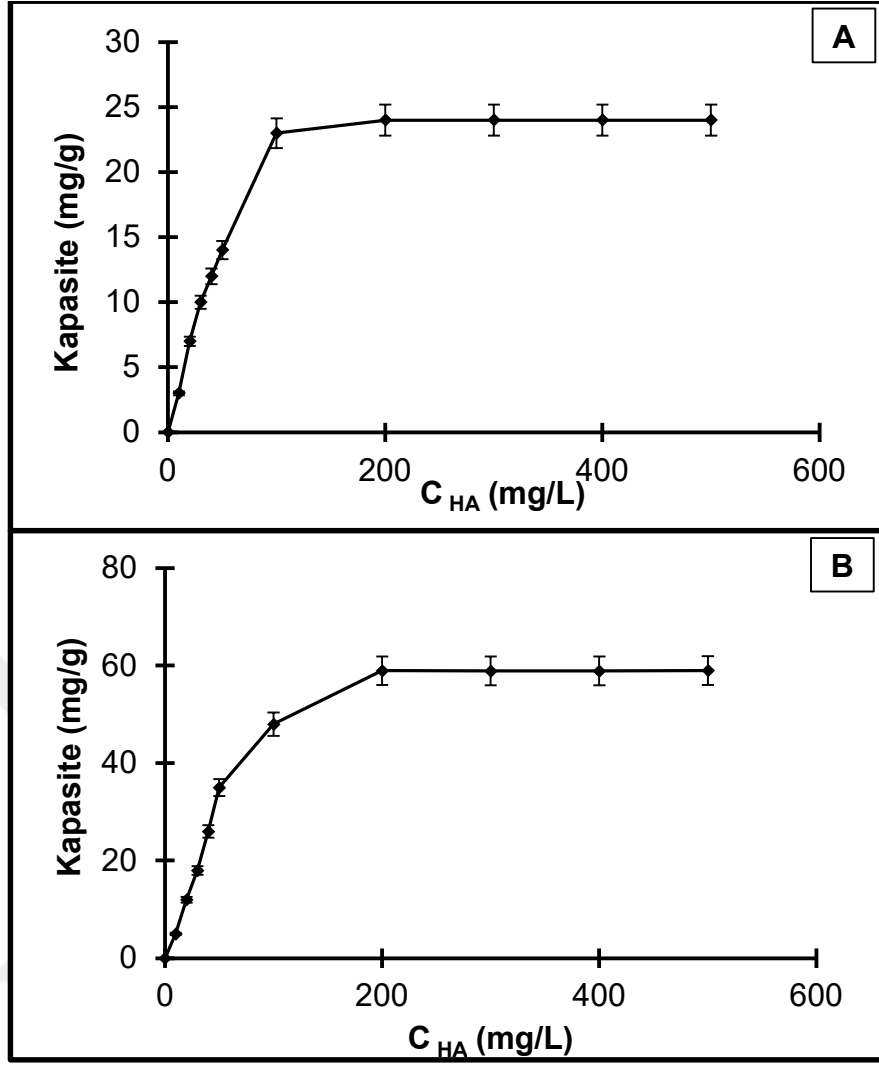
Hyaluronik asidin mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk partikülleri üzerindeki adsorpsiyonuna yönelik seçicilik çalışmaları araştırıldı. Bu bağlamda, seçicilik çalışması, *E. coli* lizat çözeltilerinde HA'nın seçiciliğine odaklanmıştır (Şekil 4.23.). Çalışmada, *E. coli* lizatına farklı derişimlerde HA eklenerek hazırlanan karışım çözeltilerinde HA'nın ne kadar etkili bir şekilde adsorplandığı incelendi. HA, 0 - 500 mg/L derişimlerde hazırlanmış ve eşit miktarda *E. coli* lizat çözeltilerine eklendi. *E. coli* lizatının hazırlanmasında Krinsky ve ark. [173] hazırlama yöntemi tatbik edildi. Hazırlanan lizat çözeltisi 0,45 µm 47 mm rejenere selüloz membran filtreden geçirildi ve HA'nın adsorpsiyon seçiciliği, elde edilen

lizat çözeltilerinde incelendi. Bu ilk inceleme kesikli sistem olarak çalışıldı. HA'nın karışım çözeltilerinden önemli ölçüde ayrıldığını ve çekirdek-kabuk partiküllerine başarıyla bağlandığını gösterdi. HA'nın çekirdek-kabuk partiküllerine rekabetçi olarak bağlandığı gözlemlendi. mod-SiO₂@P1 partikülleri için maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 7,0'da 23,75 mg/g olarak, mod-SiO₂@P2 partikülleri için ise 58,2 mg/g hesaplandı. Partiküllerin adsorpsiyon kapasiteleri lizat çözeltilerinde sulu çözeltilere göre biraz azaldığı tespit edildi. Bunun nedeni, *E. coli* lizat çözeltilerindeki diğer bileşiklerin hidrofobik bağlanma bölgelerine az miktarda bağlanmış olmasıdır.

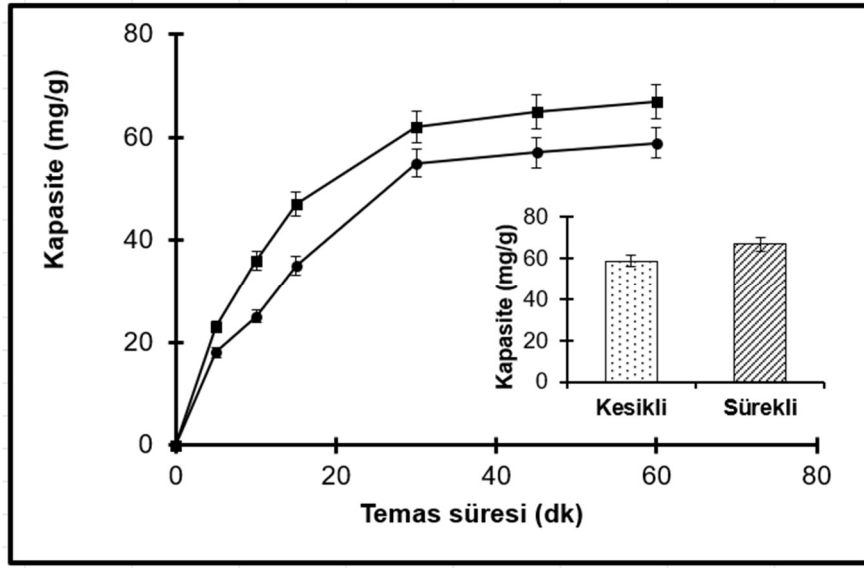
Seçicilik çalışmalarının ikinci bölümünde, modifiye edilmemiş çekirdek-kabuk partikülleri kontrol grubu olarak kullanıldı. Aynı deneysel yöntemler uygulandı. Kesikli sistem olarak yapılan çalışmada sonuçlar; modifiye edilmemiş çekirdek-kabuk partiküllerinde HA'nın önemli bir adsorpsiyonunun olmadığını gösterdi.

