

1. GİRİŞ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) uygulamalarında, ayırmanın gerçekleştirildiği kolonlarda dolgu materyali olarak silika veya polimerik yapıda mikropartiküller kullanılmaktadır. HPLC uygulamalarının birçok türünde (iyon değişim sıvı kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, normal faz sıvı kromatografisi, afinite sıvı kromatografisi, ters faz sıvı kromatografisi) farklı polaritede kolonlara ihtiyaç vardır. Kolon polaritesi alıkonma süresi, analiz süresi, kolonda spesifik olmayan etkileşimler ve desorpsiyon davranışı üzerinde etkilidir. Son yıllarda özellikle polimerik yapıda olan HPLC kolon materyalleri üzerindeki araştırma çalışmaları yoğunlaşmıştır. Polimerik partiküllerin silika bazlı olanlara göre belirgin avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenme kolaylığı, partikülün türevlendirme proseslerinin daha çeşitli ve kolay olması, geniş pH aralığında stabil olabilme gibi avantajlara sahip olmasından dolayı araştırmalar polimerik partiküller üzerinde yoğunlaşmıştır.

1990'lerden beri polimer bazlı eş-boyutlu ve gözenekli partiküller, alternatif kolon dolgu materyali olarak gösterilmektedir. Literatürde eş boyutlu polimerik partiküllerin üretimi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu tür partiküller öncelikle boyutları 1-20 mikron arasında değişen gözenekli ve gözeneksiz eş boyutlu formda Ugelstad ve arkadaşları tarafından aktiflendirilmiş şişirme metodu adı verilen yöntemle üretilmiştir (Ugelstad, 1978; Ugelstad et al., 1979). Ardından bu partiküller, Frechet ve grubunun öncü çalışmaları ile HPLC uygulamalarına uygun olacak şekilde sentezlenmiştir (Galia et al., 1994; Wang et al., 1994; Smigol and Svec., 1992a; 1993a). Bu grup tarafından geliştirilen çok basamaklı polimerizasyon yöntemi ile 7.4 mikron boyutunda (S-DVB) partiküllerin sentezi yapılmıştır (Galia et al., 1994; Wang et al., 1994). Aynı grup tarafından geliştirilen eş boyutlu ve reaktif poli(glisidil metakrilat-etilen glikol dimetakrilat) partiküller bir başka önemli kolon dolgu materyalidir (Smigol and Svec, 1992b; 1993b; Smigol et al., 1994a; 1994b). Ayrıca poli(hidroksimetakrilat) ve poli(klorometilstiren) bazlı eş boyutlu partiküller de bu grup tarafından sentezlenmiştir (Liang et al., 1995; Lewandowski et al., 1998). Bu çalışmaların sonucunda elde edilen

7-10 mikron ortalama partikül boyutundaki dolgu materyalleri, ters faz ve normal faz kromatografisinde başarıyla kullanılmıştır.

Ticari olarak üretilen polimerik kolon dolgu materyalleri, 1 ile 10 µm arasında değişen ortalama boyuta ve farklı gözenek yapısına sahip partiküllerdir. Ancak kromatografik performans açısından henüz istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Günümüzde genellikle ticari olarak üretilen HPLC kolonları polidispers (boy dağılımlı) formda üretilen ve dolayısı ile belirli bir boy dağılımına sahip gözenekli partiküllerden oluşmaktadır. Bu durum kolonların kromatografik performanslarını düşürmektedir. Polidispers partiküller ile hazırlanmış HPLC kolonlarında monodispers formda partiküller içeren kolonlara göre daha düşük çözünürlük değerleri (ardışık piklerin birbirinden ayrılma ölçüsünü gösteren parametre) ve teorik tabaka sayısı değerleri elde edilmiştir (Elingsen et al., 1990; Wang et al., 1994; Galia et al., 1994; Svec et al., 1996). Özellikle 1990'lı yıllardan itibaren HPLC uygulamalarında "yeni nesil kolon materyali olarak, monodispers yapıdaki gözenekli partiküllerin kullanımı gündeme gelmiştir. Yeni nesil kromatografik dolgu materyalleri olarak tanımlanan monodispers gözenekli partiküller varlığında ise, kolonda oluşan düzenli akış profili nedeniyle yüksek kromatografik ayırma yeteneği elde edilebilmektedir. Bu partiküllerin üretim yöntemi genellikle "çok basamaklı polimerizasyon" adı altında toplanmaktadır (Elingsen et al., 1990; Wang et al., 1994; Galia et al., 1994; Svec et al., 1996). Bu küreler farklı fonksiyonel gruplar içerecek şekilde sentezlenebilmektedirler.

Tarafımızdan yürütülen ve yaklaşık on yıllık bir süreci kapsayan çalışmalar sonrasında, 3 ile 10 µm aralığında ortalama boy değerine sahip monodispers ve gözenekli polimerik partiküllerin, farklı boyut, gözenek yapısı ve polariteye sahip olacak şekilde üretim yöntemleri geliştirilmiştir (Tuncel, 1999; Tuncel et al., 1999; Çamlı, 1999; 2004; Unsal et al, 2004a-e). Çalışmalarımızda eş boyutlu ve gözenekli partiküllerin sentezi için mevcut basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi modifiye edilerek 7 µm ortalama partikül boyutunun altında partiküllerin sentezi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde gerekli büyüklükte ve uygun molekül ağırlığına sahip (PS) partiküller çıkış lateksi olarak kullanılmıştır (Tuncel, 1999). Bu yöntemde diğer yöntemlere göre daha az şişme basamağı bulunmaktadır

(Tuncel, 1999; Tuncel et al., 1999). Bu partiküller büyüklükçe ayırma kromatografisi ve ters faz sıvı kromatografisi uygulamalarında başarıyla kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında ise iyon değişim kromatografisi için monodispers-gözenekli partikül bazlı ve polimerik ligand taşıyan yeni bir taşıyıcının üretim yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile anyonik formda HPLC kolon materyalleri elde edilmiştir. Sentezin ilk basamağında poli(glisidil metakrilat-etilen dimetakrilat) partiküller çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Takip eden basamakta, partiküller üzerindeki epoksi grupları asidik hidroliz ile hidroksil gruplarına dönüştürülmüştür. Trimetoksisilil-propilmetakrilat (TMSPM) monomerinin hidroksil grupları ile reaksiyona sokulması ile yüzeylerinde kovalent bağlı vinil grupları içeren monodispers-gözenekli partiküller elde edilmiştir. Bir sonraki basamakta, partikülleri içeren organik ortamda yürütülen polimerizasyonlar ile iyonize grupları içeren monomer, partikül yüzeyine graflanmıştır. Partiküller üzerinde polimerik ligand oluşturmak için monomer olarak Akrlamido metil propansülfonik asit kullanılmış ve kromatografik davranışa etkisi incelenmiştir. Performans testlerinde pH, akış hızı ve gradiyent süresi değiştirilerek bu değişimlerin kromatografik performansa etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Mikron boyutunda monodispers polimerik partiküllerin üretimi için kullanılan dispersiyon polimerizasyonu, monomerin organik bir dağıtma ortamı içerisinde çözünmesi ile yürütülen bir polimerizasyon yöntemidir (Corner,1981; Almong ve Levy, 1982; Cawse, 1997). Bu polimerizasyon yöntemi ile 1-10 μm aralığında eşboyutlu polimerik partiküller elde edilebilmektedir. Bu yöntemde kullanılan başlatıcı, monomer fazı içinde çözünebilir özelliğine sahiptir. Başlangıçta tek fazlı olan polimerizasyon sistemi, katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı sıvı yapıya ulaşmaktadır. Günümüze kadar değişik başlatıcılar, monomer ve dağıtma sistemleri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda;

- Başlatıcı türü ve derişimi
- Dağıtma ortamı türü ve derişimi
- Stabilizör türü ve derişimi
- Monomer/dağıtma ortamı oranı
- Polimerizasyon sıcaklığı
- Karıştırma hızı ve türü

sonuç partikül boy ve boy dağılımı, molekül ağırlığı ve monomer dönüşümü üzerinde etkili faktörler olarak belirlenmiştir.

Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan başlatıcılar monomer fazında çözünebilmektedir. Polimerizasyon sisteminde başlatıcı miktarının artırılması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında artış olduğu saptanmıştır. Başlatıcı derişiminin artırılması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalinin oluşmasıyla açıklanmaktadır (Ober and

Hair,1987; Tuncel et al., 1993). Elde edilen polimerin molekül ağırlığında ise artan başlatıcı miktarı ile belirgin bir azalma gözlenmiştir. Molekül ağırlığındaki bu azalma daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısalması ile açıklanmaktadır (Ober and Hair, 1987; Tuncel et al.,1993).

Dispersiyon polimerizasyonunda ortalama boy ve boy dağılımını etkileyen bir diğer önemli parametre dağıtma ortamı türü ve bileşimidir. Dispersiyon polimerizasyonunda temel amaç, mümkün olduğunca dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Kullanılan dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü sonuç partiküllerinin boyutunu ve boy dağılımını önemli ölçüde etkiler. İdeal olarak seçilen bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, oluşan polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenir (Paine et al.,1990; Cawse,1997). Artan monomer/dağıtma ortamı oranı ile ortalama partikül boyutu genelde artış gösterir. Ancak bu oranın aşırı artışı ile sonuç partiküller de önemli oranda boy dağılımı meydana gelmektedir (Lok and Ober,1985).

Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde dağıtma ortamında çözülebilen ve genellikle polimerik yapıda olan stabilizörler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda stabilizör derişiminin arttırılması ile elde edilen polimerik partiküllerin boylarının azaldığı gözlenmiştir (Paine et al.,1990; Cawse,1997).

Dispersiyon polimerizasyonuna sıcaklığın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda 55- 80 °C aralığında artan polimerizasyon sıcaklığı ile ortalama partikül boyutu ve boy dağılımında artış olduğu gözlenmiştir. Artan sıcaklık değerlerinin meydana gelen polimerin molekül ağırlığında önemli bir azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (Ober and Hair,1985). Dispersiyon polimerizasyonu sistemlerinde genelde düşük karıştırma hızları ile çalışılmaktadır. Özellikle monodispers partiküllerin eldesine yönelik çalışmalarda karıştırma hızı, polimerizasyon ortamında homojen bir ısı transfer rejimi elde edilebilecek düzeyde tutulur. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde monodispers özelliğın bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olur.

2.2. Fonksiyonel Gruplu Monodispers Partikül Sentezi

Eş boyutlu polimerik partiküllerin yüzeyinde fonksiyonel grupların varlığı partiküllerin türevlendirilmesini gerektiren uygulamalarda, örneğin ligand bağlanması veya biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için gereklidir. Genel olarak inert polimerik yüzeyleri türevlendirmek zordur. Literatürde eş boyutlu ve fonksiyonel polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili çeşitli kopolimerizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Bu partiküllerin sentezi genellikle stiren gibi hidrofobik ve apolar bir monomer ile fonksiyonel grup içeren polar bir komonomerin kopolimerizasyonu ile gerçekleşir. Bu tip kopolimerizasyonlarda genellikle akrilat bazlı fonksiyonel komonomerler kullanılmaktadır. Karboksil, hidroksil, amin, amid, aldehit veya klorometil fonksiyonel grupları sonuç ürünün monodispersitesi korunarak polimerik kürelerin yüzeyine bağlanabilir (Tseng et al., 1986; Smigol et al.,1992c; Smigol et al.,1993b; Tuncel et al., 1994; Çamlı et al., 2002). Kopolimerizasyon metodunun seçiminde monomer ve komonomerin polaritesi ve reaktivitesi önemli rol oynar.

Dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak stiren monomeri çeşitli fonksiyonel monomerler ile kopolimerize edilmiştir. Bu polimerizasyonlarda etanol dağıtma ortamı, azobisisobütironitril ve polivinilpirolidon sırasıyla başlatıcı ve stabilizör olarak kullanılmıştır (Tseng et al., 1986). Bu komonomerlere örnek olarak; metil metakrilat, metakrilik asit, akrilamid, hidroksietilakrilat, dimetilaminoetilmetakrilat ve polidimetilsiloksan verilebilir. Böylece tek basamaklı proses ile 2.4-3.7 µm boyut aralığında eş boyutlu mikroküreler elde edilmiştir. Sonuçlar partiküllerin ortalama boy ve boy dağılımının komonomer türü ile değiştiğini göstermiştir. Bu sonuç partikül oluşum basamağında komonomer ile stiren arasındaki ikincil stabilizör oluşumuyla açıklanmıştır.

Başka bir çalışmada çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile monodispers makrogözenekli ve fonksiyonel gruplar taşıyan partiküller üretilmiştir (Çamlı et al., 2002). Bu yöntemde lineer polistiren dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Monodispers özellikteki çıkış lateksi fonksiyonel komonomer, monomer ve başlatıcı içeren bir organik faz ile oda sıcaklığında ve emülsiyon ortamında şişirilmektedir. Bu basamakta monodispersitenin korunması için organik

faz/çıkış partikülü oranı yeterince düşük tutulmalıdır. İkinci basamakta şişmiş durumda olan çıkış partiküllerinin içerisinde fonksiyonel gruba sahip komonomerin polimerizasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu basamakta kopolimerizasyon reaksiyonu sırasında yeni partikül oluşumuna izin verilmez ve sonuç ürünün monodispersitesi korunmuş olur. Polimerizasyon sırasında fonksiyonel gruba sahip monomerin mikroküre yapısına girdiği saptanmıştır. Burada kullanılan fonksiyonel monomerin su içindeki çözünürlüğü azaldıkça elde edilen partiküllerin gözenek boyutunda da bir azalma olduğu gözlenmiştir.

2.3. Monodispers Gözenekli Partikül Eldesine Yönelik Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Yöntemleri

Büyük boyutlu ve çapraz bağlı formda gözenekli monodispers polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili ilk çalışmalar Ugelstad tarafından yapılmıştır (Ellingsen et al, 1990). Bu çalışmada 1-100 µm boyut aralığındaki gözenekli eşboyutlu partiküller, stirenin emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Elde edilen polistiren partiküller ilk önce dodesil klorür ya da dibütilftalat gibi düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan ile şişirilmiştir. İkinci basamak şişirme prosesi monomer ve çapraz bağlayıcı içeren monomer faz emülsiyonunda yapılmıştır. Polimerizasyon 80°C'de ve Na₂S₂O₈'in başlatıcı olarak kullanıldığı ortamda gerçekleştirilmiştir. İnert organik bileşen ve monomer fazında şişirilen polistiren partikül yapısı içinde polimerizasyon gerçekleştirilerek ortalama boyutu 5 µm olan monodispers partiküller elde edilmiştir.

