T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

17β-ESTRADİOL UZAKLAŞTIRILMASINA YÖNELİK HİDROFOBİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI

Osman KİREÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Eylül 2016

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Osman KİREÇ tarafından yapılan "17β-Estradiol Uzaklaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Nanopartiküllerin Hazırlanması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Üye : Yrd. Doç. Dr. İhsan ALACABEY

Danışman : Yrd. Doç. Dr. M.Hüseyin ALKAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 20/09/2016

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2016

Doç. Dr. Sevtap SÜMER EKER

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı hazırlarken, bilgi ve birikimlerinden sıkça faydalandığım, katkılarını esirgemeyen ve bana yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. M. Hüseyin ALKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi' nin olanaklarından faydalanmamı sağlayan çalışma grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya ECZACILIK 16.002 araştırma projesi olarak maddi destek veren DÜBAP' a teşekkür ederim.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak, beni her konuda destekleyen sevgili aileme ve özellikle çevirilerde bana yardım eden kardeşim Veysel KİREÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……...**I**

İÇİNDEKİLER..... ...**II**

ÖZET ....**V**

ABSTRACT…….…….…....**VI**

ÇİZELGE LİSTESİ.....…**VII**

ŞEKİL LİSTESİ…….……..…….**VIII**

KISALTMA VE SİMGELER……..……..……**IX**

1.GİRİŞ…….……..1

2.KAYNAK ÖZETLERİ…….…..…..……3

2.1. Endokrin Sistem 3

2.2.17β-Estradiol (E2)… 5

2.3.Endokrin Bozucular 8

2.4.Afinite Kromatografisi 12

2.4.1.Matriks Seçimi.....13

2.4.2.Ligand Seçimi.....14

2.4.3.Uzantı Kolu…..... .15

2.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi….....17

2.4.5. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini Etkileyen Faktörler.....19

2.4.5.1. Ligand Tipi ve Miktarı.....19

2.4.5.2. Ana Matriksin Tipi.....21

2.4.5.3.Tuz Tipi ve Derişimi 21

2.4.5.4. pH Etkisi…….……...….22

2.4.5.5. Sıcaklık Etkisi……...23

2.1.5.6. Katkılar (Ek Kimyasallar)……..…23

2.2. Polimerizasyon…….…….….24

2.2.1. Polimerizasyon Yöntemleri…….....……25

2.2.1.1. Yığın Polimerizasyonu……..……26

2.2.1.2. Çözelti Polimerizasyonu…….…….…….……26

2.2.1.3. Süspansiyon Polimerizasyonu…….…….…….…....26

2.2.1.4. Dispersiyon Polimerizasyonu……..……...…….....…27

2.2.1.5. Emülsiyon Polimerizasyonu…….…….…….....27

- Mikroemülsiyon Polimerizasyonu…….…….…….…...28

-Mikroemülsiyon Polimerizasyonunun Mekanizması ve Kinetiği…….…..……..30

-Fonksiyonel Grup Eklenmesi…….……..34

2.3. Önceki Çalışmalar. 35

3.MATERYAL VE METOT 41

3.1.Kullanılan Kimyasallar 41

3.2.Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması 41

3.2.1. N-Metakriloilamidofenilalanin Sentezi..... 41

3.2.2. Poli(HEMA- MAPA) Nanopartiküllerin Hazırlanması..... 42

3.3. Poli(HEMA- MAPA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu……43

3.3.1.Yüzey Morfolojisi ve Ortalama Partikül Boyutu 43

3.3.2.FTIR Çalışmaları..... 43

3.3.3.Yüzey Alanı Ölçümü(BET) 43

3.4. 17β-Estradiol Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalişmalari……...44

3.4.1. 17β-Estradiolün Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu 44

3.4.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik…….....…….....44

4.ARAŞTIRMA BULGULARI 45

4.1.poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin karakterizasyonui 45