Seçicilik çalışmalarının üçüncü bölümünde, *E. coli* lizati içersine 300 mg/L derişimde olacak şekilde HA eklenmiş ve lizat çözeltisi hem filtre edilerek hem de filtre edilmeden adsorpsiyon sürekli sistemde çalışıldı. Filtre edilmeden çalışılan örnekte lizat çözeltisi kolonu çok hızlı bir şekilde tıkadı. Kolon içersinden akış geçemediği için herhangi bir sonuç alınamadı.

Kesikli sistem çalışmasına göre adsorpsiyon kapasitesi sürekli sistem lizat örnekli sistemde %15,5 artarak 67 mg/g'a yükseldi. Bu durum akışın kütle transferini desteklemesinden kaynaklı kapasite artışı olduğu şekilde değerlendirildi. Şekil 4.25.'de filtre edilen ve filtre edilmeden hazırlanan lizat çözeltilerinden mod-SiO₂@P2 partiküllerine hyaluronik asit adsorpsiyon düzeneği verildi.



Şekil 4.23. (A) mod-SiO₂@P1 ve (B) mod-SiO₂@P2 partiküllerine *E. coli* lizatından HA adsorpsiyonu (pH: 7.00, t: 60 dk, T: 25°C)



Şekil 4.24. *E. coli* lizatından HA adsorpsiyonun mod-SiO₂@P2 partiküllerle kesikli ve sürekli sistem karşılaştırılması.

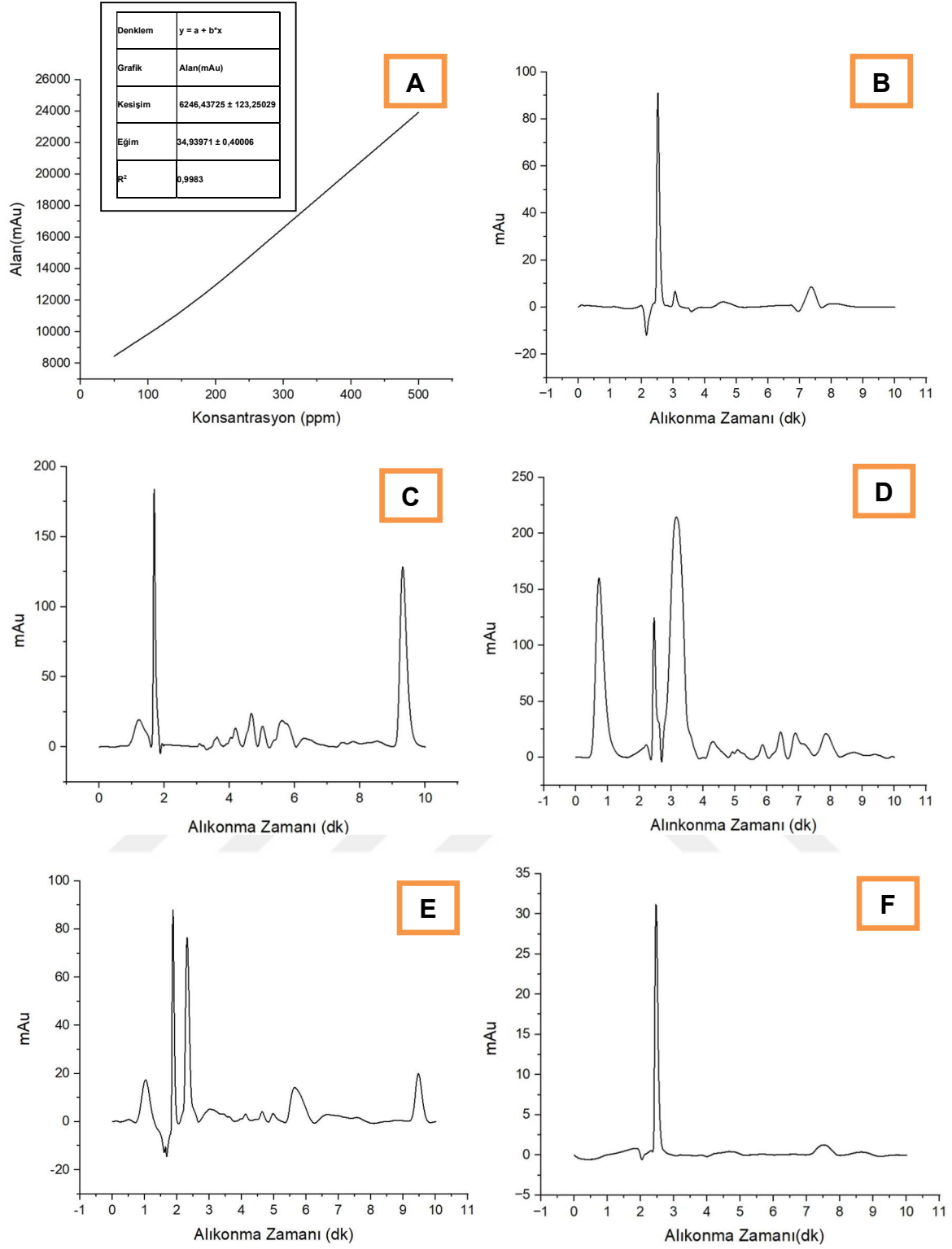


Şekil 4.25. *E. coli* lizatından HA adsorpsiyonunun sürekli sistem akış düzeneği (A) filtre edilmemiş örnek ve (B) filtre edilmiş örnek.

4.4. HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) Çalışmaları

Lizat çözeltisi içerisinde hyaluronik asit adsorpsiyonu sürekli sistem deneylerinin kromatografik doğrulaması olarak HPLC çalışmaları yapıldı. Bu bağlamda öncelikle farklı hyaluronik asit derişimleri (0 – 500 mg/L) ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Sürekli sistem çalışmalarında kullanılan lizat'ın, lizat içerisinde 300 ppm hyaluronik asit eklenilen örneğin, sentezlenen mod-SiO₂@P2 hibrit çekirdek – kabuk partikülleri üzerinden sürekli sistemde geçirilen lizat + hyaluronik asit içeren çözelti örneğinin ve mod-SiO₂@P2 tutunmuş hyaluronik asitin desorpsiyon çözeltisinin kromatogramları alınarak hesaplamalar yapıldı.