Monodispers ve makrogözenekli formda partikül sentezine yönelik çok basamaklı polimerizasyon yöntemlerinden biri de Cheng ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Cheng et al. ,1992b). Bu yöntem dört temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Monodispers çıkış lateksinin sentezi
2. Lateksin porojen ve monomer karışımıyla şişirilmesi
3. Monomer karışımının şişmiş yapıdaki partiküller içerisinde polimerizasyonu
4. Elde edilen yapının polistiren için iyi bir çözücü olarak bilinen bir çözücüyle

ekstraksiyonu ile stabil gözenek yapısının elde edilmesi

Bu yöntemde 8.7 μm boyutunda çok basamaklı emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen polistiren partiküller, monodispers makrogözenekli partiküllerin eldesi amacıyla çıkış materyali olarak seçilmiştir. Birinci basamakta çıkış lateksi, stiren, divinilbenzen ve n-heptan içeren organik faz ile sulu emülsiyon ortamında şişirilmiştir. 2,2-azobis-2-metilbütironitril bu organik fazda çözülerek, ikinci kademe polimerizasyonunda başlatıcı olarak kullanılmıştır. Organik fazın sulu ortamda dağıtılması amacıyla, polivinilprolidon, aerosol-MA ve Polywet KX-3 dağıtıcılarını içeren bir emülsiyon yapıcı madde sistemi kullanılmıştır. Partiküllerin ikinci basamak polimerizasyonu sonucunda kremleşmeleri ve koagüle olmalarını engellemek için şişirme oranı düşük tutulmuştur. Oda sıcaklığında ve çalkalamalı sistemde gerçekleştirilen organik faz ile şişirme işlemini ikinci basamak polimerizasyon işlemi takip etmiştir. Polimerizasyon, azot atmosferinde ve 70°C sıcaklıkta yapılmıştır. Monodispers polimerik partiküller, metilen klorür ile ekstrakte edilerek gözenekli formda elde edilmiştir.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen gözenekli yapının oluşumu şu şekilde açıklanmıştır (Cheng et al., 1992a). İlk basamakta stiren, divinilbenzen ve inert diluent ile partiküller şişirilmiştir. Ancak divinilbenzen stirene göre reaktivite oranı daha yüksek bir monomerdur. Bu nedenle divinilbenzenin polimerizasyonu stiren polimerizasyonuna göre daha hızlı olmaktadır. Polimerizasyon sırasında inert diluent içerisinde yavaş gerçekleşmekte olan lineer polistiren oluşumu yanında, daha hızlı olarak çapraz bağlanma derecesi yüksek ve ağırlıklı olarak divinilbenzen içeren zincirler meydana gelmektedir. Bu çapraz bağlı zincirlerin yoğunluğunun artması ile birlikte partiküller, içinde buldukları diluent ortamında giderek çözünmez hale gelmektedir. Bu durum şişmiş durumdaki partikül yapısı içinde kopolimerce ve diluentçe zengin olmak üzere iki ayrı fazın oluşmasına neden olmaktadır. Şişmiş durumdaki partiküllerde büyüyen çapraz bağlı zincirlerden dolayı ilk aşamada agregasyon oluşmakta ve böylece diluent ortamından faz ayrılması başlamaktadır. Bu işlem oluşan agregatların diluent ortamı içerisinde jel formunda küçük mikroküreler oluşturmasıyla devam etmektedir. İlerleyen dönüşümle birlikte, oluşan çapraz

bağlanma derecesi yüksek mikroküreler, diluent ve lineer polistireni içeren partiküller içerisinde sabit hale gelmektedir. Bu aşamada monovinil içeriği daha yüksek olan polimer zincirleri oluşmakta ve bu zincirler çapraz bağ yoğunluğu yüksek mikrokürelerin birbirlerine bağlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, küçük mikroküreler arasındaki boşluklar diluent ve lineer polistiren tarafından doldurulmakta ve bu yapı oluşan gözenekli matrisin temelini teşkil etmektedir. Ekstarksiyon ile inert diluent ve lineer polistiren uzaklaştırılması sonucunda makrogözenekli yapı elde edilmektedir.

İki basamaklı polimerizasyon yöntemi kullanılarak monodispers ve büyük boyutlu partiküllerin çapraz bağlı formda eldesi amacıyla bir diğer yöntem Okubo ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Okubo ve Nagakawa,1992). Dinamik şişme yöntemi adı verilen bu yöntemle dispersiyon polimerizasyonu ile 1.9 µm boyutunda monodispers polistiren partiküller üretilmiştir. Partiküllerin şişirilmesi sulu ortamda başlatıcı içeren divinilbenzen ile yapılmıştır. İşlem homojen formda olan ve divinilbenzen içeren etanol-su ortamında başlamaktadır. Şişirme ortamına bir enjeksiyon pompası kullanılarak sürekli olarak sabit hızla su beslemesi yapılmaktadır. Böylece dağıtma ortamının polaritesi zamanla artırılmaktadır. Divinilbenzenin dağıtma ortamından ayrılarak monodispers partiküllerin geçişi sağlanmaktadır. Dinamik şişme yönteminde su besleme hızı ayarlanarak monodispersite korunmak suretiyle partiküllerin divinilbenzenle şişmeleri sağlanmaktadır. Şişirme işlemi sonrasında ikinci basamak polimerizasyonunda divinilbenzen partiküller içinde polimerleştirilmekte ve 4.3 µm boyutunda ve çapraz bağlı partiküller elde edilmektedir. Başlatıcı olarak benzoil peroksit ve stabilizör olarak polivinil alkol kullanılmaktadır. Polimerizasyon 70°C sıcaklıkta 24 saat süreyle ve çalkalamalı reaktörlerde gerçekleştirilmektedir.

Kromatografik uygulamaya yönelik makrogözenekli monodispers partiküllerin sentezi için bir başka yöntem de Frechet ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (Wang et al., 1994; Galia et al., 1994). Bu yöntemde 1.1 µm boyutundaki monodispers polistiren çıkış partikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile üretilmiştir. İki basamaktan oluşan bu yöntemde, çıkış partikülleri ilk basamakta lauril sülfat içeren sulu ortamda emülsifiye edilmiş dibütil ftalat ile oda sıcaklığında şişirilir. İkinci basamak şişirme işleminde ise öncelikle hacimce %50 stiren ve %50 divinilbenzen içeren monomer karışımı dibütil

ftalat ile birlikte yine lauril sülfatın sulu çözeltisinde dağıtılır. Bu monomer karışımının içerisinde repolimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit de vardır. İlk basamak şişme işleminde elde edilen ve dibütil ftalat içeren polimerik partiküller ikinci basamakta hazırlanan emülsiyon ile tekrar oda sıcaklığında etkileştirilir. Organik fazın tamamının partiküllere transfer olmasının ardından elde edilen süspansiyon ortamına stabilizör olarak polivinil alkol ve ikinci basamak polimerizasyonunda yeni partikül oluşumunu engellemek için suda çözünen inhibitör olarak sodyum nitrat eklenmiştir. Monomer karışımının diluent varlığında partiküller içinde polimerizasyonu ile 7.4 µm boyutundaki monodispers partiküller çapraz bağlı formda sentezlenmiştir. Partiküller toluen ile ekstrakte edilmiş ve gözenekli yapının oluşması sağlanmıştır.

Sentezlenen monodispers makrogözenekli partiküllerin monodispersitesini ölçmek için sayıca ortalama partikül çapları ve standart sapma değerleri denklem 2.1. ve 2.2.'de sırasıyla verilmektedir. Değişim katsayısı (Coefficient of Variation, CV) değerleri de eşitlik 2.3.'de gösterilen formül ile hesaplanmaktadır.

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (2.1.)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (D_i - D_n)^2}{(\sum N_i - 1)}} \quad (2.2.)$$

$$\% CV = SD / D_n \quad (2.3.)$$

Burada;

D_n ; sayıca ortalama partikül çapı, SD ; standart sapma, CV ; değişim katsayısı, N_i ; partikül sayısı, D_i ; i no'lu partikül çapını ifade etmektedir.

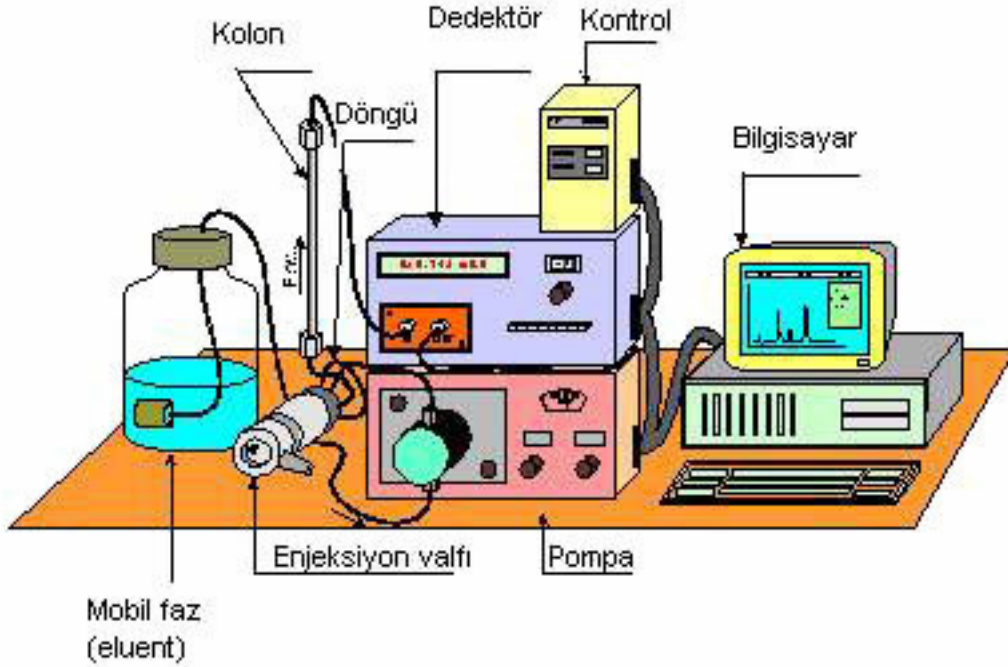
2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. Bu yöntemlerden biri olan sıvı kromatografisi, 1900'lü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımın kolay ve hızlı bir şekilde

bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir yöntemdir (LC Applications). Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı (analitler), yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi (resolution parameter), analitler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır ve önemlidir. Sabit faz, kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Analitler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir.

2.4.1. HPLC Sistemleri

HPLC sistemi, Şekil 2.1'de de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır.



Şekil 2.1. Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

2.4.2. Sürekli Faz

HPLC uygulamalarında sürekli faz (eluent) türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde birçok sürekli faz kullanılmasına rağmen ve bunların bazı ortak özellikleri şunlardır:

- 1 Yüksek derecede saflık
- 2 Dedektör ile uyumluluk
- 3 Düşük viskozite
- 4 Örneği çözebilme
- 5 Kimyasal açıdan inert olması
- 6 Uygun fiyat

Her bir HPLC türünde kullanılan sürekli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücüler sürekli faz olarak kullanılır. Büyüklükçe ayırma kromatografisinde (Size-exclusion Chromatography, SEC) ise kullanılan çözücü polimer örneğini çözebilmeli ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir.

2.4.3. Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır (Chromatography, 1995; SGE Chromatography Products, 2001):

- 1 3- 10 µm partikül boyutu
- 2 Olabildiğince eşboyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı

3 70- 300 Å gözenek boyutu

4 50- 250 m²/g yüzey alanı

5 Yüzeğe tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C8, C18, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da katyon (-COO⁻) değiştirici yapıda olabilir.

2.4.4. Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolon içerisine doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan partiküllerin boyutu küçüldükçe uygulanan basıncın da arttırılması gerekmektedir. Ancak küçük partiküller yüksek çözünürlük, hızlı analiz ve yüksek örnek yükleme kapasitesi gibi bir takım avantajlara da sahiptir. Kararlı akış hızı pompalarda aranan bir özelliktir. Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- 0.01- 10 ml/dak arasında akış hızı
- % 1' den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı. Bu akış hızı kararlılığı büyüklükçe ayırma kromatografisinde % 0,2' den az olmalıdır.
- 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değeri

2.4.5. Kolon

Tipik HPLC kolonları 5, 10, 15, ve 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3, 5 veya 10 µm) ve iç çapı 4, 4.6 ya da 7.8 mm olan yüksek basınçta dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu HPLC kullanıcıasına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir.

2.4.6. Dedektör

Günümüzde kromatografik sistemlerde yaygın olarak kullanılan dedektör tipi optik dedektörlerdir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorpsiyonundan, floresans emisyonundan ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır.

Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190 nm'den 460- 600 nm'ye kadar olan dalgaboylarında örneğin analizinin yapılması mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometrik (mass-spectrometric, MS) dedektörler bulunmaktadır. RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI'ya göre daha hassas ancak daha seçici dedektörlerdir. MS dedektörleri ise çok hassas, güçlü ancak pahalı ve karmaşık sistemlerdir.

İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek duyarlılık
- Hızlı tepki
- Düşük sinyal gürültüsü
- Minimum pik yayılması
- Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı
- Çalışma kolalığı ve genişliği

2.4.7. Sinyal Gürültüsü ve Sapma

Sinyal gürültüsü, elektrik sinyalindeki düzensizlik, dedektör lambasındaki kararsızlık ve sıcaklıktaki değişimlerden dolayı, izlenen kromatogramın temel çizgisinde kısa

zamanlı küçük piklerin oluşmasıdır. Bu pikler özellikle eser miktar analizi yapılıyorsa örneğin verdiği pikler ile karıştırılmamalıdır. Dedektör sinyalindeki düzensizlik de aynı zamanda temel çizgide sapmaya neden olur. Bu nedenle sürekli faz, dedektör, yukarıdaki etkilerden kaynaklanan sinyalleri vermeyene kadar kolondan geçirilmeye devam edilir. Diğer bir değişle analizde kullanılacak sürekli faz, kolondan geçirilerek temel çizginin oturtulması sağlanır. Böylece analiz sırasında yalnızca örnekten kaynaklanan sinyaller bilgisayara iletilir.

2.4.8. HPLC Türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma prosesine göre yapılırsa, HPLC 4 farklı türde incelenebilir.

1.Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), sürekli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

2.Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):

Normal faz kromatografisinin tam tersidir. Sabit faz apolar (hidrofobik), sürekli faz ise su ve asetonitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar.

3.Büyükçüce Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):

Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler molekül büyüklüklerine göre kolondan filtre edilirler. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntem jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

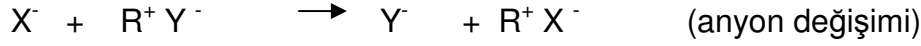
4. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şeklinde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Mobil faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik şiddet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır.

2.4.9. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC)

İyon değişim kromatografisi, modern sıvı kromatografi yöntemleriyle geniş bir biçimde kullanılan sıvı kromatografi yöntemlerinden ilkidir. Otomasyon sistemli, yüksek çözünürlüklü iyon değişim kromatografisi 1960 yılından itibaren amino asit analizlerinde kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik yüzlerce farklı fizyolojik bileşiğin (ör: üre ve serum) 10- 70 saat arası süren analizlerinde kullanılmak üzere kapsamı genişlemiştir. Aynı tarihlerde protein karışımlarının analizinde ve ayrılmasında iyon değişim kromatografisi yöntemleri biyokimyasal platformda çok önem taşıyordu. Buna karşın yakın zamana kadar iyon değişim kromatografisi ile yapılan protein analizi geleneksel düşük basınç sıvı kromatografisi yöntemlerine göre yapılmıştır. 1960 'lı yılların sonlarından itibaren sıvı kromatografisindeki devrim ile nükleik asit ve bazlar, nükleositler ve zar kaplamalı (peliküler) iyon değiştiricilerde nükleotitlerin ayrılması ve analizi gerçekleşmiştir. Bazı çeşitli pratik sebeplerden dolayı diğer kromatografik yöntemlere göre daha az kullanışlı olan iyon değişim kromatografisi, son zamanlarda iyon çifti kromatografisinin gelişimiyle bazı geleneksel kullanım alanlarını kaybetmektedir. Buna karşın bazı ayırma problemleri iyon değişim kromatografisini hala geçerli kılmaktadır. Yeni nesil kolon dolgu materyalleriyle birlikte yüksek molekül ağırlıklı iyonik örneklerin ayrılmasıyla iyon değişim kromatografisine yeni olanaklar sunulmaktadır.

İyon değişim kromatografisi fonksiyonel grup taşıyan dolgu materyalleriyle yürütülür. Genel tutunma mekanizması sabit fazdaki yüklü gruplar R ile mobil fazdaki Y iyonları ile örneğe ait X iyonları arasındaki basit iyon değişimidir.



Anyon değişim kromatografisi için, X^- rnek iyonu mobil fazdaki Y^- iyonu ile iyon değiştirici zerindeki R^+ iyonik bölgeleri için rekabete girer. Aynı Şekilde kasyon değişim kromatografisinde X^+ rnek kasyonları mobil fazdaki Y^+ iyonu ile iyon değiştirici zerindeki R^- iyonik bölgeleri için yarışır. İyon değiştiriciyle mobil faz varlığında zayıf bir etkileşime giren örnek iyonları kolonda zayıf bir Şekilde tutunup, çabuk olarak elüsyona uğrar. Daha kuvvetli etkileşime giren örnek ise daha geç bir sürede kolondan çıkar.

İyon değişim kromatografisi bazı durumlarda iyonik bileşenleri ayırmada kullanılsada genellikle organik asit ve bazların yani uygun pH'ta iyon durumundaki bileşenleri ayırır.