4.1.1.Yüzey Morfolojisi.....45

4.1.2.Yüzey Alan Ölçümleri(BET)……..……..…….…….45

4.1.3.FTIR Çalışmaları……...……..……47

4.2. 17β-Estradiolün Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu 48

4.2.1. 17β-Estradiolün poli(HEMA-MAPA) Üzerine Adsorpsiyonu…….…….…...48

4.2.1.1. 17β-Estradiolün derişiminin etkisi 48

4.2.1.2. İyonik şiddetin etkisi…….....……49

4.2.1.3. Sıcaklığın etkisi……...50

4.2.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik 51

4.2.3.Adsorpsiyon Modelleri..... ..52

5.TARTIŞMA VE SONUÇ……..……..……...57

6.KAYNAKLAR……..……..……...59

ÖZGEÇMİŞ ……..…..……...……..70

ÖZET

17β-Estradiol Uzaklaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Nanopartiküllerin Hazırlanması

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Osman KİREÇ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2016

Nanopartiküller, günümüzde, değişik alanlarda birçok uygulamaya sahiptir. Bu çalışmada, çevre sularında endokrin bozucu olarak bulunan 17β-Estradiol hormununu yüksek kapasite ve düşük maliyetle saflaştırılabilmesi için mevcut yöntemlere alternatif olarak hidrofobik nanopartiküllerin geliştirilmesi ve bu adsorbentin 17β-Estradiol saflaştırma performansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Adsorbent olarak poli(2-hidroksietil metakrilat-metakriloilamido fenilalanin) [poli(HEMA-MAPA)] nanopartiküller kullanılmıştır. Poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri; sulu dağıtım ortamında, HEMA ve MAPA monomerlerin mikroemülsiyon polimerizasyonu ile üretilmiştir. Nanopartiküller; Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskop (SEM) yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

Kullanılan poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin boyutu 120-200 nm olarak ölçülmüştür. Adsorpsiyon deneyleri, farklı ortam koşullarında (17β-Estradiol derişimi, sıcaklık, iyonik şiddet) kesikli sistemde incelenmiştir. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin 17 β-estradiol adsorpsiyon kapasitesi 98.4 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 10 kez tekrarlanmış ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir düşüş gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Protein Saflaştırılması, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, 17β-Estradiol, Nanopartiküller, poli(HEMA-MAPA)

ABSTRACT

The Preparation of Hydrophobic Nanoparticles for Removal of 17β-Estradiol

MSc THESIS

Osman KİREÇ

UNIVERSITY OF DICLE
INSTITUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2016

At the present time, Nanoparticles have various application areas. In this study, to distillate 17β-Estradiol that exists in environmental water as endocrine disrupters with high capacity and low costs, it is aimed to develop hydrophobic nanoparticles as alternative to the available methods and to find out the 17β-Estradiol distillation performance of the adsorbent.

Poly(2-hydroxyethyl methacrylate-methacryloyl amido phenylalanine) [poly (HEMA-MAPA)] nanoparticles were used as adsorbent. Poly (HEMA-MAPA) nanoparticles were produced via micro emulsion polymerization of HEMA and MAPA monomers in the aqueous distribution environment.

Nanoparticles were characterized with Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) techniques (FTIR). The dimension of the poly(HEMA-MAPA) nanoparticles that were used, were measured as 120-200 nm. Adsorbsion experiments were investigated in different enviromental conditions (17β-Estradiol, concentration, temperature, ionic strength) in the batch system. 17 β-estradiol adsorbsion capacty of poly(HEMA-MAPA) nanoparticles was found out as 98.4 mg/g. Adsorption-desorption cycle redone 10 times and an important decrease wasn't observed at the the adsorbtion capacity.

Key words: Protein Purification, Hydrophobic Interaction Chromatography, 17β-Estradiol, Nanoparticles, poly (HEMA-MAPA).