HPLC kromatogramları incelendiğinde 2,5'inci dakikada hyaluronik asit pikinin geldiği gözlemlendi. Lizat çözeltisine ait kromatogramda 2,5'inci dakikada herhangi bir pik gelmediği, bununla birlikte lizat içerisinde hyaluronik asit eklendiğinde 2,5'inci dakikada pikin geldiği gözlemlendi. Lizat içerisinde farklı moleküllerin pikleri de yine kromatogramlarda gözlemlendi. Sürekli sistem lizat + hyaluronik asit içeren çözelti için bulunan değerlerle HPLC kromatogramlarından hesaplanan değerler arasında benzer sonuçlara ulaşıldı. Bu bağlamda; lizat içerisindeki sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partiküllerine %37,22 verim ile bağlanan hyaluronik asitin HPLC miktar tayininde %35,5 oranında bağlandığı ve çözelti içerisinde 193,5 ppm derişimde olduğu bulundu. Lizat içermeyen sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partiküllerine %45,5 verim ile bağlandığı gözlenen hyaluronik asit desorbe edilerek HPLC kromatogramı incelendi. Desorpsiyon deneylerinde hyaluronik asit %3 lük bir kayıpla partikülden desorbe edilmişti. Lizat içermeyen çözeltide mod-SiO₂@P2 partiküllerinden desorbe edilen hyaluronik asitin HPLC kromatogramıyla 85 ppm derişimde olduğu bulundu. Normalde bulunması gereken değerden %7 lik bir farkla sonuca ulaşıldı (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. HPLC Kromatogramları; (A) Kalibrasyon eğrisi, (B) Hyaluronik asit standardı, (C) *E. coli* lizatı, (D) *E. coli* lizatı + 300 ppm hyaluronik asit çözeltisi, (E) *E. coli* lizatlı sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partiküllerine adsorplanmayan hyaluronik asit, (F) *E. coli* lizatlı sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partiküllerinden desorbe edilen hyaluronik asit. (pH: 7.00, mobil faz: %80 su – %20 metanol, akış hızı: 1,0 mL/dk, sıcaklık: 25 °C, kolon: Cosmosil 5 C18-AR-II 5µm 150 x 4,6 mm, dedektör: PDA (215 nm))

5. YORUM

- Hyaluronik asitin ayrılması ve saflaştırılması için düşük maliyetli, etkinliği yüksek, son teknolojiye uygun bir dolgu malzemesi geliştirmek bu tez çalışmasının başlangıç noktasıdır.
- Bu kapsamda ilk adım olarak aspartik asit modifiyeli hibrit silika çekirdek – kabuk partiküller sentezlendi (mod-SiO₂@P1).
- İkinci adım olarak sentelenen partiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapıldı.
- mod-SiO₂@P1 partikülleri için spesifik yüzey alanı 240 m²/g iken, mod-SiO₂@P2 partikülleri için 440 m²/g olarak ölçüldü.
- mod-SiO₂@P1 partikülleri için gözenek boyutu ve hacmi sırasıyla 3,6 nm ve 0,68 cm³/g iken; mod-SiO₂@P2 partikülleri için 12,2 nm ve 1.03 cm³/g olarak ölçüldü.
- mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 partiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden yola çıkarak, pürüzlü ve gözenekli bir yapıya sahip oldukları gözlemlendi.
- mod-SiO₂@P1 partikülleri ile hyaluronik asit arasındaki adsorpsiyon çalışmaları kesikli sistemde; mod-SiO₂@P2 partikülleri ile hyaluronik asit arasındaki adsorpsiyon çalışmaları hem kesikli hem de sürekli sistemde yapıldı.
- mod-SiO₂@P1 partikülleri ile hyaluronik asidin adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesinin pH: 7,0'de 25,85 mg/g olarak hesaplanırken, mod-SiO₂@P2 partikülleri için 65,25 mg/g olarak hesaplandı.

- Sıcaklıkla beraber hyaluronik asitin adsorpsiyonunda düşüş gözlemlendi. Hidrofilik etkileşim temeline dayanan bu ilişkide beklenen bir sonuçtur.
- Adsorpsiyon çalışmalarında gözlemlendiği gibi, L-aspartik asit ile modifiye edilmiş mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek – kabuk silika partikülleri, modifiye edilmemiş partiküllerin aksine HA'ya karşı bir afinite sergiledi.
- Seçicilik çalışmaları, *E. coli* lizat çözeltilerinden HA'nın ortalama %9'luk bir adsorpsiyon kaybı ile seçici olarak ayrıldığını gösterdi. Lizat çözeltilerindeki diğer moleküllerin hidrofobik etkileşim bölgelerinin varlığı bu kayba yol açtığı düşünüldü. Lizat çözeltisindeki diğer moleküllerle karşılaştırıldığında HA'nın afinite etkileşimi, rekabetçi davranış sergileyerek adsorpsiyon miktarının daha da azalmasını engellemiş oldu.
- Beş döngü adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmasından sonra mod-SiO₂@P1 partikülleri için adsorpsiyon kapasitesi %6,3'lük bir azalmayla 24,22 mg/g olarak korundu. Öte yandan beş döngü adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmasından sonra mod-SiO₂@P2 partikülleri için adsorpsiyon kapasitesi %8,6'lık bir azalmayla 58,36 mg/g olarak korundu.
- Kararlılık testlerinde, hyaluronik asit ile mod-SiO₂@P1 çekirdek-kabuk silika partikülleri arasındaki etkileşimin kararlı olduğu bulundu ve 5 günün sonunda adsorpsiyon kapasitesinde %8,9'luk bir azalma ile 23,55 mg/g olarak gözlemlendi. Bununla birlikte hyaluronik asit ile mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk silika partikülleri arasındaki etkileşimin de aynı şekilde kararlı olduğu bulundu ve 5 günün sonunda adsorpsiyon kapasitesinde %10,2'lik bir azalma ile 57,48 mg/g olarak hesaplandı.
- Sürekli sistem deneylerinde hem sulu çözeltiden hem de lizat içerisinden hyaluronik asit adsorpsiyonunda, adsorpsiyon kapasitesi kesikli sistem deneylerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bunun nedeni de akışla birlikte kütle transfer katsayısının artması olarak düşünüldü.

- Sürekli sistem deneylerinde akış hızı arttıkça adsorpsiyon kapasitesinde düşme meydana geldiği görüldü. Bunun nedeni de akış hızının artmasıyla birlikte hyaluronik asidin L-aspartik asitle etkileşecek yeterli alan ve zamanı bulamamasıdır. Böylece etkileşime giremeyen hyaluronik asit moleküllerinin kolondan hızlı bir şekilde çıktığı belirlendi.
- Hesaplanan sonuçlara göre, Freundlich modeli Langmuir modeline göre daha düşük bir korelasyon katsayısına sahiptir. Sonuçlar, adsorpsiyon işleminin, ligandlara adsorplanan analit molekülleri arasında yanıl etkileşim olmaksızın, yüzeyin homojen bir tek tabaka kaplaması yoluyla gerçekleştiğini ve erişilebilirlik açısından enerjik olarak eşdeğer olduğunu ortaya koydu.
- mod-SiO₂@P1 ve mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk silika partikülleri üzerindeki HA adsorpsiyonunun kinetiği, ikinci dereceden kinetik model varsayımları ile iyi uyum sağladı. Sonuçlar, HA adsorpsiyon işlemi sırasında ihmal edilebilir bir difüzyon sınırlaması olduğunu ve işlemin kemisorpsiyon adımı tarafından kontrol edildiğini gösterdi.
- Desorpsiyon ajanı eklenmediğinde adsorpsiyon kinetiği hızlı, ancak desorpsiyon kinetiği yavaştır. Bu durum, HA ile modifiye edilmiş çekirdek-kabuk silika partikülleri arasındaki etkileşimlerin kararlı olduğunu gösteren bir parametredir.
- mod-SiO₂@P2 çekirdek-kabuk silika partikülleri üzerindeki HA adsorpsiyonun doğrulama çalışmaları için HPLC sistemi kullanıldı.
- İncelene HPLC kromatogramlarında hyaluronik asitin 2,5'inci dakikada gelen net bir pike sahip olduğu belirlendi. Standard hyaluronik asit pikine baktığımızda ana pik dışında 3. dakika ve 7 – 7,5 dakika aralarında gelen küçük piklerin safsızlık piki olduğu düşünülmüştür. 0 – 500 ppm arasında