Asit ve bazların İyon değişim kromatografisi sisteminde iyonlaşması mobil fazın pH'ının değişimiyle ayarlanabilir. pH'taki artış asitlerin iyonlaşmasını arttırırken bazların azaltır ve pH değişimindeki azalım durumu tersine çevirir. İyonlaşmadaki artış her durum için örneğin tutulma süresini arttırır. Sıvı kromatografisinde birçok iyon değiştirici, fonksiyonel grup içeren polimerik sabit fazdan oluşur. (kasyon değiştiriciler için $-SO_3$ grubu ve anyon değiştiriciler için $-N(CH_3)^{+3}$ grubu) Diğer dolgular ise silika yüzeyine organik bağlayıcılar ile tutunmuş fonksiyonel gruplardır.

Her iki durumda iyon değiştirici tarafından tutunma işlemi iki sıralı prosesin sonucu sayılabilir :

1. rnek bileşenlerinin mobil faz ve sabit faz arasında dağılımı
2. İyonik bölgelerle sabit faz arasındaki reaksiyon

rnek tutulumu, her iki prosese'de bağlıdır ve ayırma kontrolü her iki prosesi ayrı etkileyen deneysel faktörler bağlamında anlaşılabilir. İyon değişim kromatografisinde örneğin dağılım ve ayırımı mobil ve sabit fazda var olduğu için, iyonik olmayan bileşenler bile iyon değişim kromatografisi kolonlarında tutulup ayrılabilir.

2.4.9.1. Dolgu Materyalleri

Birçok farklı iyon değiştirici dolgu maddesi, iyon değişim kromatografisinde kullanılmaktadır. Protein gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılan yumuşak materyallerden inorganik iyon ve küçük moleküllerin ayrılmasında kullanılan katı maddelere kadar iyon değişim kromatografisi uygulamalarında aşağıdaki şekillerde kolon dolgusu kullanılır.

- Gözenekli polimerik partiküller (geleneksel iyon değiştirici reğineler)
- Kimyasal yollu bağlı silika bazlı filmsi partiküller (Bonded-Phase Pellicular particules)
- Kimyasal yollu bağlı silika bazlı gözenekli partiküller (Bonded-Phase Porous particules)

Geçmişte,gözenekli polimerik partiküller, amino asit, peptit ve karbonhidratların ayrılmasında geniş biçimde kullanılmıştır. Bu dolgular 10µm çapında, mikrogözenekli, PS –DVB kopolimeri formunda ve fonksiyonel iyonik grubu taşımaktadır. Yakın zamana kadar, iyonik fonksiyonel grubun yokluğunda tüm sabit fazlar hidrofobik temelde olmuştur. (PS, silikon).Protein, nükleik asit ve diğer büyük moleküllerin bu tür iyon değişim kromatografisinde kullanımında çeşitli bilinen problemler vermiştir. Daha yakın zamanda iri gözenekli silika partikülleriyle hidrofilik kaplamalar, büyük moleküllerin iyon değişim kromatografisinde hızlı biçimde ayrılmasına olanak sağlamıştır.

Modern iyon değişim dolgu materyalleri, çeşitli partikül boyutlarında, şeklinde ve fonksiyonlarda bulunur. Birçok farklı iyonik değiştirici iyon değiştiricilerde kullanılır, fakat genelde uygulamalar sülfonat veya trialkil amonyum grupları ile olur. Bu güçlü anyon ve katyon değiştiriciler sırasıyla SCX (güçlü katyon değiştirici) veya SAX (güçlü anyon değiştirici) etiketini taşır. Bazen zayıf anyon ve katyon değiştirici olarak (COO-) karboksilat veya amin (NH₃) kullanılır. Diğer yer değiştirici gruplar sıvı kromatografisinde önemli kullanım alanı henüz bulamamıştır.

Tamamı polimerik olan iyon değiştiriciler suyu içine çekerler ve sulu mobil faz varlığında şişerler. Bağlı şişme gözenekliliğin ve büyük moleküller için iyon değişirme kapasitesinin bir göstergesidir. şişmenin büyümesi ile gözenekler büyür ve daha büyük örnek molekülleri partikül içine girer ve iyon değişimi gerçekteşir. şişmenin

derecesi eklenen çapraz bağlayıcı DVB miktarına bağlıdır ve yüksek konsantrasyonlarda daha katı partikül oluşumu ve böylece daha az şişmeye yol açar. Aynı zamanda partikül dayanıklılığı DVB miktarının artışıyla artar. Geleneksel polimerik iyon değiştiriciler 4-12% DVB içerir ve % 8 çapraz bağlı partiküller en bilinendir.

Bağıl örnek tutulumu ve maksimum örnek boyutu kolon dolgu materyalinin iyon değiştirme kapasitesinin artmasıyla artar. Bu partikül içindeki ölçülebilir (titre edilebilir) R^{\pm} iyonik gruplarına bağlıdır, fakat pH'larda değişir. Dolayısıyla düşük pH'da proton eklenmesiyle katyon değiştiriciler nötralize olurlar.



Yüksek pH'da aynı şekilde anyon değiştiriciler baz ile nötralize olurlar.



Kuvvetli katyon değiştiricilerin iyon değiştirme kapasitesi düşük pH'da sıfıra düşeceği için bu dolgular pH 1'in altında kullanılamazlar. Zayıf katyon değiştiriciler pH 6'nın üzerinde kullanılamazlar. Benzer şekilde güçlü anyon değiştiriciler sadece pH 1'in altında çalışırken, zayıf anyon değiştiriciler pH 8 ve altındaki değerlerle sınırlandırılmıştır. Bu etkiler pH'ın uç noktalarında H^+ ve OH^- iyonlarının artan rekabetinin örnek iyonları uzaklaştırmasıyla açıklanır. Çizelge 2.1 de yaygın olarak kullanılan iyon değiştirici grupları görülmektedir.

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan iyon değiştirici grupları ve bunların fonksiyonel grupları ile karşı iyonları

İyonik Grup	pH Aralığı	Fonksiyonel Grup	Karşı İyon
Zayıf Anyon Değiştiriciler			
Aminoetil(AE)	2- 9	-OCH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Cl ⁻
Dietilaminoetil(DEAE)	2- 9	-OCH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₂ CH ₃) ₂	Cl ⁻
Kuvvetli Anyon İyon Değiştirici			
Kuaterner aminoetil(QAE)	2- 10	OCH ₂ CH ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₃	Cl ⁻
Zayıf Katyon Değiştirici			
Karboksimetil(CM)	3- 10	-OCH ₂ COO ⁻	Na ⁺
Kuvvetli Katyon değiştirici			
Sülfopropil(SP)	2- 12	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	Na ⁺

Bu şekilden görüleceği gibi kuvvetli iyon değiştiriciler zayıf iyon değiştiricilere göre daha geniş bir pH aralığında kullanılabilir, bu da kuvvetli değiştiricilerin bilinirliğinin sebebini verir. Sonuçta geniş bir aralıkta kuvvetli değiştiricilerde bileşikler ayrılabilir ve daha fazla bileşik basit pH gradyent elüsyonunda ayrılabilir.

2.4.9.2.MOBİL FAZ

İyon değişim kromatografisinde kullanılacak mobil faz :

- 1.İyon değişirmede kullanılacak çeşitli tuz ve tamponlara yeterli çözünürlüğü sağlamak,
- 2.Uygun çözücü kuvveti kullanımıyla ürün tutunmasını sağlamak
- 3.Spesifik uygulama için ayırma seçiciliğinin sağlanması için seçilir.

İyon değişim kromatografisi ayırmaları genellikle mobil faz olarak sulu tuz çözeltilerinin kullanımıyla gerçekteşir. Mobil faz genellikle tampon haline getirilir.

Çizelge 2. 2. Katyon Değişim Kromatografisi Tampon Çözeltileri

TAMPON	KONSANTRASYON	KATYON	pKa	Tampon aralığı
Format	20 mM	Na ⁺	3.75	3.3-4.3
Asetat	20 mM	Na ⁺	4.76	4.2-5.2
Mes	20 mM	Na ⁺	6.15	5.5-6.7
Fosfat	20 mM	Na ⁺	2.1/7.2	2.0-7.6
Hepes	20 mM	Na ⁺	7.55	7.6-8.2

Çözücü kuvveti ve seçiciliği tampon iyonları ve diğer tuzların çeşidi ve konsantrasyonuna, pH'a ve eklenen organik çözeltilerin çeşidi ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ürün tutulmasının anlaşılması iyon değişim kromatografisinde diğer sıvı kromatografi metodlarına göre daha zordur, ve bilinen tüm kurallara aykırı durumlar olabilir. Yinede tutunma, iki prosesin sonucu olarak açıklanabilir:

Sulu hareketli faz ve sabit faz arasında ürün dağılımının, iyon çifti oluşumu tarafından izlenmesi. Tutunma işleminde iyon çifti oluşumu daha önemli bir prosestir. Mobil fazdaki iyonik kuvvetin ürün tutunmasına olan etkisini düşünülürse pH sabit tutularak tampon çözeltinin konsantrasyonu değiştirilebilir. Eğer tampon çözeltisinin konsantrasyonunda artış istenmiyorsa daha fazla miktarda tuz eklenebilir. Her iki durumda çözücü kuvveti, iyonik kuvvetin artmasıyla birlikte artar.

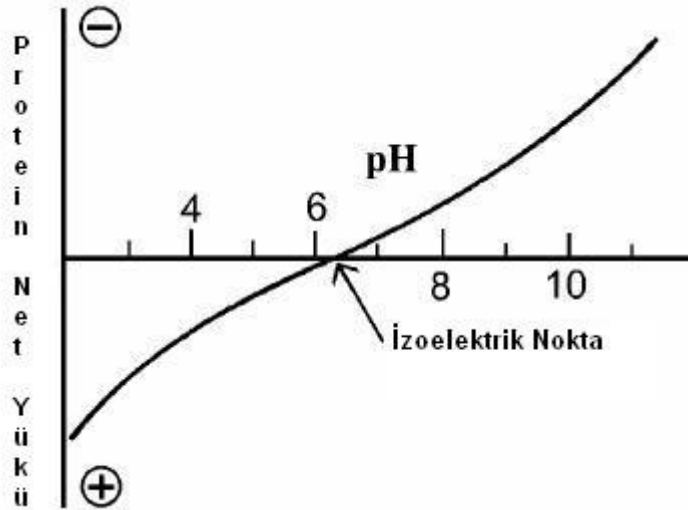
Ürün tutulumu, mobil faz pH değişimiyle de ayarlanabilir. Anyon değiştiricilerde ürün tutulumu artan pH'la artar. Fakat katyon değiştiricilerde ürün tutulumu artan pH'la azalır. pH'taki sürekli artış, tüm bazların iyonlaşmamış hale gelmesine, yani tutulmamasına yol açar. Yani pH'taki artış katyon değiştiricilerde çözücü kuvvetinin artışına eşittir. Aynı şekilde, anyon değiştiricilerde pH değerinde azalma çözücü gücündeki artmaya karşılık gelir. pH değerindeki değişimler iyon değişim kromatografisinde çözücü gücünün değişimi açısından yorumlansa da, gradyent ayırmalarda pH'taki değişimler ayırıcılıkta büyük değişimlere sebep olur.

2.4.9.3. Proteinlerin İyon Değişim Kromatografisi ile Ayrılması

Proteinler iyon değiştiricilere, zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Bağlanan proteinler ya tampon çözeltisinin iyonik gücü kademeli olarak ya da tampon çözeltisinin pH'ı kademeli olarak değiştirilmek suretiyle protein yüzeyinde etkileşen grupların yükü yok edilmek suretiyle kolondan ayrı ayrı elüe edilirler. Bütün bu işlemler sırasında iyonik değiştiricinin yükü sabit kalacak bir pH aralığı seçilmelidir. Aksi takdirde bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar.

2.4.9.3.1. Proteinlerde İzoelektrik Nokta

Proteinleri oluşturan temel yapı taşı aminoasitlerdir. Bir proteinin polipeptit zinciri üzerinde yer alan bazı amino asitler aspartik asit, glutamik asit gibi karboksil bazıları ise lizin arjinin gibi amino yan grupları taşır. Esas olarak bu grupların varlığı nedeni ile proteinler amfoterik özellik gösterirler. Proteinlerin net olarak yüksüz davrandıkları pH izoelektrik nokta olarak tanımlanır. Şekil 2.2 de proteinlerin izoelektrik noktası grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Proteinin net yükü üzerine pH etkisi

Amfoterik olan proteinlerin net yükü değişkendir. Düşük pH larda pozitif, yüksek pH larda negatif ve izoelektrik noktada (pI) ise sıfır yüklüdür. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları başlıca karboksil ve amino gruplarıdır.

HPLC’de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

- İzokratik Elüsyon: Kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.
- Gradient Elüsyonu: Sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır.

2.4.10. HPLC Kullanım Alanları

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım amaçları kimyasal ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

- Kimyasal Ayırma: HPLC’de kimyasal ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan kimyasal ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.
- Saflaştırma: Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir, bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresi herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.
- Tanımlama: Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli

bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metot kullanılmalıdır.

- Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur.

2.4.11. Alıkonma Parametreleri

Kromatografik alıkonmayı öğrenmenin en kolay yolu, örneğin kolona enjekte edildiği noktadan kolon boyunca ilerleyen bileşiğin dedektörde verdiği maksimum cevap arasındaki zamanı ölçmektir. Bu zamana alıkonma zamanı (retention time, t_R) denir. Alıkonma zamanı sürekli faz akış hızı ile ters orantılıdır. Diğeri bir parametre alıkonma hacmidir (V_R). Alıkonma hacmi, bir bileşenin kolondan çıkması için gerekli olan elüent miktarıdır. Alıkonma süresi ve sürekli faz akış hızının çarpımına eşittir. Akışkanın hızına bağlı değildir, ancak partiküllerin geometrik şekli yani gözenek büyüklüğüne bağlıdır.

2.4.12. Bant Genişliği

Bir kromatografik analiz sırasında örneğin sisteme enjekte edilmesinden sonra kolon

içindeki akışkanın hareketi sırasında kromatografik piklerin aralığı genişler. Daha büyük kolon bant genişliği, belli bir zaman aralığında daha az miktarda bileşenin ayrışması anlamına gelir. Başka bir deyişle piklerin keskinliği kolon veriminin ne kadar iyi olduğunu gösterir. Kolonda bant genişlemesi üç ana sebepten kaynaklanır.

1. Kolon içinde ilerleyen bir bileşene ait molekül veya iyonların farklı yollar izlemesi: Bu parametre sürekli fazın akış hızından bağımsızdır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması bu parametrenin etkisini azaltabilir.
2. Fazlar arasındaki kütle transferi etkisi: Bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşması için belirli bir süreye ihtiyaç vardır. Eğer akış hızı yüksekse ve örneğin kolona güçlü bir afinitesi varsa, hareketli fazdaki örnek sabit fazdaki örneğin önüne geçecektir. Bu da dengenin tam olarak kurulamamasına yani bant genişlemesine neden olacaktır. Hareketli faz viskozitesi düşürmek ve kolon sıcaklığını arttırmak bu terimin etkisini azaltabilir.
3. Kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması: Örnek konsantrasyonu kolon kenarlarında kolon merkezinde olduğundan daha düşüktür. Örnek kolon merkezinden dışarıya doğru difüzlenir. Bu etki düşük akış hızlarında daha da önem kazanır. Ayrıca bu parametre bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. Hareketli fazın akış hızını düşürmek, örneğin kolonda daha az zaman harcaması ve bu da difüzyonun daha az olması demektir. Ayrıca sıcaklığın düşürülmesi de bu etkiyi azaltıcı yönde etki yapar.

2.4.13. Kolon Verimliliği

Bir kromatografik analizde optimum bir ayırma gerçekleştirmek yani kolon verimini en üst seviyede olduğunu göstermek için keskin ve simetrik piklerin eldesi şarttır. Kolon verimliliği tayin edilirken pik genişliği, teorik tabaka sayısı, indirgenmiş plaka yüksekliği, seçicilik ve çözünürlük gibi parametreler göz önüne alınır.