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Endokrin bozucuların etki mekanizmaları	10
Çizelge 2.2.	Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler	12
Çizelge 2.3.	Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri	14
Çizelge 2.4.	Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand grupları	15
Çizelge 2.5.	Afinite kromatografisinin dalları	17
Çizelge 4.1.	17β-Estradiol adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.	55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Hedef hücrelerdeki hormonal sinyal iletiminin prensibi	4
Şekil 2.2.	E2'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri	6
Şekil 2.3.	Endokrin bozucuların etki mekanizmaları	11
Şekil 2.4.	Afinite kromatografisindeki temel basamakların şematik gösterimi	13
Şekil 2.5.	Uzantı kolun fonksiyonunun temeli	16
Şekil 2.6.	Hidrofobik etkileşim kromatografisinde (A) Alkil zincirinin uzunluğunun; (B) Ligand miktarının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi	20
Şekil 2.7.	HEK için bazı ligandların yapılarının şematik olarak gösterilmesi	20
Şekil 2.8.	(A) Holfmeister serileri salting-out ve salting-in etkileri; (B) Suyun molal yüzey gerilimine bazı tuzların bağıl etkileri	22
Şekil 2.9.	Önerilen partikül oluşum mekanizması	28
Şekil 3.1.	Poli(HEMA- MAPA) nanopartiküllerin sentezinde kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik gösterimi.	42
Şekil 4.1.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin SEM görüntüsü a (5 μm) , b (10 μm)	46
Şekil 4.2.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin moleküler formülü	47
Şekil 4.3.	(A) MAPA (B) Poli(HEMA-MAPA)'ya ait FTIR spektrumu	48
Şekil 4.4.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri ile 17β-Estradiolün adsorpsiyonuna 17β-Estradiolün başlangıç derişiminin etkisi	49
Şekil 4.5.	İyonik şiddetin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi	50
Şekil 4.6.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller 17β-Estradiol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	51
Şekil 4.7.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin tekrar kullanılabilirliği	52
Şekil 4.8.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için Langmuir adsorpsiyon İzotermi	53
Şekil 4.9.	Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için Freundlich adsorpsiyon İzotermi	54

KISALTMA VE SİMGELER

AAc	Akrilik asit
AIBN	Azobisisobutüronitrile
AM	Akrilamid
AMBN	2,2-Azobis(2- metilbütironitril)
APS	Amonyum persülfat
CTAB	Setiltrimetil amonyum bromür
DES	Dietilstilbestrol
DDE	Diaminodifenileter
DDT	Dikloro-difenil-trikloroetan
DTAB	Dodesiltrimetil amonyum bromür
E1	Estron
E2	17β- estradiol
E3	Estriol
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
HEK	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HGLU	Glukoronik asit
HSUL	Sülfürik asit
KPS	Potasyum per sülfat
MA	Metil akrilat
MAPA	N-Metakriloilamidofenilalanin
MBDB	Metakriloyloksundesil bütilmetilamonyum bromür
MMA	Metil metakrilat
PA	Fenilalanin
Poli(HEMA-MAPA)	Poli(2-hidroksiletil metakrilat-N- metakriloilamidofenilalanin)
PVAL	Poli(vinil alkol)
SEAAU	Sodyum11-(N-etilakrilamido)undekanoat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SHBG	Seks hormon bağlayıcı globülinler

1. GİRİŞ

Çeşitli kaynaklardan çevre sularına karışan birçok kirletici, endokrin bozucu kimyasal olarak davranır ve endokrin sistemin normal fonksiyonlarını etkileyebilir. Endokrin bozucu kimyasallara maruz kalma doğal yaşam ve insanlar üzerinde olumsuz etkilere neden olur. Bireysel etkiler daha sonra tüm toplumu etkileyecek şekilde ilerleyebilir.