kalibrasyon eğrisi çizildi ve miktar tayini için bu eğriye ait denklem kullanıldı. 500 ppm'in üstündeki derişimlerde çözeltinin viskozitesi arttığı için kolonun ayırım gücü ve etkileşim mekanizması yeterli gelmeyerek genişleyen pikler alındı. Bu tarz yüksek derişimlerde çalışılmak istenilirse SEC veya GPC sistemleri bu sistemlere uygun kolonlar kullanılması gerekmektedir.

- Lizat çözeltisi içerisinde farklı moleküllerin olduğu HPLC sisteminde görüldü fakat bu moleküllerin hangi moleküller olduğu üzerine bir çalışma yapılmadı. Lizat çözeltisi içerisinde hyaluronik asitin net bir şekilde görülmesi bekleniliyordu ve bu sonuca da ulaşıldı. Lizat içerisindeki sürekli sistem çalışmalarında hyaluronik asitin %37,22'lik bir verim ile mod-SiO₂@P2 partiküllerine bağlandığı gözlemlenmişti. HPLC çalışmalarıyla ise bu oranın %35,5 olduğu belirlendi. %4,6 lık bir hata payı ile çalışma doğrulanmış oldu. Bu hata payı ihmal edilebilir seviyelerdedir.
- Lizat içermeyen sürekli sistemde mod-SiO₂@P2 partiküllerine %45,5 verim ile bağlandığı gözlenen hyaluronik asit desorbe edilerek HPLC kromatogramı incelendi. Lizat içermeyen çözeltide mod-SiO₂@P2 partiküllerinden desorbe edilen hyaluronik asitin HPLC kromatogramıyla 85 ppm derişimde olduğu bulundu. Normalde bulunması gereken değerden %7 lik bir farkla sonuca ulaşıldı. Bu hata payı ihmal edilebilir seviyedir.
- Sentezlenen silika çekirdek – kabuk hibrit partiküller daha az atık üreten ve maliyet etkin olan bir sentez süreci ile yeşil kimyayı destekler özelliktedir.
- Sonuç olarak, yeni nesil çekirdek-kabuk silika partikülleri, hidrofilik etkileşim kromatografisi ve yalancı-spesifik ligand katkıları ile sulu çözeltilerden ve/veya bakteriyal ortamdaki HA'yı seçmek için verimli bir şekilde kullanılabilecek alternatif bir afinite malzemesi olarak tasarlandı.
- Sentezlenen partiküllerin boyutunun arttırılmasıyla birlikte bir ön ayrıştıma ürünü olarak kullanılarak ayırmada maliyetleri düşürülebilir. Bununla birlikte

bu çalışmada yer alan ortalama 5 µm'lik partiküller kromatografi kolonu içerisinde doldurularak saflaştırma için de kullanılabileceği değerlendirilmiştir.



6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Sze, J.H., Brownlie, J.C., Love, C.A., Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *Biotech*, (2016) p. 96.
- [2] Boeriu, C.G., Springer, J., Kooy, F.K., van den Broek, L.A.M., Eggink, G., Production method of Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (2013) p. 1
- [3] Vázquez et al. *Microbial Cell Factories* (2010), 9:46
- [4] Lapcik, L.Jr., Lapcik, L., Hyaluronan: Preparation, structure, properties and applications. *Chem. Rev.*, (1998) 8: 2624–2684.
- [5] Cowman, M.K., Mendichi, R., Methods for determination of hyaluronan molecular weight. In: *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Elsevier. (2004) 41–55
- [6] Anadere, I., Chimiel, H., Laschner, W., Viscoelasticity of normal and pathological synovial-fluid. *Biorheol.* (1979) 16: 179–184
- [7] Lee, H.G., Cowman, M.K., An agarose-gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular-weight distribution. *Anal. Biochem.* (1994) 219: 278–28
- [8] Hong, M., Sudor, J., Stefansson M., Novotny, M.V., High resolution studies of hyaluronic acid mixtures through capillary gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, (1998) 70: 568–573. 20
- [9] Orvisky, E., Soltes, L., Chabreck, P., Novak, I., Kery, V., Stancikova, M., Vins, I., The determination of hyaluronan molecular-weight distribution by means of high-performance size exclusion chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* (1992) 15: 3203–3218
- [10] Iqbal, Z., Midgley, J.M., Watson, D.G., Karditsas, S.D., Dutton, G.N., Wilson, W., Determination of molecular weight of hyaluronic acid in bovine vitreous humour and healon by high performance gel permeation chromatography and its depolymerization with ascorbic acid. *Pharm. World Sci.*, (1997) 19: 246–250
- [11] Huber, U., “Solutions for preparative HPLC – Application Compendium”, Agilent Technologies Application Compendium 5989-5948EN, 2006
- [12] Aglamaz, M.D., Antibiyotiklerin Moleküler Baskılama Yöntemi İle Sıvı Kromatografi Sisteminde Ayırımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2017.

- [13] Song, E-H., Shang, J., and Ratner, D.M., University of Washington, Seattle, WA, USA, **2012**.
- [14] Gong, H., Li, W., Sun, J., Jia, L., Guan, Q., Guo, Y., Wang, Y., A review on plant polysaccharide based on drug delivery system for construction and application, with emphasis on traditional Chinese medicine polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 211, **2022**, pp. 711-728
- [15] Chen, H.; Jia, Y.; Guo, Q. Polysaccharides and Polysaccharide Complexes as Potential Sources of Antidiabetic Compounds: A Review. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 1st ed.; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2021**; Volume 67, pp. 199–220.
- [16] Pérez, S.; Bertoft, E. The Molecular Structures of Starch Components and Their Contribution to the Architecture of Starch Granules: A Comprehensive Review. *Starch/Staerke* **2010**, 62, 389–420.
- [17] Esa, F.; Tasirin, S.M.; Rahman, N.A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2014**, 2, 113–119.
- [18] Esa, F.; Tasirin, S.M.; Rahman, N.A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2014**, 2, 113–119.
- [19] Flutto, L. Pectin: Properties and Determination. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed.; Caballero, B., Ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, **2003**; pp. 4440–4449.
- [20] Aires da Silva, D.; Melo Aires, G.C.; da Silva Pena, R. Gums—Characteristics and Applications in the Food Industry. In *Innovation in the Food Sector through the Valorization of Food and Agro-Food By-Products*; Novo de Barros, A., Gouvinhas, I., Eds.; Intech Open: London, UK, **2021**; pp. 1–24.
- [21] Usman, A.; Khalid, S.; Usman, A.; Hussain, Z.; Wang, Y. Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook. In *Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Materials Science*; Zia, K.M., Zuber, M., Ali, M., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2017**; pp. 115–153.
- [22] Kraan, S. Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook. In *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*; Chang, C.-F., Ed.; IntechOpen: London, UK, **2012**; pp. 489–532.