- Pikin genişliği, pikin keskinliğini ve kolon verimini gösterir. Bununla beraber pik genişliği kolonun uzunluğu, akış hızı ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametreden etkilenir. Aynı kolonda yapılan analizlerde akış hızı değiştirilebilecek tek parametre olduğundan, akış hızı kolon verimliliğinin en iyi olacağı değerde seçilmelidir.
- Teorik tabaka sayısı; damıtma prosesindeki benzerlikten gelir. Kolonun hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Elde edilen kromatografik piklerin keskinliği bir kolonun verimini gösteriyorsa, bu verimin nicel ölçüsü de teorik tabaka sayısıdır. Tabaka sayısı ya da diğer adıyla teorik tabaka sayısı N ile gösterilmektedir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$N = 16 \times (t / W)^2 \quad (2.8.)$$

$$N = 5.54 \times (t / W_{1/2})^2 \quad (2.9.)$$

Burada t; bileşiğin alıkonma süresini, W; bileşik pikinin taban genişliğini ve $W_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir.

Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir.

- İndirgenmiş tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse yani h değeri ne kadar küçükse kolonun verimi o kadar yüksektir. daha düşük indirgenmiş tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir. h değerini büyüten her etken kolon verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur. h değeri aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$h = (L / N \times d_p) \quad (2.10.)$$

burada h; indirgenmiş tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve d_p de partikül çapıdır.

- Seçicilik, her bir pikin kapasite oranları veya bunların düzenlenmiş alıkonma

zamanlarının oranıdır. Seçicilik karışımındaki bileşenlerin partikül yüzeyine adsorplanmasındaki ilgisi olarak ifade edilmektedir. Bu parametre kolonun veriminden bağımsızdır. Sadece bileşenin doğal yapısına, elüent tipine, elüent bileşimine ve yüzey adsorbansına bağlıdır. Genellikle iki bileşiğin seçiciliği 1'e ne kadar yakınsa iki pikin birbirinden ayrılması o kadar güçleşir. Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\alpha = \frac{t_{r,B} - t_0}{t_{r,A} - t_0} \quad (2.11.)$$

Burada $t_{r,B}$ ve $t_{r,A}$ sırasıyla B ve A bileşenlerinin alıkonma sürelerini, t_0 ise kolondaki boşluk hacmi yani kolonla etkileşime girmeden hareketli bir fazın kolondan çıkması gerekli olan süreyi ifade etmektedir.

- Çözünürlük (ayırıcılık, R), kromatografide iki pikin birbirinden ayrılma derecesine denir. İki pikin birbirinden ayrıldığını kabul etmek için $R = 1$ olması gerekir ve bu çözünürlük değeri iki bandın birbiri ile % 2 oranında örtüştüğü anlamına gelir. Bu değer 1.5'den büyük ise pikler tamamen ayrılmış ve iyi bir çözünürlük elde edilmiş demektir. Çözünürlük aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

$$R_{(i+1)/(i)} = 2 \times (t_{i+1} - t_i) / (W_i + W_{i+1}) \quad (2.12.)$$

Burada t_i ve t_{i+1} ; sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenlerin alıkonma süreleri, W_i ve W_{i+1} ise sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenler için elde edilen taban genişliklerini ifade etmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar polimerik liganda sahip, eş boyutlu gözenekli iyon değişim kromatografisi kolon materyallerinin sentezini ve kromatografik performanslarının test edilmesini içermektedir. Çalışmaların ilk kısmında monodispers ve gözenekli formda poli(glisidilmetakrilat-etilenglikol dimetakrilat) (GMA-EDM), partiküller sentezlenmiş ve bu partiküllerin asidik ortamda hidrolizi ile poli(dihidroksipropilmetakrilat-etilenglikoldimetakrilat) (DHPM-EDM) partiküller elde edilmiştir. Bu partiküller 3-trimetoksisililpropilmetakrilat (TMSPM) ile reaksiyona sokularak yüzeylerinde vinil grupları oluşturulmuştur. Takip eden basamakta akrilamido metil propan sülfonik asit (AMPS) monomeri, çözültiden partikül yüzeyine graflanarak anyonik formda polimerik ligand taşıyan yapılar elde edilmiştir. Partiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu, BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm sistemi ve FTIR ile karakterizasyonları yapılmıştır. Çalışmaların İkinci kısımda, kromatografik performanslarının belirlenmesi amacıyla, HPLC kolonlarına doldurulan partiküller İyon değişim Kromatografisinde (Ion Exchange Chromatography, IEC) kolon materyali olarak kullanılmıştır.

Aşağıda farklı partikül yapısına sahip polimerik partiküllerin üretim, karakterizasyon ve kromatografik performanslarının belirlenmesinde kullanılan yöntemler detaylı olarak verilmektedir.

3.1. Basamaklı Polimerizasyon Yöntemi ile Monodispers ve Gözenekli GMA ve EDM Bazlı Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Partikül sentezinin ilk basamağında polistiren çıkış lateksi, dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Daha sonra bu partiküller, eş boyutlu ve gözenekli yapı elde etmek amacıyla şişirme işlemine tabi tutulmuştur. Şişme işleminde, polistiren partiküller, düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan, yüzey gerilimini azaltan bir polar ajan ve monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıyı içeren monomer fazı ile şişirilmiştir. Kullanılan organik ajanın seçimi üretilen çıkış lateksini (polistiren) çözebilme özelliği göz önünde tutularak yapılmıştır. Şişme basamağından sonra monomer fazının partikül içerisinde polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde

edilen partiküllerin ekstraksiyonu ile monodispers yapıda gözenekli poli(GMA-EDM) partiküller elde edilmiştir.

3.1.1. Çıkış Lateksinin Üretimi

3.1.1.1. Materyal

Çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyonu ile üretiminde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (Et-OH, Merck A.G., Almanya) ve 2-metoksietanol (HPLC grade, Met-OH, Aldrich Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak 2-2'-azobisizobütironitril (AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere) kullanılmıştır. AIBN kullanılmadan önce kristalize edilmiştir. Sterik stabilizör olarak da polivinilprolidon K-30 (Mr:40000, PVP K-30, Sigma Chemical Co. , ABD) kullanılmıştır. Monomer olarak kullanılan stiren (S, PETKİM, Kocaeli, Türkiye) vakumda distile edilip saflaştırılmış ve polimerizasyonda kullanılıncaya kadar buzdolabında bekletilmiştir.

3.1.1.2. Polimerizasyon Yöntemi

Monodispers gözenekli partiküllerin üretiminin ilk basamağında monodispers formda çıkış lateksi sentezlenmiştir. Stiren monomerinin dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak polimerleştirilmesi sonucunda 2 µm boyutunda monodispers çıkış lateksi elde edilmiştir. Sentezlerde kullanılan çıkış lateksinin sentez koşulları Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Monodispers formda polistiren çıkış lateksi sentezi için dispersiyon polimerizasyonu koşulları.

Kullanılan Kimyasallar	Miktarlar
Etanol (ml)	69
2-metoksietanol (ml)	48
PVP K-30 (g)	2.1
Stiren (ml)	20
AIBN (g)	0.44
Su (ml)	3
Polimerizasyon Koşulları	
Sıcaklık (°C)	70
Polimerizasyon Süresi (saat)	24
Çalkalama Hızı (cpm)	100

Yöntemde öncelikle dispersiyon polimerizasyonu dağıtma ortamı hazırlanmaktadır. Bu amaçla tipik bir sentezde, 2.1 g PVP K-30, 69 mL Et-OH, 48 mL Met-OH ve 3 mL su içeren dağıtma ortamında çözülmemektedir. Bu işlem sırasında ortam 500 mL hacme sahip ağız sızdırmaz şekilde kapatılan bir cam reaktörde bulunmaktadır. Elde edilen dağıtma ortamına 20 mL stiren monomeri ve 0.44 g AIBN eklenmekte ve sonuç ortam AIBN'nin tam çözünmesini sağlayabilmek amacıyla yaklaşık 5 dakika süreyle ultrasonikasyona maruz bırakılmaktadır. Bu işlem 200 W gücünde bir ultrasonik su banyosunda (sonikatörde) (Bransonic 200, İngiltere), ve oda sıcaklığında yürütülmektedir. Ağız kapatılmış durumdaki cam reaktör oda sıcaklığında bir çalkalamalı su banyosuna (Gallenkamp, ABD) yerleştirilmekte ve 100 cpm çalkalama

hızı ile polimerizasyon sıcaklığı olan 70°C değerine ısıtılmaktadır. Polimerizasyon işlemi 24 saat süre ile belirtilen sıcaklık ve çalkalama hızında yapılmaktadır.

Polimerizasyon sonrasında reaktör içeriği oda sıcaklığına soğuduktan sonra 5000 rpm'de yaklaşık 5 dakika süreyle santrifüjlenmektedir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılmakta ve 10 mL'lik santrifüj tüplerinde çöken partiküllerin üzerine distile-diyonize su eklenerek, partiküller bir baget yardımıyla sulu ortamda dispers edilmektedir. Elde edilen yeni dispersiyonla santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez yinelenmekte ve son santrifüj basamağında çöken partiküller yaklaşık 100 ml su içerisinde, cam baget ile karıştırma ve takiben 1-2 dakika süreyle sonikasyon ile dispers edilmektedir. Bu işlem ile ortalama partikül boyutu yaklaşık 2 µm olan monodispers polistiren çıkış lateks partikülleri elde edilmektedir.

3.1.1.3. Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

Çıkış lateksinin ortalama boy ve boy dağılımının hesaplanması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, JEOL JEM 1200 EX, Tokyo Japonya) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Çıkış lateksinin ortalama molekül ağırlığı HPLC'de SEC yöntemiyle bulunmuştur. Çıkış lateksinin partikül içeriği ise gravimetrik analiz yöntemiyle bulunmuştur. Bu amaçla sulu ortamda bulunan polistiren partiküller, vakum etüvünde 70°C'de 24 saat boyunca kurutulmuş ve alınan belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği tartım yoluyla belirlenmiştir.

3.1.2. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Hidroksil gruplu monodispers ve gözenekli partiküllerin sentezi için "Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu" yöntemi kullanılmış ve bu yöntem ayrıntıları ile aşağıda anlatılmıştır.

3.1.2.1 Materyal

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminde organik ajan yani diluent olarak toluen (HPLC grade, Aldrich Chemical Co. , ABD), yüzey gerilimini azaltıcı madde olarak, izoamillalkol (IAA, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve anyonik emülsiyon yapıcı madde

olarak da sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma Chemicals. Co., ABD) kullanılmıştır. Polimerizasyonlarda monomer olarak glisidilmetakrilat(GMA, Aldrich Chemicals Co., ABD) çapraz bağlayıcı monomer olarak ise etilenglikoldimetakrilat (EDM, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmadan önce kurutulmuştur. Polimerizasyonlarda stabilizör olarak polivinilalkol (PVA, Mr: 87000-146000, %87 hidrolize, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır. Bütün deneylerde distile-deiyonize su kullanılmıştır.

3.1.2.2. Çıkış Lateksinin Diluent ve Monomer Fazı ile Şişirilmesi

Monodispers formdaki çıkış partiküllerinin gözenekli olabilmesi yapısına gözenek oluşturucu ajanların eklenmesi ile mümkün olmaktadır. Bu amaçla polistiren çıkış partiküllerinin içine düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan olan toluen eklenmiştir. Toluene, polistiren partiküllerin içine girerek zincirlerin gevşemesine (kısmen de olsa çözünmelerine) yani partiküllerin şişmesine neden olmaktadır. Ancak polistiren partiküllerin organik ajanla şişirilmesi sırasında monodispersitenin korunması gerekmektedir. Bu nedenle şişirme işlemi sırasında toluene, sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında sulu emülsiyon ortamında çıkış lateksi ile etkileştirilmiştir. Burada SDS misel yapısı oluşturarak, toluene'in emülsiyon ortamı içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamaktadır. Böylece partiküllerin aynı oranda şişmeleri yani monodispersitenin korunması sağlamaktadır.

Tipik bir basamaklı polimerizasyon yöntemi aşağıda örneklenmektedir. Sulu emülsiyon için, sürekli faz 0.3 g SDS'nin ve 0,35 g PVA'nın 120 mL distile su içerisinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Burada polivinil alkol sterik stabilizör olarak kullanılmakta ve polimerizasyon sırasında partikül -su ara yüzeyine yerleşerek, sonuç partikül yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır. Aynı sulu emülsiyon ortamına, düşük molekül ağırlığına sahip organik bir ajan olarak 6.4 mL toluene, monomer olarak 3.8 mL GMA, 2.6 mL EDM çapraz bağlayıcı, yüzey gerilimini azaltıcı madde olarak 0.5 mL IAA ve 0.24 g BPO eklenmiştir. Bu karışım, 30 dakika boyunca ultrasonikasyona tabi tutularak dispers edilmiştir. Elde edilen sonuç emülsiyonuna 0.40 g polistiren çıkış partikülü eklenmiş ve karışım bir manyetik karıştırıcıya

konulmuştur. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında 400 rpm hızında 24 saat süreyle yapılmış ve diluent karışımı ile monomer fazın çıkış partiküllerine transferi sağlanmıştır.

3.1.2.3. Monomer Fazının Çıkış Partikülleri İçerisinde Polimerizasyonu

Elde edilen dispersiyon, 60 mL toplam hacme sahip sızdırmaz özellikteki cam reaktöre aktarılmıştır. Ağız sıkıca kapatılan pyrex cam reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Mammert, Almanya) oda sıcaklığında yerleştirilmiş ve çalkalama hızı 120 cpm değerine ayarlanarak ısıtma işlemi başlatılmıştır. Kullanılan çalkalamalı su banyosu 40 dakikalık süre içerisinde polimerizasyon sıcaklığı olarak belirlenen 70°C değerine ulaşmıştır. Polimerizasyon işlemi bu sıcaklıkta 24 saat süre ile ve 120 cpm çalkalama hızında yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda çalkalamalı su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığına soğutulmuştur.

3.1.2.4. Monodispers Gözenekli Partiküllerin Yıkınması Ve Ekstraksiyonu

Polimerizasyon sonucunda ana ürün olarak elde edilen monodispers makrogözenekli partiküllerin dağıtma ortamından ve polimerizasyon yan ürünlerinden ayrılması gerekmektedir. Partiküllerin ortamda bulunan ve sürekli fazda oluşan yaklaşık 1µm partikül boyutuna sahip yan üründen ayrılması amacıyla bir seri santrifüjleme dekantasyon işlemi uygulanmıştır. Santrifüjleme işlemi önce distile su ardından da etanol ile yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında reaktörlerden alınan dispersiyon, 10 ml hacmindeki santrifüj tüplerine konulmuş 3000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda monodispers makrogözenekli partiküller çökmüş ve yaklaşık 1 µm boyutundaki yan ürün süpernatantın dekantasyonu ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüjleme-dekantasyon işlemine optik mikroskopla yapılan gözlemlerle küçük partikül fraksiyonları ortamdan tamamen uzaklaşana kadar devam edilmiştir. Daha sonra elde edilen eşboyutlu gözenekli partiküller etanol ortamında dispers edilmiş ve 5000 rpm hızında 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Partiküller içinde kalan organik ajanın ve lineer polistirenin ortamdan uzaklaştırılması için partiküller THF ile ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla partiküller 10 ml'lik santrifüj tüplerinde önce THF içine dispers edilmiş, 5000

rpm'de 3 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. 2 kez yinelenen santrifüj işleminin ardından partiküller yaklaşık 150 ml THF içine alınmıştır. Partiküller, THF ile çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Almanya) 60°C'de 4 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon bitiminde partiküller oda sıcaklığında soğutulmuştur.

3.1.2.5. Monodispers Partiküllerin Sülfürik Asit ile Hidrolizi

Bu aşamada polimerizasyon sonucunda elde edilen GMA-EGD kopolimeri sülfürik asit (H₂SO₄, Merck A.G. Almanya) ile hidroliz edilmiştir. Partiküller önce, 50 ml 0.5 M H₂SO₄ çözeltisi ile 500 ml'lik pyrex bir erlen içinde dispers edilmiştir. Hidroliz işlemi, 60°C'de 6 saat süreyle çalkalamalı bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işlemi sayesinde monomer karışımındaki GMA yapısında bulunan epoksi halkaları açılarak -OH fonksiyonel grubu halini almaktadır. Böylece yapı dihidroksipropilmetakrilata (DHPM) dönüştürülmektedir.