Endokrin bozukluğunun ilk vakaları insanlarda 1950 ve 60'larda görülmeye başlanmıştır. O zamanlarda pestisit olarak kullanılan diklorodifeniltrikloroetan (DDT)'ın, östrojenik olduğu ve besin zincirine katıldığı, memeli ve kuşlarda üreme sistemini etkilediği gösterilmiştir (Birkett 2003). Diğer bir sentetik östrojen, dietilstilbestrol (DES), 1970'lerin başında yasaklanana kadar beş milyondan fazla hamile kadına ani düşüklerin önlenmesi için reçete edilmiştir. Daha sonra DES'in üreme sisteminin gelişmesini etkilediği ve doğan çocuklarda vajinal kansere neden olduğu belirlenmiştir (Birkett 2003). Yaklaşık 40 yıl sonra DES'e maruz kalan kadınların çocuklarının, kullanmayanlara göre prematüre doğum ve ani düşük yapma olasılığının çok daha yüksek olduğu, ayrıntılı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Doğan erkek ve kız çocuklarında ciddi üreme sistemi bozuklukları, sperm sayılarında düşme, davranışlarda değişiklikler ve kanser oluşma riskinin yükseldiği gözlenmiştir (Kauffman 2000). Bu sonuçlar anne karnındayken bile bu ilaçlara maruz kalmanın uzun vadeli etkilerini ortaya koymuştur. Endokrin bozucu kimyasalların insanlar üzerindeki etkileri bazı endüstriyel kazalar sonucu yüksek dozlara maruz kalma, besinlerin kirlenmesi ve çevreye salınan pestisit ve kirleticilerle de ortaya çıkabilir (Colborn 1997).

Doğal yaşamda endokrin bozucuların etkileri en çok üreme sistemi ve gelişme anormallikleriyle ortaya çıkmaktadır. Doğal hormon 17β-estradiol ve yapay doğum kontrol hapı 17α-etinilestradiol en potansiyel östrojenlerdir. Bu ve benzeri kimyasallar atık su işleme tesislerinden çevre sularına karışmakta ve düşük derişimlerde bulunmaları bile balıkların üremesi üzerinde değişikliklere yol açmaktadır (Routledge 1998). Lahnsteiner ve ark.'larının yaptıkları (2009) çalışmada erkek gökkuşağı balığı 0.5-2.5 ng/L 17β-estradiol derişimine maruz bırakılmış ve 17β-estradiol(E2)'ün ≥ 1 ng/L derişimlerde semen hacmini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Larsson ve ark. (1999) ve Routledge ve ark. (1998), 17α-etinilestradiolün 0.1-10 ng/L derişimlerinde dahi balık ve diğer su canlıları için potansiyel tehlike olabileceğini gözlemlemişlerdir (Routledge ve ark. 1998; Larsson ve ark. 1998).

Aslında her yıl pazara giren çok sayıda kimyasalla birlikte çevre sularına karışan her kirletici çevredeki yaşamı etkilemektedir. Bu bağlamda bu kirleticilerin çevresel etkilerinin incelenmesi gerekliliği daha fazla kabul görmektedir. Buna bağlı olarak, çok düşük derişimlerdeki potansiyel toksik bileşikler için yeni tayin ve uzaklaştırma yöntemleri gerekmektedir.

Bu çalışmada, çevre sularında eser miktarlarda bulunan ve geleneksel yöntemlerle tayin edilmesi oldukça zor olan en tehlikeli endokrin bozucu maddelerden biri olan 17β-estradiolün Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) yöntemi kullanılarak poli(2-hidroksiletil metakrilat-N-metakriloilamidofenilalanin) [poli(HEMA-MAPA)] ile olan etlileşimine bağlı olarak sulardan tayini ve saflaştırılması amaçlanmıştır.