- [23] BeMiller, J.N. Carrageenans. In *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, 3rd ed.; BeMiller, J.N., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2019**; pp. 279–291.
- [24] Sousa, A.M.M., Rocha, C.M.R., Gonçalves, M.P. Agar. In *Handbook of Hydrocolloids*, Phillips, G.O., Williams, P.A., Eds., Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, **2021**; pp. 731–765. ISBN 9780128201046.
- [25] Thomas, N.V., Kim, S.K., Fucoidans from Marine Algae as Potential Matrix Metalloproteinase Inhibitors. In *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st ed.; Kim, S.-K., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2014**; Volume 72, pp. 177–193. ISBN 9780128002698
- [26] Angra, V., Sehgal, R., Kaur, M., Gupta, R., Commercialization of Bionanocomposites. In *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; Ahmed, S., Annu, Eds.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, **2021**; pp. 587–610. ISBN 9780128212806.
- [27] Radoor, S., Karayil, J., Jayakumar, A., Radhakrishnan, E.K., Parameswaranpillai, J., Siengchin, S., Alginate-Based Bionanocomposites in Wound Dressings. In *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; Ahmed, S., Annu, Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2021**; pp. 351–375. ISBN 9780128212806.
- [28] Zhao, W., Liu, W., Li, J., Lin, X., Wang, Y., Preparation of Animal Polysaccharides Nanofibers by Electrospinning and Their Potential Biomedical Applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2015**, *103*, 807–818.
- [29] Li, Q., Niu, Y., Xing, P., Wang, C., Bioactive Polysaccharides from Natural Resources Including Chinese Medicinal Herbs on Tissue Repair. *Chin. Med.* **2018**, *13*, 7.
- [30] Daraghmeh, N.H., Chowdhry, B.Z., Leharne, S.A., Al Omari, M.M., Badwan, A.A. Chitin. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2011**; Volume 36, pp. 35–102. ISBN 9780123876676.
- [31] Rinaudo, M., Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632.
- [32] Jiang, T., James, R., Kumbar, S.G., Laurencin, C.T., Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 1st ed.; Kumbar, S.G., Laurencin, C.T., Deng, M., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2014**; pp. 91–113. ISBN 9780123969835.

- [33] Kuo, J.-W., Prestwich, G.D., Hyaluronic Acid. In *Comprehensive Biomaterials*; Ducheyne, P., Ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, **2011**; Volume 2, pp. 239–259. ISBN 9780080552941.
- [34] Aronson, J.K., Hyaluronic Acid. In *Meyler's Side Effects of Drugs*, 6th ed.; Aronson, J.K., Ed.; Elsevier B.V.: Amsterdam, The Netherlands, **2016**; pp. 862–863. ISBN 9780444537164.
- [35] Kaur, R., Panwar, D., Panesar, P.S., Biotechnological Approach for Valorization of Whey for Value-Added Products. In *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, 2nd ed.; Kosseva, M.R., Webb, C., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2020**; pp. 275–302. ISBN 9780128171219.
- [36] Díaz-Montes, E., Yáñez-Fernández, J., Castro-Muñoz, R. Characterization of Oligodextran Produced by *Leuconostoc Mesenteroides* SF3 and Its Effect on Film-Forming Properties of Chitosan. *Mater. Today Commun.* **2021**, 28, 102487.
- [37] Díaz-Montes, E. Dextran: Sources, Structures, and Properties. *Polysaccharides* **2021**, 2, 554–565.
- [38] BeMiller, J.N., Hydrocolloids. In *Gluten-Free Cereal Products and Beverages-Food Science and Technology*; Arendt, E.K., Dal Bello, F., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2008**; pp. 203–215. ISBN 9780123737397.
- [39] Bhat, I.M., Wani, S.M., Mir, S.A., Masoodi, F.A., Advances in Xanthan Gum Production, Modifications and Its Applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, 42, 102328.
- [40] Kirtel, O., Avşar, G., Erkorkmaz, B.A., Öner, E.T., Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. In *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*; Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2017**; pp. 347–383. ISBN 9780128115206.
- [41] Giavasis, I., Bioactive Fungal Polysaccharides as Potential Functional Ingredients in Food and Nutraceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, 26, 162–173.
- [42] Xiao, Z., Zhou, W., Zhang, Y., Fungal Polysaccharides. In *Advances in Pharmacology*; Du, G., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2020**; Volume 87, pp. 277–299. ISBN 9780128201855.

- [43] Park, J.K., Khan, T., Other Microbial Polysaccharides: Pullulan, Scleroglucan, Elsinan, Levan, Alternant, Dextran. In Handbook of Hydrocolloids, 2nd ed.; Phillips, G.O., Williams, P.A., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, **2009**; pp. 592–614. ISBN 9781845694142.
- [44] Mudgil, D., The Interaction between Insoluble and Soluble Fiber. In Dietary Fiber for Prevention of Cardiovascular Disease—Fibers's Interaction Between Gut Microflora, Sugar Metabolism, Weight Control and Cardiovascular Health; Samaan, R.A., Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2017**; pp. 35–59. ISBN 9780128051306.
- [45] Douglas, C.M., Fungal $\beta(1,3)$ -D-Glucan Synthesis. *Med. Mycol. Suppl.* **2001**, 39, 55–66.
- [46] Pierre, G., Delattre, C., Laroche, C., Michaud, P., Galactans and Its Applications. In Polysaccharides; Ramawat, G., Mérillon, J.M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, **2021**; pp. 1–37. ISBN 9783319037516.
- [47] Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tseganidis, T., Karousou, E., Theocharis, A.D., Pavão, M.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* **2012** Apr;279(7):1177-97.
- [48] Raman, R., Sasisekharan, V., Sasisekharan, R., Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol.* **2005** Mar;12(3):267-77.
- [49] Prydz, K., Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules.* **2015** Aug 21;5(3):2003-22.
- [50] Boeriu, C.G., Springer, J., Kooy, F.K., van den Broek, L.A.M., Eggink, G., Production method of Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (**2013**) p. 1
- [51] Ghiselli, G., Drug-Mediated Regulation of Glycosaminoglycan Biosynthesis. *Med Res Rev.* **2017** Sep;37(5):1051-1094.
- [52] Casale, J., Jonathan, S.C., Biochemistry, Glycosaminoglycans Treasure Island (FL): [StatPearls Publishing](#); **2024**