3.1.2.6. DHPM-EDM Bazlı Partiküllerin TMSPM ile Vinillenmesi

Yapılan çalışmanın bu aşamasında GMA-EDM kopolimerinin hidroliz edilmesi sonucu (DHPM-EDM) kopolimeri şekline dönüştürülen mikroküreler 3-trimetoksisililpropilmetakrilat (TMSPM, Aldrich Chem. Co. , A.B.D.) ile vinillenmiştir. Bu amaçla 2.5 gr partikül 60 mL hacme sahip sızdırmaz özellikteki cam reaktöre alınmış üzerine 40 ml toluen (Riedel-de Haen, Almanya) ve 2.5 ml 3-trimetoksisililpropilmetakrilat ilave edilmiştir. Ağız sıkıca kapatılan pyrex cam reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Almanya) oda sıcaklığında yerleştirilmiş ve çalkalama hızı 120 cpm değerine ayarlanarak ısıtma işlemi başlatılmıştır. Kullanılan çalkalamalı su banyosu 50 dakikalık süre içerisinde vinilleme sıcaklığı olarak belirlenen 80°C değerine ulaşmıştır. Vinilleme işlemi bu sıcaklıkta 24 saat süre ile ve 120 cpm çalkalama hızında yürütülmüş ve bu sürenin sonunda çalkalamalı su banyosundan alınan reaktör oda sıcaklığına soğutulmuştur. Partiküller reaksiyon sonrasında mutlak etanol ile 3 kez santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak yıkanmış ve vakum etüvünde 24 saat süreyle 80°C'da kurutulmuştur.

3.1.2.7. AMPS Monomerinin Çözelti Polimerizasyonu Yöntemiyle Partikül Yüzeyine Graft Edilmesi

Bu amaçla 2,5 g vinil gruplu partikül, 60 mL hacme sahip sızdırmaz özellikteki cam reaktöre alınmış ve üzerine 37.5 ml etanol (Et-OH, Merck. A.G., Almanya) ve monomer olarak kullanılan 2 gr 2-akrilamido- 2 -metil -1-propansülfonkasit (AMPS, Aldrich Chem. Co. A.B.D) ilave edilmiştir. Başlatıcı olarak kullanılan 0,06 g 2-2'-azobisisobütironitril (AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere) ilavesinden sonra cam reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Almanya) yerleştirilmiş ve çalkalama hızı 120 cpm değerine ayarlanarak; polimerizasyon, 77.5°C sıcaklıkta 24 saat süre içinde gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda partiküller 2 defa alkol ve 2 defa su ile yıkandıktan sonra kolona doldurulmaya hazır hale getirilmiştir.

3.2. Sentezlenen Monodispers Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1. FTIR ile Karakterizasyon

Polimerik ligand taşıyan partiküllerin yapılarının aydınlatılması amacıyla her basamak sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir.

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyon

Monodispers ve gözenekli partiküllerin boy ve boy dağılım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM, Jeol JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. SEM mikrograflarının elde edilmesinde izlenen prosedürde öncelikle yıkanmış temiz latex partiküllerin sulu dispersiyonundan 0.1 ml alınarak bakır disk üzerinde dağıtılır ve oda sıcaklığında içerisindeki su buharlaştırılır. Kurutulmuş monodispers poroz partiküllerin vakum altında ince bir tabaka halinde altınla (100A⁰) kaplanmasının ardından örnekler SEM mikrografları çekilmeye hazır hale getirilir.

3.2.3. BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile Karakterizasyon

Partiküllerin yüzey alanı, ortalama gözenek boyutu, gözenek hacmi, gözenekliliği ve gözenek boyut dağılımı verileri Quantochrome, Nova 2200E model Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (BET) ile ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde öncelikle partiküller 90°C'de 10 saat süre ile vakum altında kurutulmuştur. Ardından aletin özel hücrelerine yerleştirilen partiküllerden BET cihazında 90°C'de 3 saat süre ile vakumlama ile kalan nem tamamen uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık her bir örnekten 0,1 g alınarak analizler yapılmıştır. Ölçümler sıvı azot içerisine yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azotun buhar basıncından hesaplanması temeline göredir.

3.3. Kromatografik Çalışmalar

3.3.1. Materyal

Katyon Değişim Kromatografisinde mobil faz olarak Sodyum Asetat, MES, Sodyum Fosfat, HEPES (Aldrich Chem. Co, ABD) tamponları, bu tamponların gradiyentlerinde ise 1M NaCl kullanılmıştır. Kolonda analizi yapılmak üzere Sitokrom C, Miyogloblin, Ribonükleaz A ve Lizozim (Sigma Chemicals Co, ABD) içeren dörtlü protein karışımı kullanılmıştır.

3.3.2. Kolonların Doldurulması

Kolon dolgu materyalleri, sulu ortamda ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Üretilen partiküller kromatografik analiz için 4.6 mm iç çapa ve 100 mm uzunluğa sahip çelik kolonlara (Shimadzu, Japonya) doldurulmuştur. Dolum işlemi için kolonun bir ucuna çelik frit yerleştirildikten sonra, açık olan diğer uçtan bir pipet yardımıyla partiküller kolona doldurulmuştur. Dolum işlemine kolonun üst kısmında hiç boşluk kalmayınca kadar devam edilmiştir. Kolon daha sonra HPLC cihazına bağlanarak, kolondan 200 atm basınçta su geçirilmiştir. 20 dakikalık periyotlar halinde kolon sökülerek üst kısmında çökme olup olmadığı kontrol edilmiş ve çökme varsa partikül ilavesine devam edilmiştir. Kolonun su ile basılması işlemine kolonun üst kısmında

yatak boyu azalması gözlenmeyinceye dek devam edilmiştir. Bu işlemlerden sonra kolon HPLC cihazına ters yönden bağlanarak akış yönü terse çevrilmiş, 200 atm basınçta 30 dakika boyunca su geçişi sağlanmıştır. Böylece her iki yönden de yüksek basınca maruz bırakılan partiküllerin stabil bir yatak oluşturması sağlanmıştır.

3.3.3. Kromatografik Sistem

Kromatografik performans deneylerinde kullanılan HPLC sistemi (Shimadzu, Japonya) bir manuel enjeksiyon ünitesi (Rheodyne, Shimadzu, Japonya), bir gradyent pompa (FCV-10AL, Shimadzu, Japonya), bir dörtlü gradyent mikser (LC-10AD, Shimadzu, Japonya), bir gaz uzaklaştırma ünitesi (DGU-14A, Shimadzu, Japonya) ve bir UV-Vis dedektör (SPD-10AV, Shimadzu, Japonya) içermektedir. Kullanılan HPLC sisteminin şekli Şekil 2.1.'de verilmektedir.

3.3.4. Kromatografik Performans Testleri

3.3.4.1. İyon Değişim Kromatografisi Deneyleri

Bu kısımda yapılan kromatografik performans testlerinde 4 farklı protein içeren örnek karışımı kullanılmıştır. Bu proteinlerin seçiminde izoelektrik nokta (pI) değerleri göz önüne alınmıştır. Bu değerler Çizelge 3.2' de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi hazırlanan kolonların mümkün olduğunca geniş bir pI aralığında kromatografik ayırma yapabilmesi hedeflenmiştir. Katyon değişim kromatografisi modunda gerçekleştirilen deneylerde mobil faz olarak farklı pH'larda farklı tamponlar ve bunların gradiyentleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Seçilen proteinlerin pI değerleri

Protein	İzoelektrik Nokta (pI)
Miyogloblin	7.2
Ribonükleaz A	9.5
Sitokrom C	10.2
Lizozim	10.5

Polimerik liganda sahip partiküllerin kolonlara doldurulmasından sonra HPLC'de kolonlar 0.5 ml/dak akış hızı kullanılarak şartlandırılmıştır. Kolon şartlandırıldıktan sonra protein karışımını içeren 20 µl hacme sahip örnek sisteme enjekte edilmiştir. 100x4.6 mm boyutlarına sahip her kolonda ayırma işlemi gradyent koşullarda yapılmıştır. Bu amaçla A fazı olarak belirli bir pH'a sahip tampon, B fazı olarak aynı tampon + 1M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. A fazı varlığında enjeksiyon yapıldıktan sonra, A fazı geçerken B fazı belirlenen sürede sabit bir derişim artışı ile kolona beslenmiştir. Örnek karışımının kolonda ayrılması 280 nm dalga boyunda çalıştırılan bir UV dedektör yardımıyla gözlenmiştir. Her analizden sonra, kolon bir sonraki analizde kullanılacak mobil faz ile yıkanıp yeni analize hazır hale getirilmiştir. Kromatografik deneyler farklı pH'lara sahip tamponlar ve farklı gradyent koşullarında, akış hızı değiştirilerek tamamlanmıştır.

3.3.4.2. Kromatografik Parametrelerin Tayin Edilmesi

Kromatogramlardan kolon performanslarını belirleyici parametreler bulunmuştur. Her analizde sisteme enjekte edilen örnek karışımındaki tüm bileşenler için alikonma süresi, taban genişliği ve pik yarı yüksekindeki taban genişliği gibi değişkenler ölçülüp teorik tabaka yüksekliği ve çözünürlük gibi kolon performansını belirleyici parametreler hesaplanmıştır.

- Teorik tabaka yüksekliği (TTY) kolonun ayırma verimini gösteren en önemli parametredir. Aşağıdaki ifade yardımıyla tayin edilmiştir.

$$TTY=L/N \quad (3.1.)$$

Burada L; Kolon boyunu, N; Teorik tabaka sayısını ifade etmektedir.

- Çözünürlük (ayırıcılık, R), iki pikin birbirinden ayrılma derecesini göstermektedir. Aşağıdaki ifade yardımıyla hesaplanmıştır.

$$R_{(i+1)/i} = 2 \times (t_{i+1} - t_i) / (W_i + W_{i+1}) \quad (3.2.)$$

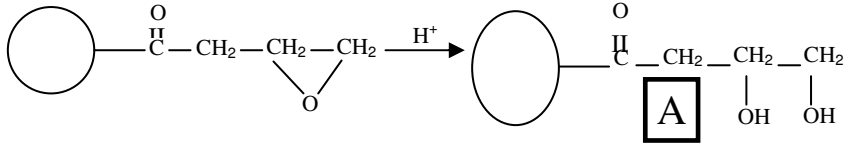
Burada t_i ve t_{i+1} ; sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenlerin alıkonma süreleri, W_i ve W_{i+1} ise sırasıyla i ve i+1 no'lu bileşenler için elde edilen taban genişliklerini ifade etmektedir.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada öncelikle GMA-EDM bazlı monodispers ve gözenekli formda polimerik partiküller sentezlenmiş ve partiküller, poli(AMPS) anyonik ligandına sahip iyon değişim kromatografisi (Ion Exchange Chromatography) kolon materyaline dönüştürülmüştür. Sentezlenen partiküller FTIR, Taramalı Elektron Mikroskobu, BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı ile karakterize edilmiştir. Aynı partiküller laboratuvarımızda daha önce yürütülen bir başka tez çalışmasında anyon değişim kromatografisi için kolon materyali geliştirilmesi amacı ile çıkış materyali olarak kullanılmıştır. Önceki çalışmada ilgili partiküller ile ilgili karakterizasyon yapılmış olduğundan aşağıda partikül özellikleri ana hatları ile özetlenmiştir. GMA-EDM bazlı partiküllerin katyon değişim kromatografisi modundaki davranışı ise, gradyent süresi, mobil faz pH değeri ve akış hızı değiştirilerek ayrıntılı olarak incelenmiş ve bu değişimlerin kolon ayırma yeteneğine etkisi incelenmiştir.

4.1. Poli(GMA-EGD) Partiküllerin Hidrolizi

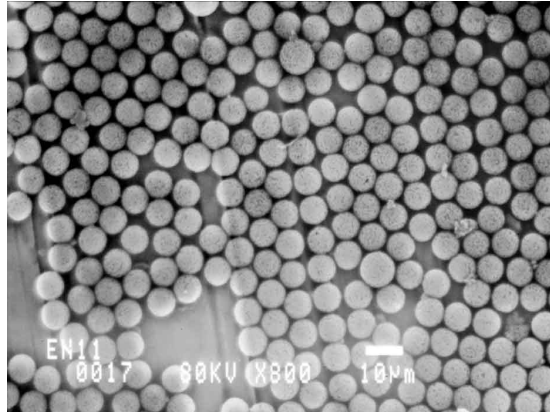
Monodispers ve gözenekli formda sentezlenen poli(GMA-EDM) partiküller asidik hidroliz sonrası poli(DHPM-EDM) formuna dönüştürülmektedir. Bu partiküllerin asit katalizli hidroliz mekanizması Şekil 4.1'de verilmektedir (Petro et al, 1997). Buna göre GMA'nın yapısında bulunan epoksi halkası sülfürik asit ortamında açılarak –OH fonksiyonel gruplu formu oluşturmaktadır. Poli(GMA-EDM) partiküllerin hidrolizi ile poli(DHPM-EDM) formunun oluşumu her iki partiküle ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması ile incelenmiştir. Bu karşılaştırmada poli(DHPM-EDM) partiküllerine ait FTIR spektrumunda –OH bandının bağıl şiddetinde, poli(GMA-EDM) partiküllerine kıyasla bariz bir artış gözlenmiştir. Poli(GMA-EDM) partiküllere ait FTIR spektrumunda –OH bandının gözlenmesi ise repolimerizasyon basamağında GMA'nın kısmi hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Ancak repolimerizasyon sonrası asidik hidroliz, ilgili bant şiddetinde net bir artışa neden olmuştur.



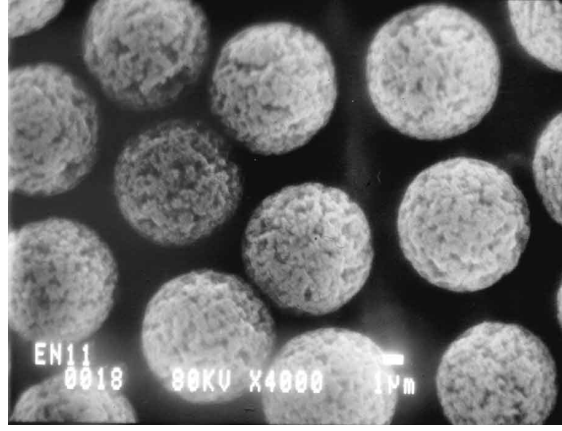
Şekil 4.1. Poli(DHPM-EDM) partiküllerin hidroliz reaksiyonu

4.2. Partikül Karakterizasyonu

Fiziksel karakterizasyon çalışmalarının ilk bölümünde poli(DHPM-EDM) partiküllerin taramalı elektron mikroskobu ile boy dağılımı ve yüzey morfolojisi incelenmiştir. Partiküllerin taramalı elektron mikrografı Şekil 4.2'de verilmektedir. Bu mikrograf temelinde ortalama partikül boyu $6.2 \mu\text{m}$, boy dağılımı değişim katsayısı ise % 4.3 olarak bulunmuştur. Partiküllerin yüzey morfolojisinin incelenmesi amacıyla yine taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Partikül yüzeyini detaylı olarak gösteren mikrograf ise Şekil 4.3'de sunulmaktadır. Bu görüntü temelinde partikül yüzeyinin süngerimsi gözenek yapısına sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.2. Poli(DHPM-EDM) partiküllerin boy dağılımını gösteren taramalı elektron mikrografı, Büyütme:1200X.

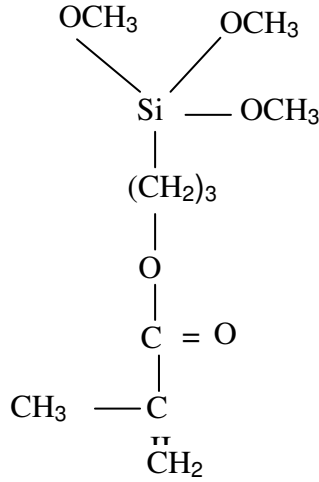


Şekil 4.3. Poli(DHPM-EDM) partiküllerin yüzey morfolojisini gösteren taramalı elektron mikrografı, Büyütme: 4000X.

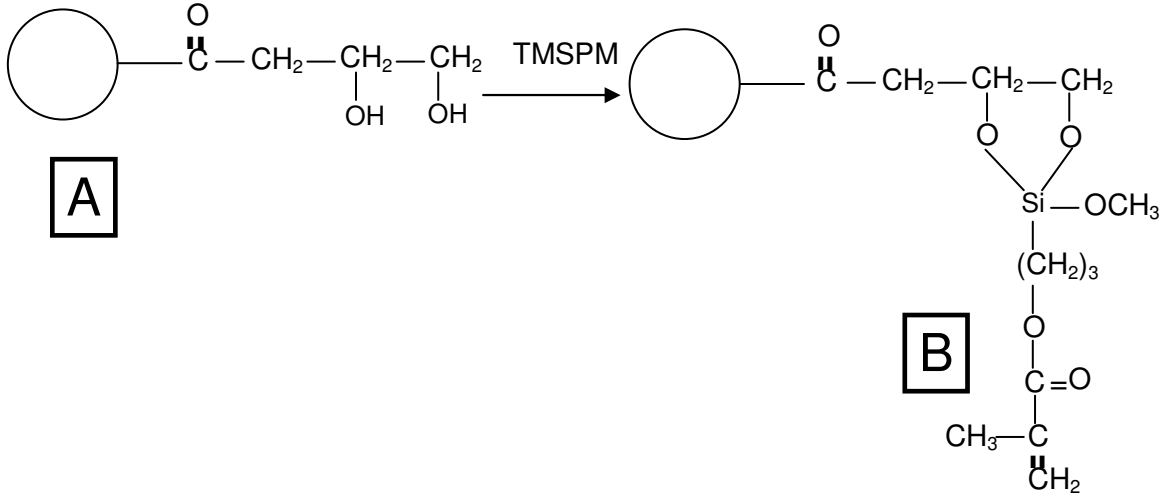
Poli(DHPM-EDM) partiküllerin ortalama gözenek boyutu ve boy dağılımının belirlenmesi amacıyla BET yöntemi kullanılmıştır (Tuncel A. , Akman A. ,Synthesis Of Polar Monodisperse Particles And Their Use As Support Material,2005). Bu analiz yardımıyla ortalama gözenek boyutu 33.3 nm, gözenek hacmi 0.18 ml/g ve özgül yüzey alanı'da 21.1 m²/g olarak belirlenmiştir.

4.3. Poli(DHPM-EDM) partiküllere vinil grubu takılması

Poli(DHPM-EDM) formundaki partiküllere 3-trimetoksisililpropilmetakrilat, TMSPM kullanılarak vinil grubu takılmıştır. Bu reaksiyon mekanizması Şekil 4.4'de verilmektedir. Buna göre DHPM yapısında bulunan –OH grupları, şekil 4.4'de yapısı verilen TMSPM'nin trimetoksisilil grubu ile reaksiyona girerek vinillenmiş partikülleri oluşturmaktadır (Şekil 4.5). Bu reaksiyonunda TMSPM için bağlanma verimi gravimetrik yöntemle % 8.5 olarak tayin edilmiştir.



Şekil 4.4. 3-Trimetoksisililpropilmetakrilat molekül formülü



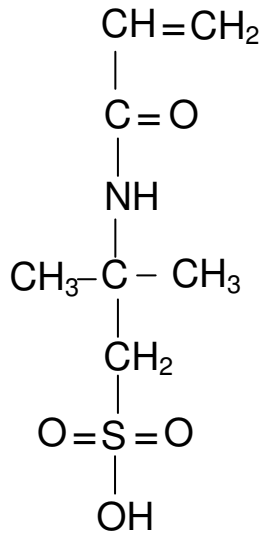
Şekil 4.5. Poli (DHPM-EDM) partiküllere vinil grubu takılması

Poli(DHPM-co-EDM) partiküllere TMSPM bağlanması FTIR ile de incelenmiştir. FTIR spektrumunda yer alan ve 1637 cm^{-1} dalga boyunda vinil grubu için gözlenen bant, partiküllere TMSPM bağlandığının kanıtıdır.

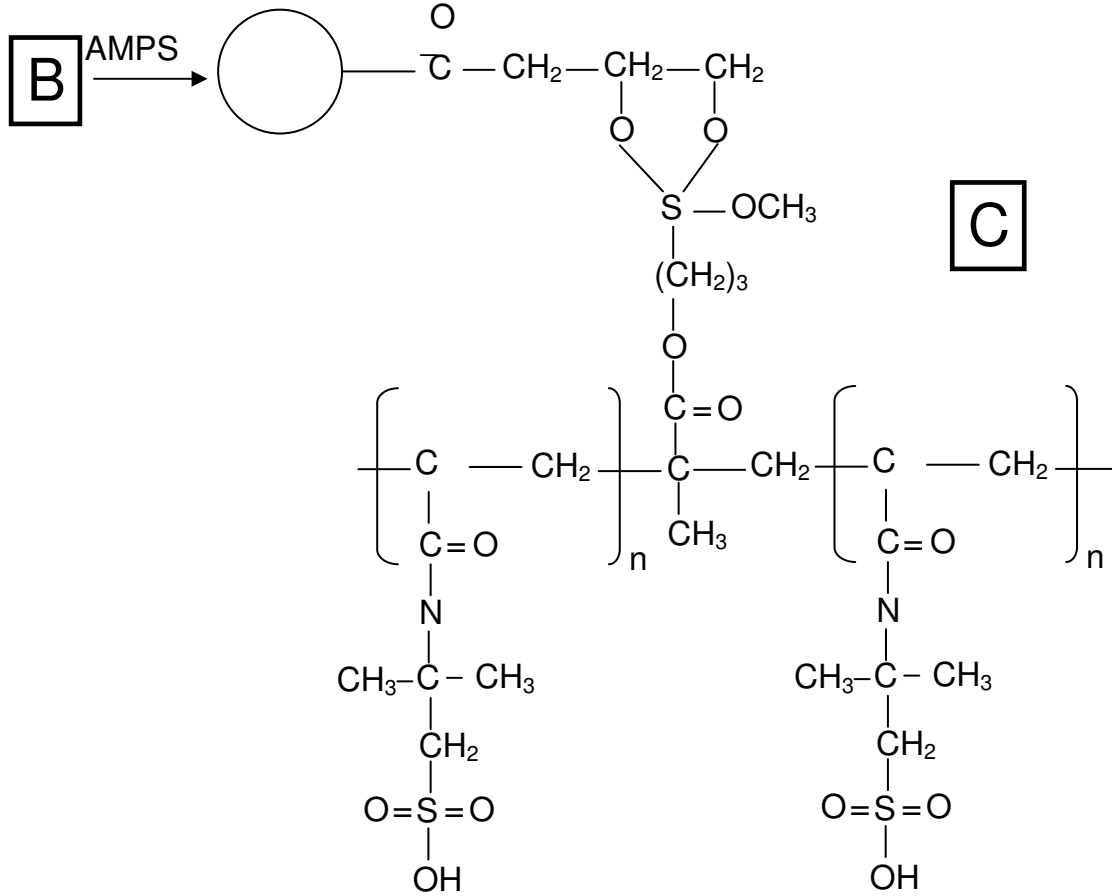
4.4.Sülfopropil Gruplu Monomerlerin Vinil Gruplu Partiküllere Graft Edilmesi

Vinil gruplu poli(DHPM-EDM) partiküller varlığında AMPS'nin çözelti polimerizasyonu ile bu monomer partikül yüzeyine graft edilmiştir. Seçilen AMPS monomerinin yapısı ve bunun partikül yüzeyine graft edilmesi ile oluşan polimerik ligandlı yapı sırasıyla

Şekil 4.6- 4.7'de verilmektedir. AMPS için graflama verimi ise gravimetrik yöntemle % 18.3 olarak belirlenmiştir. Karşılaştırma amacıyla vinillenmemiş poli(DHPM-EDM) partiküller varlığında her iki monomerin çözelti polimerizasyonu yapılmış fakat bu polimerizasyonlarda partikül yapısına monomer graft edilememiştir. Bu sonuç monomer graflanması işleminin DHPM bazlı partiküllerdeki vinil grupları üzerinden yürüdüğünü göstermiştir.



Şekil 4.6. 2- Akrilamido-2 metil-1-propansülonik asit (AMPS) monomerinin yapısı



Şekil 4.7. Vinillenmiş poli(DHPM-EDM) partiküllerine AMPS graft edilmesi sonucu oluşan polimerik ligandlı form.

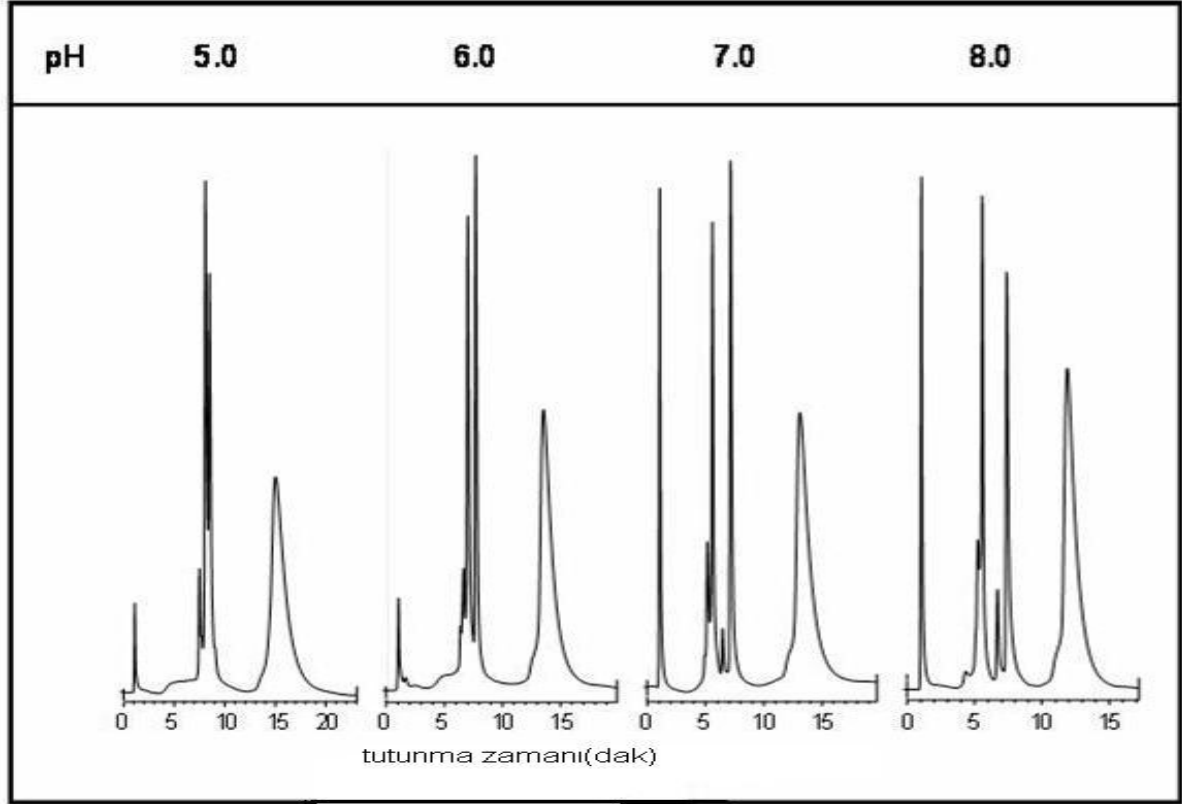
4.5. Partiküllerin Kromatografik Analizi

4.5.1. pH Değişiminin Kromatografik Performansa Etkisi

Kromatografik çalışmaların bu kısmında, sentezlenen partiküllerin, farklı pH'a sahip mobil fazlar varlığında ayırma performansları incelenmiştir. Akış hızı ve gradiyent süresi sabit tutularak mobil fazın pH'ı değiştirilmiştir. Analit olarak kullanılan 4 bileşen'li protein karışımının kolon çıkışında izlenmesi UV detektör kullanılarak 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. pH etkisi incelenirken kromatografik analizlerde her bir kolon için en uygun gradiyent koşulları (akış hızı ve gradiyent süresi) kullanılmıştır. Poli(AMPS) bağlı kolon için mobil faz akış hızı, 1.5 ml/dak, gradiyent süresi ise 20 dak

olarak belirlenmiştir. Bu deneylerde mobil faz ile aynı pH değerine sahip 1M NaCl çözeltisi ile gradyent oluşturulmuştur.

Polimerik liganda sahip poli(AMPS) partiküllerle hazırlanan kolonlar ile elde edilen sıvı kromatogramları Şekil 4.8’de görülmektedir. Şekil 4.8 incelendiğinde kolonun özellikle pH 7 ve 8 değerlerinde iyi bir ayırma yapabildiği görülmektedir. Çizelge 3.2’den görüleceği üzere analizde kullanılan proteinlerin pI değerleri 7.2-10.5 aralığında bulunmaktadır. pH 5 ve 6 değerlerinde kullanılan proteinlerin iyonize formda olmalarından ötürü, mobil fazda yüksek çözünürlüğe sahip olması ayrılmalarını zorlaştırmaktadır. pH 7 ve 8 değerlerinde ise izoelektrik nokta büyüklük sırasına göre proteinler kolondan ayrılmakta ve başarılı bir kromatografik ayırım sağlanabilmektedir.



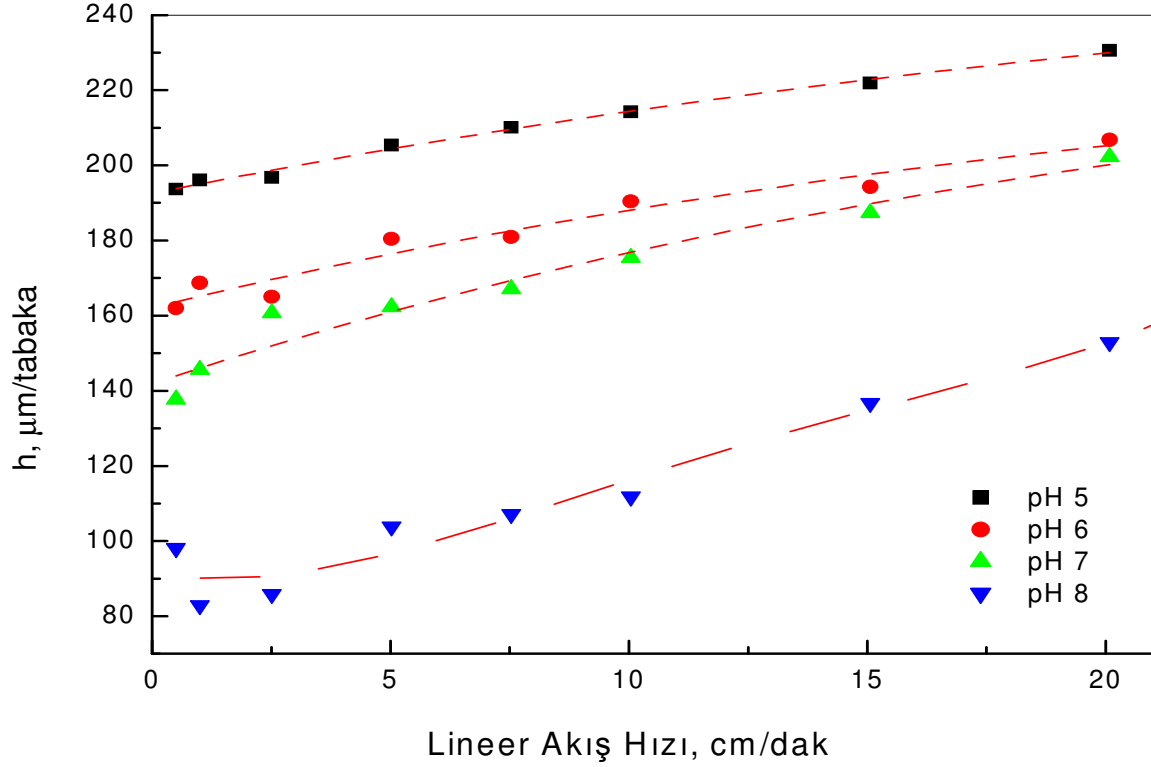
Şekil 4.8 Poli(AMPS) bazlı partiküllerle doldurulmuş kolon ile farklı pH değerlerinde elde edilen kromatogramlar, Koşullar: Kolon 100 x 4.6 mm, Akış Hızı: 1.5 mL/dak Gradyent süresi: 20 dakika, UV detektör: 280 nm, Elüsyon Sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim

Kolonda pH değerinin artışı ile analiz süresinin azaldığı görülmektedir. Şekil 4.8 de verilen sıvı kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Pikler arasındaki ayrılmayı simgeleyen çözünürlük değerlerine bakıldığında, poli(AMPS) bazlı kolonun çözünürlük değerleri bütün pH değerlerinde ayrılma sınırı olan $R \geq 1$ koşulunu sağlamaktadır. İyon değişim kromatografisinin temeli proteinler ve iyon değiştirici dolgu materyali arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Proteinlerin net yükü ve yük yoğunluğu, çevreleyen çözeltilerin pH değeri ile değiştiği için çözünürlük ve tutunma süreleri, tampon çözelti ve tuz çözeltilerinin bileşimi gibi kuvvetli biçimde pH'a bağlıdır. Kolon için en iyi kromatografik ayırımın 8.0' de olduğu Şekil 4.8 ve Çizelge 4.1'den görülmektedir.