- [53] Volpi, N., Maccari, F., Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie*, (**2003**). 85: 619–625
- [54] Yang, P.-F., Lee, C.-K, Hyaluronic acid interaction with chitosanconjugated magnetic particles and its purification. *Biochem.* (**2007**) 33: 284–289
- [55] Boeriu, C.G., Springer. J., Kooy, F.K., van den Broek, L.A.M., Eggink, G., Production method of Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (**2013**) p. 6
- [56] Rangaswamy, V., Jain, D., An Efficient Process for Production and Purification of Hyaluronic Acid From *Streptococcus Equi* Subsp. *Zooepidemicus*, *Biotechnol Lett* (**2008**) 30: 493-496
- [57] Wang, M., et al., Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using NaYF₄: Yb, Er upconversion nanoparticles. *ACS nano*, **2009**. 3(6): p. 1580-1586
- [58] Holmstromand, B., Ricica, J., “Production of hyaluronic acid by a Streptococcal strain in batch culture, ”*Applied Environmental Microbiology*,vol.15,no.6,pp. 1409–1413,**1967**.
- [59] Chong, B.F., Blank, L.M., Mclaughlin, R., and Nielsen, L.K., “Microbial hyaluronic acid production,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.66,no.4,pp.341–351,**2005**
- [60] Armstrong, D.C., Cooney, M.J., and Johns, M.R., “Growthand amino acid requirements of hyaluronic-acid producing *Streptococcus zooepidemicus*, ”*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.47,no.3,pp.309–312,**1997**.
- [61] Huang, W.C., Chen, S.J., and Chen, T.L., “The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 32, no. 3, pp.239–243,**2006**
- [62] Mende, M., Bednarek, C., Wawryszyn, M., Sauter, P., Biskup, M.B., Schepers, U., Bräse, S., Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. *Chem Rev.* **2016** Jul 27;116(14):8193-255.
- [63] Neuman, M.G., Nanau, R.M., Oruña-Sanchez, L., Coto, G., Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* **2015**;18(1):53-60.
- [64] Bukhari, S.N.A., Roswandi, N.L., Waqas, M., Habib, H., Hussain, F., Khan, S., Sohail, M., Ramli, N.A., Thu, H.E., Hussain, Z., Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and

pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol.* **2018** Dec;120(Pt B):1682-1695.

- [65] Sze, J.Z., Brownlie, J.C., Love, C.A., Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *Biotech*, (**2016**) 6:67
- [66] Allison, D.D., Grande-Allen, K.J., Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Eng.*, (**2006**) 12:2131–2140
- [67] Fagien, S., Cassuto, D., Reconstituted injectable hyaluronic acid: expanded applications in facial aesthetics and additional thoughts on the mechanism of action in cosmetic medicine. *Plast Reconstr Surg*, (**2012**) 130:208–217
- [68] Tammi, R.H., Kultti, A., Kosma, V.M., Prinen, R., Auvinen, P., Tammi, M.I., Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol*, (**2008**) 18:288–295
- [69] Stern, R., Asari, A.A., Saguhara, K.N., Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, (**2006**) vol. 85, no. 8, pp. 699–715
- [70] Garg, G., and Hales, C.A., *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Elsevier, **2004**.
- [71] Meyer, K., and Palmer, J.W., “The polysaccharide of the vitreous humor,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 107, no. 3, pp. 629–634, **1934**.
- [72] Boeriu, C.G., Springer, J., Kooy, F.K., van der Broek, L.A.M., Eggink, G., *Production Methods For Hyaluronan*. Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Article ID 624967, 14 pages, **2013**.
- [73] Weissmann, B., and Meyer, K., “The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 76, no. 7, pp. 1753–1757, **1954**.
- [74] Balazs, E.A., “Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof,” U.S. Patent, US4141973, **1979**.
- [75] DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J., and Weigel, P.H., “Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 26, pp. 19181–19184, **1993**.

- [76] DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J., and Weigel, P.H., "Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 20, pp. 14568–14571, **1993**.

- [77] Blatter, G., Jacquinet, J.C., "The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-D-glucopyranose derivatives in syntheses of hyaluronic acid-related tetra-, hexa-, and octa-saccharides having amethyl β -D-glucopyranosiduronic acid at the reducing end," *Carbohydrate Research*, vol. 288, pp. 109–125, **1996**.

- [78] DeAngelis, P.L., Oatman, L.C., Gay, D.F., "Rapid chemoenzymatic synthesis of monodisperse hyaluronan oligosaccharides with immobilized enzyme reactors," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 37, pp. 35199–35203, **2003**.

- [79] Kooy, F.K., *Enzymatic Production of Hyaluronan Oligo- and Polysaccharides*, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, **2010**.

- [80] Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., *Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives Microb Cell Fact*, **2011**

- [81] Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med* 242:27–33, **1997**.

- [82] Boeriu, C.G., Springer, J., Kooy, F.K., Van Den Broek, L.A.M., Eggink, G., *Production methods for hyaluronan. Int J Carbohydr Chem* **2013**:1–14

- [83] Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R.V., Wainwright, N., Childs, A., Miller, R.J., *Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidemicus rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord Biomacromolecules* 5:2122–2127, **2004**.

- [84] Deangelis, P.L., Papaconstantinou, J., Weigel, P.H., *Isolation of a Streptococcus pyogenes gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. Biol Chem* 268:14568–14571, **1993**.

- [85] Deangelis, P.L., Jing, W., Drake, R.R., Achyuthan, A.M., Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J Biol Chem* 273:8454–8458, **1998**.
- [86] Weigel, P.H., Functional characteristics and catalytic mechanism of the bacterial hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54:201–211, **2002**.
- [87] Wessels, M.R., Moses, A.E., Goldberg, J.B., Dicesare, T.J., Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group streptococci. *Proc Natl Acad Sci* 88:8317–8321, **1991**.
- [88] Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P.L., Weigel, P.H., Brown, S., Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Env Microbiol* 71:3747–3752, **2005**.
- [89] Mao, Z., Shin, H.D., Chen, R., A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:63–69, **2009**.
- [90] Siiskonen, H., Oikari, S., Pasonen-Seppanen, S., Rilla, K.; Hyaluronan Synthase 1: A Mysterious Enzyme with Unexpected Functions. *Frontiers in Immunology*. **2015**; 6: 43.
- [91] Jing, W., Deangelis, P.L., Synchronized chemoenzymatic synthesis of monodisperse hyaluronan polymers. *J Biol Chem* 279:42345–42349, **2004**.
- [92] Wang, Y., Zhang, J., Liu, H., Separation and Purification of Hyaluronic Acid From Fermentation Broth. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*, pp 1523 – 1530. **2013**.
- [93] Alpert, A.J., *J Chromatogr A* 499:177–196, **1990**.
- [94] Hemström, P., Irgum, K., *J Sep Sci* 29:1784–1821, **2006**.
- [95] Oyler, A.R., Armstrong, B.L., Cha, J.Y., Zhou, M.X., Yang, Q., Robinson, R.I., Dunphy, R., Burinsky, D.J., *J Chromatogr A* 724:378–383. **1996**.
- [96] Guo, Y., Gaiki, S., *J Chromatogr A* 1074:71–80, **2005**.
- [97] Cavazzini, A., Felinger, A., *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, Chapter 5, Fundamentals and Instrumentation, Liquid Chromatography*, page 105 – 109, **2013**.

- [98] Hemström, P., Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography J Sep Sci, 29 **2006**, pp. 1784-1821
- [99] Jandera, P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts J Sep Sci, 31 **2008**, pp. 1421-143
- [100] Guo, Y., Gaiki, S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography J Chromatogr A, 1074, **2005**, pp. 71 – 80
- [101] Bicker, W., Wu, J., Lämmerhofer, M., Lindner, W., Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings J Sep Sci, **2008**, pp. 2971-2987
- [102] Dejaegher, B., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., Method development for HILIC assays J Sep Sci, **2008**, pp. 1438-1448
- [103] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) J Sep Sci, **2008**, pp. 1449-1464
- [104] Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S., Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment Chromatographia, **2007**, pp. 223-229
- [105] Bicker, W., Wu, J., Lämmerhofer, M., Lindner, W., Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings J Sep Sci, **2008**, pp. 2971-2987
- [106] Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography J Chromatogr A, **2008**, pp. 474-503
- [107] McCalley, D.V., Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? J Chromatogr A, **2007**, pp. 46-55
- [108] Yang, Y., Boysen, R.I., Hearn, M.T.W., J. Chromatogr. A, **2009**, p. 5518
- [109] McClintic, C., Remick, D.M., Peterson, J.A., Risley, D.S., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., **2003**, p. 3093

- [110] Jiang, W., Zwitterionic separation materials for liquid chromatography and capillary electrophoresis, Thesis, Umea University, Umea, **2003**,
- [111] Takegawa, Y., Deguchi, K., Ito, H., Keira, T., Nakagawa, H., Nishimura, S., J. Sep. Sci., **2006**, p. 2533
- [112] Jiang, W., Fischer, G., Girmay, Y., Irgum, K., J. Chromatogr. A, **2006**, p. 82
- [113] Andrew, J., Alpert Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography Journal of Chromatography A, **2018**, 45–53
- [114] Monica Dolci, Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: Some Aspects of Solvent and Column Selectivity, technical note 20544, **2018**.
- [115] Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D., Chromatographia, **2010**, p. 751
- [116] Li, J., Carr, P. W., Anal. Chem. 1997, 69, 837 – 843, **1997**
- [117] Li, J., Carr, P. W., Anal. Chem. **1997**, 69, 2202 – 2206.
- [118] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), J. Sep. Sci. **2008**, 31, 1449 – 1464
- [119] Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H., J. Chromatogr. A **2005**, 1092, 246 – 249.
- [120] Alpert, A.J., Shukla, M., Shukla, A.K., Zieske, L.R., et al., J. Chromatogr. A **1994**, 676, 191 – 202.
- [121] Scott, R.P.W., Adv. Chromatogr. **1982**, 20, 169 – 187.
- [122] Guillarme, D., Heinisch, S., Sep. Purif. Rev. **2005**, 34, 181 – 216.
- [123] Fekete, S., Oláh, E., Fekete, J., J. Chromatogr. A, **2012**, p. 57
- [124] Macnair, J.E., Lewis, K.C., Jorgenson, J.W., Anal. Chem. **1997**, 983.
- [125] Unger, K.K., Skudas, R., Schulte, M.M., J. Chromatogr. A 1184, **2008**, 393.

- [126] Kirkland, J.J., Modern Practice of Liquid Chromatography J. Wiley, New York **1971**
- [127] Parrish, J.R., Nature, 207, **1965**, p. 402
- [128] Knox, J.H., Anal. Chem., 38, **1966**, p. 253
- [129] Horváth, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R., Anal. Chem., 39, **1967**, p. 1422
- [130] Horváth, C., Lipsky, S.R., J. Chromatogr. Sci., 7, **1969**, p. 109
- [131] Kirkland, J.J., J. Chromatogr. Sci., 7, **1969**, p. 7
- [132] Kirkland, J.J., Anal. Chem., 41, **1969**, p. 218
- [133] Kirkland, J.J., US patent 3,505,785, **1969**.
- [134] Halasz, I., Naefe, M., Anal. Chem., 44, **1972**, p. 76
- [135] Halasz, I., Englehardt, H., Asshauer, J., Karger, B.L., Anal. Chem., 42, **1970**, p. 1460
- [136] Jelinek, L., Dong, P., Rojas-Pajos, C., Taïbi, H., E. sz Kovats Langmuir, 8, **1992**, p. 2152
- [137] Guiochona, G., Gritti, F., J. Chromatogr. A 1218, **2011**, 1915.
- [138] Brice, R.W., Zhang, X., Colón, L.A., J. Sep. Sci. 32, **2009**, 2723
- [139] Wu, N., Clausen, A.W., J. Sep. Sci. 30, **2007**, 1167.
- [140] van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J., Klinkenberg, A., Chem. Eng. Sci. 5, **1956** 271.
- [141] Blue, L.E., Jorgenson, J.W., J. Chromatogr. A 1218 (**2011**) 7989.
- [142] Omamogho, J.O, Hanrahan, J.P., Tobin, J., Glennon, J.D., J. Chromatogr. A 1218(**2011**) 1942.
- [143] Chaudhuri, R.G., Paria, S., Chem. Rev. 112 (**2012**) 2373.

- [144] Rocca, J.D., Liu, D., Lin, W., *Acc. Chem. Res.* 44 (**2011**) 957.
- [145] Ling, D., Hyeon, T., *Small* 9 (**2013**) 1450.
- [146] Tong, W., Song, X., Cao, C., *Chem. Soc. Rev.* 41 (**2012**) 6103.
- [147] DeStefano, J.J., Schuster, S.A., Lawhorn, J.M., Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A* 1258(**2012**) 76.
- [148] Schuster, S.A, Boyes, B.E., Wagner, B.M., Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A* 1228(**2012**) 232.
- [149] Schuster, S.A., Wagner, B.M., Boyes, B.E., Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A* 1315(**2013**) 118.
- [150] Moraes, J., Ohno, K., Maschmeyer, T., Perrier, S., *Chem. Mater.* 25 (**2013**) 3522.
- [151] Li, G.L., Möhwald, H., Shchukin, D.G., *Chem. Soc. Rev.* 42 (**2013**) 3628.
- [152] Sorribas, S., Zornoza, B., Téllez, C., Coronas, J., *Chem. Commun.* 48 (**2012**) 9388.
- [153] Ahmed, A., Forster, M., Clowes, R., Bradshaw, D., Myers, P., Zhang, H., Mater, J., *Chem. A* 1 (**2013**) 3276.
- [154] Sun, J.Y., Wang, Z.K., Lim, H.S., Ng, S.C., Kuok, M.H., Tran, T.T., Liu, X., *ACS Nano* 4(**2010**) 7692.
- [155] Stober, W., Fink, A., Bohn, E.J., *J. Colloid Interface Sci.* 26 (**1968**) 62.
- [156] Wu, S., Mou, C., Lin, H., *Chem. Soc. Rev.* 42 (**2013**) 3862.
- [157] Graf, C., Vossen, D.L.J., Imhof, A., van Blaaderen, A., *Langmuir* 19 (**2003**) 6693.
- [158] Li, W., Zhao, D., *Adv. Mater.* 25 (**2013**) 142.
- [159] Hu, F., Chen, S., Yuan, R., *Sens. Actuators B* 176 (**2013**) 713.
- [160] Fuertes, A.B., Valle-Vigón, P., Sevilla, M., *Chem. Commun.* 48 (**2012**) 6124.