Çizelge 4.1. Poli(AMPS) partikülleri ile hazırlanan kolonlar ile farklı pH larda elde edilmiş sıvı kromatogramlarına ait çözünürlük değerleri.

pH ile Değişim			
	Çözünürlük		
	R21	R32	R43
pH 5	17,6	1,05	2,55
pH 6	11,65	1,4	3,93
pH 7	9,57	2,9	3,35
pH 8	10,4	3,16	2,93

Şekil 4.9'da poli(AMPS), bağlı kolon için, mobil fazdaki pH değişiminin teorik tabaka yüksekliğine (TTY) etkisi verilmektedir. Bu analizde analit olarak Miyogloblin kullanılmıştır. Bilindiği üzere TTY kolonun ayırma verimini gösteren bir parametredir. Bu değer düşük olması kolonun ayırma yeteneğinin daha iyi olduğunu göstermektedir. Şekilden de görüleceği gibi pH artışı ile TTY bariz bir azalma göstermektedir. Bu davranış pH'8 de kolonun daha iyi bir ayırma yeteneğine sahip olduğunu net olarak gösteren bir sayısal kriterdir.



Şekil 4.9. AMPS ligandına sahip partiküller ile doldurulmuş kolonun farklı mobil faz pH değerlerinde teorik tabaka yüksekliğinin akış hızı ile değişimi, Kromatografik koşullar: Kolon: 100 x 4.6 mm, UV detektör: 280 nm. Analit: Miyogloblin.

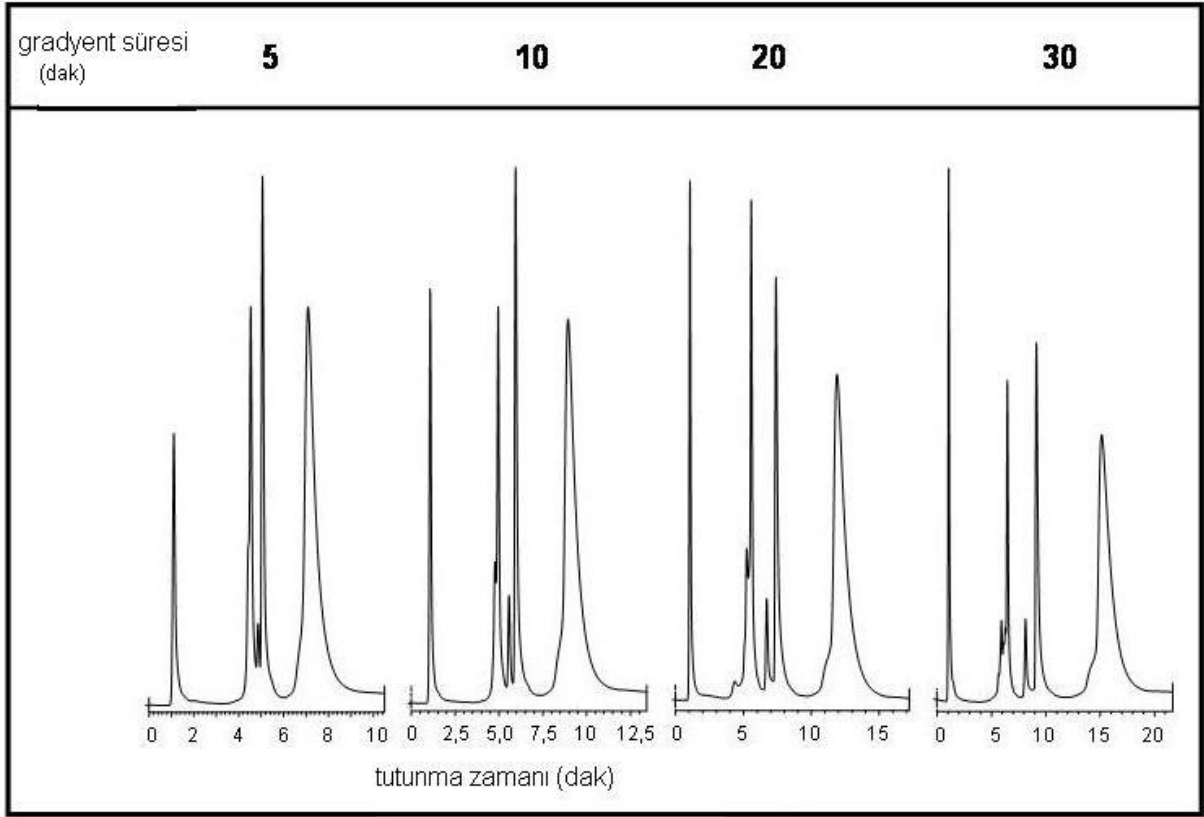
4.5.2. Gradyent Zamanının Kromatografik Performansa Etkisi

Gradyent süresinin kolonların ayırma performanslarına etkisini incelemek amacıyla sabit pH ve akış hızında gradyent süresi değiştirilerek bir seri analiz yapılmıştır. Bu deneylerde pH ve akış hızı 8 ve 1.5 ml/dak, değerinde tutulmuştur. Bu değerler her bir kolon için ayırmanın en iyi yapılabildiği en uygun koşullardır. Bu deneylerde mobil faz ile aynı pH değerine sahip 1 M NaCl çözeltisi ile gradyent oluşturulmuştur.

Gradyent eğimi iyon değişim kromatografisindeki önemli parametrelerden biridir. Bunun sebebi kolon uzunluğu ya da akış hızı değerleri değiştirilmeden uygun bir gradyent eğimi ile ayırmanın optimize edilebilmesidir. Fakat gradyent eğimi pik genişliği ve pozisyonunu önemli ölçüde etkilediği için gradyent eğimi değişimi ile çözünürlük arasındaki ilişkiyi tespit etmek kolay değildir. Genel anlamda gradyent

eğiminin azalmasıyla çözünürlük iyileştirilebilir. Ancak gradyent eğimi değerinin azalması ayırma zamanının artmasına ve pik şiddetinin düşmesine yol açar. Şekildeki gradyent değerlerinden en iyi çözünürlük değeri 20 dakikada elde edilmiştir.

Analizlerde yine 100x4.6 mm 'lik paslanmaz çelik kolon kullanılmış ve UV detektör 280 nm'de çalışılmıştır. Poli(AMPS) için farklı gradyent sürelerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekil 4.10'daki kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.



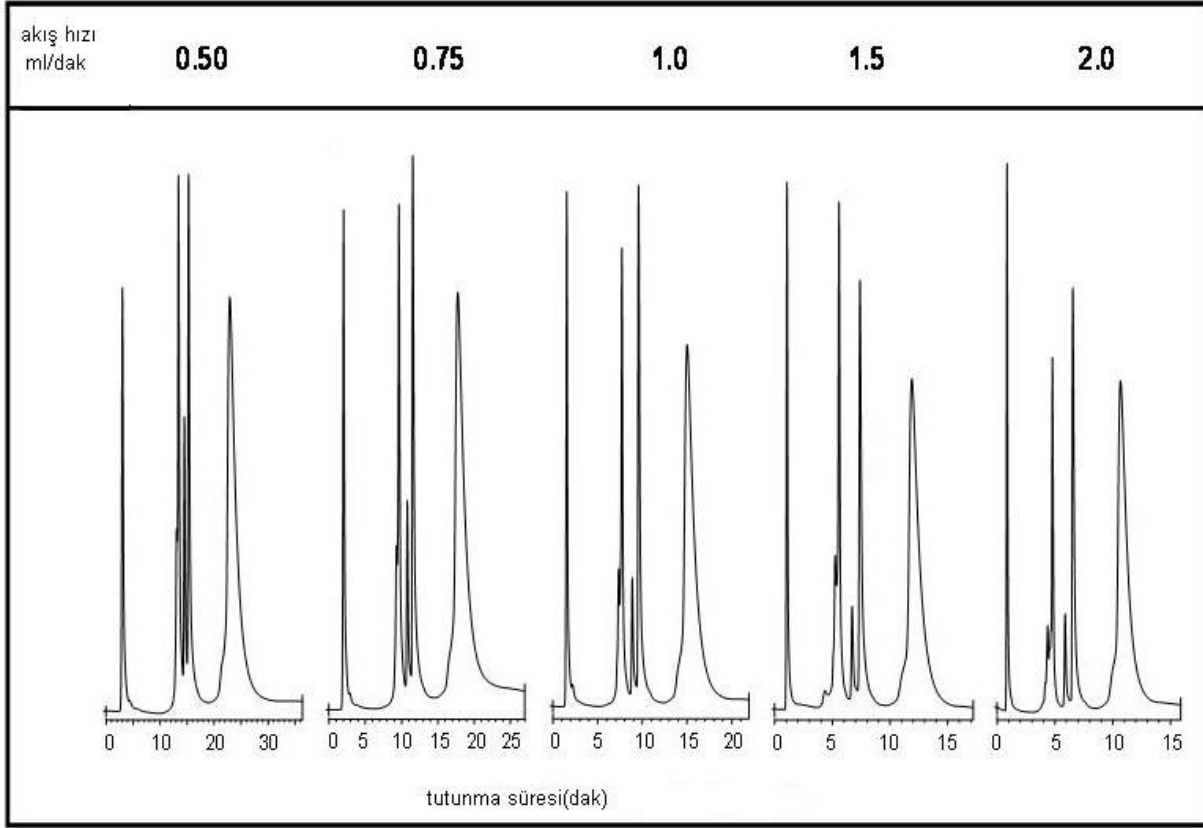
Şekil 4.10. Poli(AMPS) bağlı partiküllerle doldurulmuş kolonun farklı gradyent sürelerinde elde edilen sıvı kromatogramları, Kromatografik koşullar: Kolon 100 x 4.6 mm, Mobil faz: pH 8, Akış Hızı 1.5 ml/dak, UV detektör: 280 nm, Elüsyon Sırası (1) Miyoglobin, (2)Ribonükleaz A, (3)Sitokrom C, (4) Lizozim

Çizelge 4.2. Poli(AMPS) bağlı partiküller ile hazırlanan kolonlar ile farklı gradyent sürelerinde elde edilmiş sıvı kromatogramlarına ait çözünürlük değerleri.

Gradyent Süresi (dak)	Çözünürlük Değerleri		
	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
5	9.83	1.64	2.44
10	9.87	2.3	2.83
20	10.4	3.16	2.93
30	9.1	3.42	3.2

4.5.3. Mobil faz akış hızının kromatografik performansa etkisi

Mobil faz akış hızının kolonların ayırma performanslarına etkisini incelemek amacıyla sabit pH ve gradyent süresinde mobil faz akış hızı değiştirilerek bir seri analiz yapılmıştır. Bu deneylerde mobil faz pH değeri ve gradyent süresi 8 ve 20 dakika değerlerinde tutulmuştur. Bu değerlerin seçilmesinin nedeni bir önceki bölümde çözünürlük ve TTY değerlerinin bu koşullarda her bir kolon için maksimum değerlerinde olmasıdır. Analizlerde yine 100x4.6 mm'lik paslanmaz çelik kolonlar kullanılmıştır ve UV detektör ile 280 nm'de çalışılmıştır. Poli(AMPS) kolonu için farklı akış hızlarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11'da verilmiştir. Kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.11. Poli(AMPS) bağlı partiküllerle doldurulmuş kolonların farklı mobil faz akış hızlarında elde edilen proteinlere ait sıvı kromatogramları, Kromatografik koşullar: Kolon 100 x 4.6 mm, Mobil faz: pH 8, Gradyent Zamanı: 20 dak, UV detektör: 280 nm, Elüsyon Sırası: (1) Miyogloblin, (2)Ribonükleaz A, (3)Sitokrom C, (4) Lizozim

Çizelge 4.3. Poli(AMPS) bağlı partiküller ile hazırlanan kolonlar kullanılarak farklı mobil faz akış hızlarında elde edilmiş sıvı kromatogramlarının çözünürlük değerleri.

Akış Hızı(ml/dak)	Çözünürlük Değerleri		
	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.5	12.2	1.9	2.9
0.75	12.0	2.6	2.9
1.0	11.6	3.0	3.0
1.5	10.4	3.2	2.9
2.0	9.2	3.3	3.1

Elde edilen çözünürlük değerlerinden poli(AMPS) bağlı partikülleri içeren kolonlar için en uygun mobil faz akış hızı değerinin 1.5 ml/dak olduğu görülmektedir. Poli(AMPS) kolonda artan akış hızı ile çözünürlük değerlerinde belirgin bir artış söz konusudur. Bu durum akış hızının artmasıyla sıvı filmi için kütle aktarım direncinin azalması ile açıklanabilir.

4.5.4. Proteinlerin geri kazanımı

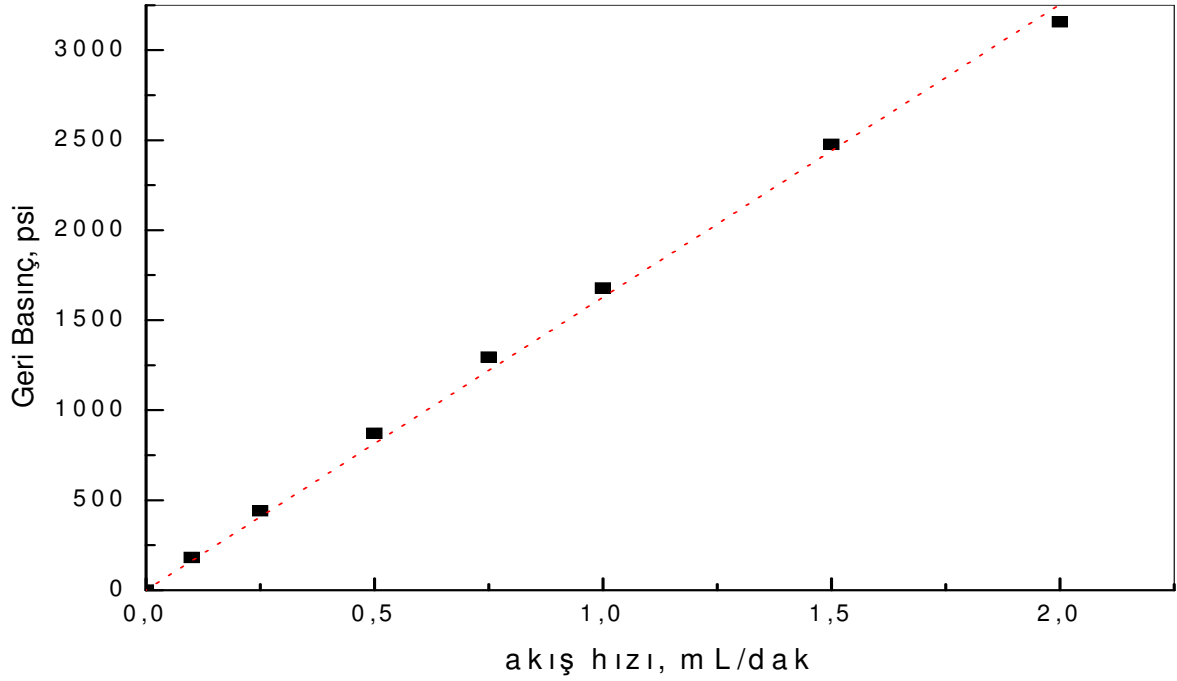
Kromatografik çalışmaların bu kısmında sentezlenen poli(AMPS) bağlı partiküllerle hazırlanan kolonlardan analit olarak kullanılan proteinlerin geri kazanımı incelenmiştir. Uygulanan testlerde mobil faz olarak her kolon için optimum pH değeri ve gradyent süresinde çalışılarak akış hızı sabit tutulmuştur. Elde edilen geri kazanım yüzdeleri ve kolon koşulları Çizelge 4.4'de verilmektedir. Analitin geri kazanımı iyon değişim kromatografisi kolonlarının sürekli ve sağlıklı çalışması için ön koşuldur. Normal gradyent koşullarında kolonun içerisinde analitin bir kısmının kalması ile artan enjeksiyon sayısı ile kolon basıncı yükselir ve bir noktada kolonun içinde analit birikimi ile kolon tıkanarak kullanılamaz hale gelir. Bu nedenle çalışmada kullanılan protein türü analitler için kantitatif geri kazanımın normal gradyent koşullarında eldesi elzemdir. Çizelge 4.5'e bakıldığında tüm proteinler için bu koşulun sağlandığı görülmektedir.