- [161] Wang, W., Zhang, M., Chu, L., Acc. Chem. Res. 47 (**2014**) 373.
- [162] Park, J.I., Saffari, A., Kumar, S., Günther, A., Kumacheva, E., Annu. Rev. Mater. Res.40 (**2010**) 415.
- [163] Wang, J., Wang, J., Han, J., Small 7 (**2011**) 1728
- [164] Kim, J.H., Jeon, T.Y., Choi, T.M., Shim, T.S., Kim, S.H., Yang, S.M., Langmuir 30(**2014**) 1473.
- [165] Leinweber, F.C., Tallarek, U., J. Chromatogr. A, 1006 (**2003**), p. 207
- [166] Hong, J., Han, H., Hong, C.K., Shim S.E., A Direct Preparation of Silica Shell on Polystyrene Microspheres Prepared by Dispersion Polymerization with Polyvinylpyrrolidone. Published online in Wiley InterScience (**2008**), 10.1002/pola.22624
- [167] Wang, H., Cheng, F., Shen, W., Cheng, G., Zhao, J., Peng, W., Qu, J., Amino acid-based anti-fouling functionalization of silica nanoparticles using divinyl sulfone. Acta Biomaterialia, (**2016**) 273-281
- [168] Uzun, L., Say, R., Denizli, A., **2005**, Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, React. Funct. Polym., 64, 93-102.
- [169] Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A., Denizli, A., **2005**. Antibody Purification Using Porous Metal-Chelated Monolithic Columns, J. Appl. Polym. Sci., 101, 395-404.
- [170] Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A., **2005**, Synthesis of Phenylalanine-Containing Hydrophobic Beads for Lysozyme Adsorption, Ind. Eng. Chem. Res., 44, 7049-7056
- [171] Zhu, X., Alexandratos, SD., Polystyrene-supported amines: Affinity for mercury(II) as a function of the pendant groups and the Hg(II) counterion. Ind. Eng. Chem. Res., **2005**;44:8605-8610
- [172] Casey, T.J., Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering, John Wiley and Sons Ltd, England, **1997**, pp. 113-114
- [173] Krinsky N., Kaduri M., Shainsky-Roitman J., Goldfeder M., Ivanir E., Benhar I., Shoham Y., Schroeder A.: A Simple and Rapid Method for Preparing a Cell-Free Bacterial Lysate for Protein Synthesis. Plos One (**2016**) 10.1371/journal.pone.0165137

EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar



Research Article

Development of L-Aspartic Acid Decorated Core/Shell Silica Particles for Adsorption of Hyaluronic Acid

Deniz Aglamaz, Bengi Ozgun Ozturk✉, Lokman Uzun✉

First published: 07 August 2024 | <https://doi.org/10.1002/slct.202401363>

Abstract: In this study, core/shell-structured mesoporous hybrid silica gel particles were synthesized for the selective adsorption of hyaluronic acid. A non-ionic amphiphilic polymer core consisting of poly(methyl methacrylate) and poly(ethylene glycol) blocks were coated with SiO₂ using the Stöber method in the presence of non-ionic and cationic surfactants to obtain mesoporous core-shell silica particles. The surface of silica particles was functionalized through modification of L-aspartic acid to improve their affinity against the targeted analyte, hyaluronic acid. Physico-chemical methods including Fourier transform infrared spectroscopy, thermal gravimetric analysis, zeta-size measurements, and transmission- and scanning-electron microscopies were utilized to evaluate the properties of core-silica particles. The surface functionalized core/shell particles have an average size of 254.7 (±33.1) nm as confirmed by TEM analysis. The hyaluronic acid adsorption performance of the modified core-shell silica particles was optimized through varying pH, concentration, temperature, and contact time parameters. Thermodynamic parameters were estimated by applying adsorption isotherm and kinetics models to assess the favorability of the adsorption process. The models revealed that the hyaluronic acid adsorption processes follow monolayer adsorption (Langmuir model) and chemisorption (pseudo-second-order kinetics) processes.

Introduction

The biological function of hyaluronic acid (HA) and its use in specific applications are related to its molecular weight [1]. Hyaluronic acid is a biodegradable polymer that is preferred in biomedical, pharmaceutical and cosmetic products due to its high moisture retention and viscoelastic properties [2]. HA, a linear

10kDa) is preferred in ophthalmology, orthopedics, tissue engineering, and cosmetics [8,9]. On the other hand, low molecular weight (around 5 kDa or less) HA is used as an agent for inhibition of angiogenesis and tumor progression [10]. In addition, HA having medium molecular weight (5 kDa – 10 kDa) is used as a wound dressing [11]. HA is produced by extraction method from cattle eye, umbilical cord, and amaranth of animal origin. The therapeutic use of biochemical in humans which are isolated from animals can trigger the formation of different cross-viral and unexpected infections [12]. Due to these disadvantages, recent studies have focused on the production of microbial HA. Obtaining microbial HA from a Streptococcal strain is an alternative approach in which the produced bacteria is non-immunogenic and highly suitable for medical use [13]. However, HA produced by the bacterial fermentation process shows no uniform molecular weight distribution, therefore limiting its usage in different applications. As mentioned before, pharmaceutical and cosmetic use is directly related to the molecular weight distribution of HA [14,15]. Therefore, viscometry [16], gel electrophoresis [17], capillary electrophoresis [18], and chromatographic methods [19,20] should be used to determine the molecular weight distribution of HA derivatives. For this purpose, different columns as a stationary phase are used in chromatography systems, especially in HPLC systems.

The purification and selective adsorption of hyaluronic acid are usually accomplished through electrophoretic and chromatographic techniques [21]. Functional support materials such as silicon oxide, amine or carboxylic acid terminated self-assembled monolayer on gold surfaces [22]. Glucuronic acid imprinted poly acrylamide cryogels are used for the separation and purification of hyaluronic acid [23]. Later on, the same