Çizelge 4.4. Poli(AMPS) bağlı kolonda analit geri kazanım değerleri.

Protein	Geri Kazanım oranı (%)	Kolon Koşulları
Miyogloblin	97	Mobil Faz: pH 8 HEPES 1M NaCl 5 mg/ml protein derişimi Akış Hızı:1 ml/dak
Ribonükleaz A	110	
Sitokrom C	101	
Lizozim	105	

Yukarıda analizi yapılan proteinlerin elüsyon sonrası geri kazanımları gösterilmektedir. Çalışmamızda 4 proteine ait geri kazanımın çok iyi olduğu görülmektedir. Bu durum geliştirilen kolon materyali ile proteinlerin kalıcı bir etkileşime girmediğini ve bu nedenle tıkanma problemi olmaksızın uzun süreli kromatografik kullanıma uygun olduğunu göstermektedir. Kato et al. (1985) protein geri kazanımını etkileyen gradyent eğimi, akış hızı, pH, protein türü gibi faktörleri araştırmıştır. Kato'nun çalışmasında akış hızının geri kazanıma nadiren etki yaptığı, gradyent eğiminin artmasıyla küçük oranda bir geri kazanım artışı olacağı bulunmuştur. Protein geri kazanımını etkileyen en önemli faktör proteinlerin pI ve pH değerleri arasındaki ilişkidir. Çalışmalarda asidik ve nötr proteinlerin ayrılmasında kullanılacak katyon değiştirici kolonların düşük pH'larda çalışmasının uygun olmadığı vurgulanmıştır. Düşük protein geri kazanımının sebebi protein yapısındaki değişimden kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak kullanılan tuz çözeltisine bağlı olarak da geri kazanım değiştirilebilir. Aynı zamanda sıcaklığa bağlı olarak da geri kazanım değerlerinde iyileştirme yapılabilir.

4.5.5. Akış Hızı - Geri Basınç İlişkisi



Şekil 4.12. Kolon Akış Hızı Geri Basınç İlişkisi

Sentezlenen partiküllere ait geri basınç-akış hızı ilişkisi ise Şekil 4.12'de verilmiştir. Görüldüğü gibi kolon geri basınç değeri akış hızı ile lineer bir değişim göstermektedir. Bu davranış geliştirilen kolon materyalinin 0.1-2.0 mL/dak akış hızı aralığında HPLC basınç limitleri ile ilgili problem olmaksızın kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada öncelikle GMA-EDM bazlı monodispers ve gözenekli formda polimerik partiküller sentezlenmiş ve partiküller, poli(AMPS) (akril amido metil propan sülfonik asit) anyonik ligandlarına sahip iyon değişim kromatografisi (Ion Exchange Chromatography) kolon materyaline dönüştürülmüştür.

Partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Alınan SEM mikrografları temelinde ortalama partikül boyu 6.2 µm, değişim katsayısı (CV) ise % 4,3 olarak hesaplanmıştır.

Poli(DHPM-EDM) partiküllerin ortalama gözenek boyutu ve boy dağılımının belirlenmesi amacıyla BET yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz yardımıyla ortalama gözenek boyutu 33.3nm, gözenek hacmi 0.18 mL/g ve özgül yüzey alanı'da 21.1 m²/g olarak belirlenmiştir.

Anyonik polimerik liganda sahip poli(AMPS) partiküllerle hazırlanan iyon değişim kromatografik kolonu ile farklı mobil faz pH değerlerinde elde edilen sıvı kromatogramları incelendiğinde proteinlerin özellikle pH 7 ve pH 8 değerlerinde literatür ve ticari kolonlarla yapılan analizlere göre oldukça başarılı bir şekilde ayırdığı görülmektedir.

TTY değerleri farklı pH değerlerinde incelendiğinde artan pH değerleri ile TTY değerlerin düştüğü ve bu değerlerin literatürdeki değerlerin altında olduğu yani kromatografik performansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Poli(AMPS) bağlı kolonun tüm gradyent eğimlerinde proteinleri başarı ile ayırabildiği belirlenmiştir.

Poli(AMPS) kolonda artan akış hızı ile analiz süresinde belirgin bir kısalma olmuştur. Bunun yanında çözünürlük değerlerinde belirgin bir değişiklik ya da bir kayıp olmamıştır. Poli(AMPS) bağlı kolonda analiz süresi ve çözünürlük değerleri incelendiğinde 1.50 ml/dak akış hızı optimum değer olarak belirlenmiştir.

Kolonun tüm koşullarda protein geri kazanım değerleri kantitatif değerlerdedir.

6. REFERANSLAR

Almog, S. Reich, M. Levy, 1982, Br. Polym. J. , 14, 131.

Almog, Y., Levy, M., 1980, Effect of Initiator on the Molecular Weight Distribution In Dispersion Polymerization of Styrene, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 18, 1-11.

Çamlı T., Unsal E., Senel S., Tuncel A., 2004, Chromatographic Performance of Monodisperse-Macroporous Particles Produced by “Modified Seeded Polymerization”: II: Effect of Diluent/Seed Latex Ratio, I, Journal of Applied Polymer Science, 92, 3685-3696.

Çamlı T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., 2002, Functional, Uniform, and Macroporous Latex Particles: Preparation, Electron Microscopic Characterization, and Nonspecific Protein Adsorption Properties, Journal of Applied Polymer Science, 84, 414.

Çamlı T., 1999 , Production of monodisperse porous microbeads for bioaffinity chromatography.

Cawse, J. L., Lovell P. A., El-Aasser, M. S., 1997, Dispersion Polymerization, Emulsion Polymerization & Emulsion Polymers, Chichester, Wiley, pp:743-761.

Cheng, C. M., Micale, J., Vanderhoff, W., El-Aasser, M.S., 1992a, monodisperse Porous Particles: Formation of the Porous Structure, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed., 30, 235-244.

Cheng, C. M., Vanderhoff, W., El-Aasser, M.S., 1992b, Synthesis and Characterization of Monodisperse Porous Polymer Particles, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed., 30, 245-256.

Chromotography, Catalog 350, Alltech Associates, 1995, IL, ABD.

- Corner, T., 1981, Polyelectrolyte Stabilized Lattices: Preparation, Colloids and Surfaces, 119-129.
- Ellingsten, T., Aune, O., Ugelstad, J., Hagen, S., 1990, Monosized Stationary Phases For Chromatography, Journal of Chromatography, 535, 147-161.
- Galia, M., Svec, F., Frechet, J. M. J., 1994, Monodisperse Polymer Beads As Packing Material For High Performance Chromatography: Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in the Presence of Linear Polystyrene as a Porogen, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 32, 2169-2175.
- Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, 1985, Recovery of proteins in high performance ion exchange chromatography, Journal of High Resolution Chromatography Volume 8, Issue 3, Pages: 154-155.
- Liang Y.C., Svec F., Frechet J.M.J, 1995, Monodisperse polymer beads as packing material for HPLC. Preparation of macroporous poly(2,3-epoxypropyl vinylbenzyl ether-co-divinylbenzene) beads, their properties and application to HPLC separations. J. Polym. Sci., Polym. Chem., 33,2639-2646.
- Lewandowski, K.; Svec, F.; Frechet, J.M.J., 1998, Polar, Monodisperse, Reactive Beads from Functionalized Metacrylate Monomers by staged Templated Suspension Polymerization, Chem. Mater., 10, 385.
- Lok, K. P., Ober, C. K., 1985, Particle Size Control In Dispersion Polymerization of Styrene, Canadian Journal of Chemical Engineering, 63, 209-216.
- Ober C.K., Hair M.L.,1987, The effect of Temperature and Initiator Levels on The Dispersion Polymerization of Polystyrene, J. of Polym. Sci. :Chem. Ed., 25, 1395.
- Ober C.K., Hair M.L., 1985, Monodispersed, micron-sized Polystyrene Particles by Dispersion Polymerization, J. of Polym. Sci., 23, 103-108.

- Okuba, M., Nakagawa, T., 1992, Studies on Suspension and Emulsion, Preparation of Micron Size Monodispers Polymer Particles Having Highly Crosslinked Structures and Vinyl Groups By Seeded Polymerization of Divinylbenzene Using the Dynamic Swelling Method, *Colloids and Polymer Science*, 270,853-858.
- Paine, A. J., Luymes, W., Mc Nulty, J.,1990, Dispersion Polymerization of Styrene In Polar Solvents: Influence of Reaction Parameters On Particle Size and Molecular Weight in Poly(N-Vinylpyrrolidone) Stabilized Reactions, *Macromolecules*, 23, 3104-3108.
- Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J.,1997, Monodisperse Hydrolyzed Poly(glycidylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Beads as a Stationary Phase for Normal-Phase HPLC, *Analytical Chemistry*, 69, 3131.
- SGE, Inc. (Austin,Texas) Chromatography Products, 2001, <http://www.sge.com>.
- Smigol, V.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J., 1994a, High-Performance Liquid Chromatography of Complex mixtures Using Monodisperse Dual-Chemistry Polymer Beads Prepared by a Pore-Size-Specific Functionalization Process. A Single Column Combination of Hydrophobic Interaction and Reversed-Phase Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, 2129.
- Smigol, V.; Svec, F.; Fréchet, J.M.J., 1994b, Two Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Using Monodisperse Polymer Beads Containing Segregated Chemistries Prepared by Pore-Size-Specific Functionalization. Single-Column Combinations of Size Exclusion or Ion Exchange with Reversed-Phase Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, 4308.
- Smigol, V., Svec F. and J.M.J. Fréchet , 1993a , The use of polymeric catalyst in the pore-size specific functionalization of porous polymers. *Macromolecules* 26, 5615-5620.

- Smigol, V., Svec F. Smigol, V. and Svec F., 1993b , Preparation of uniform beads with enhanced hydrophilicity of pore surface, based on macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). Collect. Czechosl. Chem. Commun.58, 2605-2611.
- Smigol, V.; Svec, F.; Hosoya, K.; Wang, Q. and Fréchet, J.M.J., 1992a, Monodispersed polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography. Angew. Makromol. Chem. 195, 151-164.
- Smigol, V.; Svec F.; 1992b, Preparation and properties of uniform beads based on macroporous glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate copolymer: Use of chain transfer agent for control of pore-size distribution.
- Smigol ,V.,1992c, Synthesis and characterization of polystyrene particles with polar surface functionality J. of Polym. Sci. :Chem. Ed.33, 1107-1118.
- Svec, F., Frechet, J. M. J., 1996, New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis, Science, 273, 205-211.
- Tseng C. M., Lu Y.Y., El Aasser M.S., Vanderhoff J.W., 1986,Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerisation in Alcohol, Polymeric Materials Science and Engineering, 54, 362-366.
- Tuncel A., 1999, Electron Microscopic Observation of Uniform Macroporous Particles: II. Effect of Divinylbenzene Concentration, Journal of Applied Polymer Science, 71, 2291-2302.
- Tuncel A., Tuncel, M., Salih, B.,1999, Electron Microscopic Observation of Uniform Macroporous Particles: I. Effects of Seed Latex Type and Diluent, Journal of Applied Polymer Science, 71, 2271-2290.
- Tuncel A., Kahraman R. , Paksin E., 22 February 1994, Monosize polystyrene latices carrying functional groups on their surfaces Journal of Applied Polymer Science Volume 51, Issue 8, pages 1485-1498.

- Tuncel A., Kahraman R. , Pıksin E., 10 October 1993, Monosize polystyrene microbeads by dispersion polymerization Journal of Applied Polymer Science Volume 50, Issue 2, Pages: 303-319.
- Ugelstad et al., 1 March 1979, A two step swelling process of polymer particles giving an enormous increase in absorption capacity, Die Makromolekulare Chemie Volume 180, Issue 3, Pages: 737-744.
- Ugelstad J., March 1978, Swelling capacity of aqueous dispersions of oligomer and polymer substances and mixtures thereof, Die Makromolekulare Chemie Volume 179, Issue 3, Pages: 815-817.
- Unsal E., Camli S.T., Elmas B., Tuncel M., Senel S., Tuncel A.,2004a, Monodisperse-Porous Poly(Styrene-Divinyl Benzene) Beads Providing High Column Efficiency In Reversed Phase HPLC, Journal of Applied Polymer Science, in pres.
- Unsal E., Camli S.T., Irmak T., Tuncel M., Tuncel A., 2004b, Monodisperse poly(styrene-co-divinylbenzene) particles (3.2 μm) with relatively small pore size as HPLC packing material, Chromatographia, 60, 553–560.
- Unsal E., Camli S.T., Senel S., Tuncel A., 2004c,Chromatographic Performance of Monodisperse-Macroporous Particles Produced by “Modified Seeded Polymerization”: I: Effect of Monomer/Seed Latex Ratio, Journal of Applied Polymer Science, 92, 607-618.
- Unsal E., Camli S.T., Tekşen T., Tuncel M., Tuncel A, 2004d, Hydroxyl Functionalized Uniform-Porous Beads: Synthesis and Chromatographic Use, Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry, in press.

Unsal E., Camli S.T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., 2004e, Monodisperse-Porous Particles With Different Polarities By “Modified Seeded Polymerization” And Their Use As Chromatographic Packing In HPLC Reactive and Functional Polymers, 61, 353–368.

Wang, Q. C., Svec, F., Frechet, J. M. J., 1994, Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodispers Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 32, 2577-2588.

Williams Peter A., 1988, Recent Developments in Ion Exchange.

Yamomato S., 1988, Ion Exchange Chromatography of Proteins.

7. EK AÇIKLAMALAR : Protein Geri Kazanımının Hesaplanması

Protein geri kazanımı değerinin bulunması için analit, kolonlu ve kolonsuz olmak üzere sisteme enjekte edilir. Dedektörden elde edilen piklerin altında kalan alan kolonlu ve kolonsuz sistem için hesaplanır. Geri kazanım yüzdesinin matematiksel olarak ifadesi şu şekildedir;

Kolonlu sistemde elde edilen analit pikinin altında kalan alan $\times 100$

Kolonsuz sistemde elde edilen analit pikinin altında kalan alan

Kolona ayrı ayrı enjekte edilen her bir protein için kolonlu ve kolonsuz şekilde kromatogramlar elde edilmiş ve bu farklı piklerin altında kalan alanın hesaplanarak birbirine oranlanmasıyla çizelge 4.4. 'deki değerler elde edilmiştir.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erdem Özer

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 08.06.1980

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durum :

Lise : 1994-1997 TED Ankara Koleji

Lisans : 1997-2002 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi ,Kimya Mühendisliği

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : PETKİM Aliğa Rafinerisi , İzmir, 1999 (Staj)

MKE Nitroselüloz Fabrikası ,Kırıkkale, 2003-