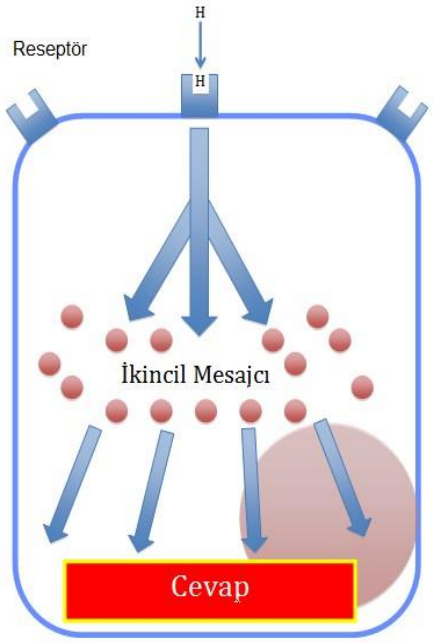
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.Endokrin Sistem

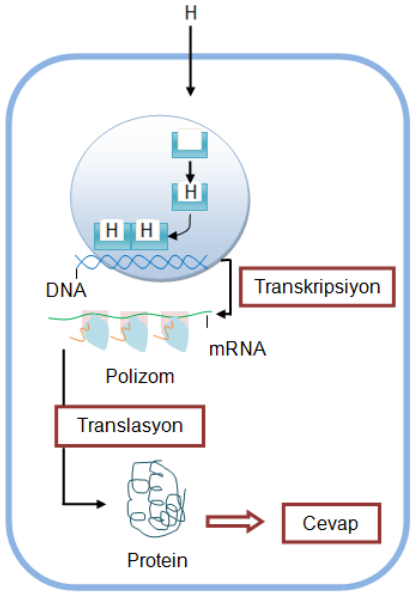
Organizmada gerçekleşen bir çok aktivite sinir sistemi ve endokirin (iç salgı sistemi) sistem tarafından koordine edilip düzenlenmektedir. Endokrin sistem, salgıladıkları aktif kimyasal aracılarla hücrelerin ve organların birbirleri ile haberleşmesini, birçok aktivitenin koordinasyonunu, iç ve dış etkilere uygun yanıtlar verilmesini, büyümeyi, üremeyi kontrol eden bütünleyici ve düzenleyici bir sistem olarak görev yapmaktadır (Rhoades 1995).

Endokrin bezlerin salgıladığı kimyasal aracılara "hormon" adı verilir. Bayliss ve Starling 1902 yılında ilk kez hormon kelimesini kullandılar ve bu kelime Yunanca kökenli olup, "harekete geçirmek" ya da "bir organı çalıştırmak" anlamına gelmektedir (Hillier 2005). Hormon endokrin bezlerde, özelleşmiş hücreler tarafından sentezlenir ve kan yoluyla fizyolojik ve biyokimyasal etkiler gösterdikleri hedef organlara taşır. Hedef organlarda, hormonal sinyali alan hedef hücreler bulunur. Bu spesifik hedeflenmiş hücreler, hormonu bağlayan hormon reseptörlerine sahiptir. Bir hormonun bağlanması, hücreye bilgi aktarır ve bir tepkiyi başlatır. Bir mesajın, bir hormondan bir hedef hücreye aktarılmasında iki farklı yol mevcuttur. Bu farklılık hormonun hidrofobik (lipofilik) veya hidrofilik karakterde olmasına bağlıdır. Hidrofilik hormonlar hücre membranında etki gösterirken; lipofilik hormonlar hücreye girip etkilerini çoğu zaman çekirdek üzerinde gösterirler. Hidrofilik hormonlar,hücre membranını geçemeyen hücre membranın dışındaki spesifik reseptörlere bağlanarak hücre membranının iç kısmında hücre cevabı olan ‘‘ikinci mesajcı’’ların sentezini başlatan hormonlardır.Bu hormonlara amino asitten türeyen hormonları, peptid hormonları ve proteohormonları örnek olarak verilebilir. Lipofilik (hidrofobik) hormonlar ise yağ tipi çözücülerde çözünme özelliği olan hormonlardır. Lipofilik hormon olan steroid hormonlar hücre membranını geçer ve hedef hücrelerinin içindeki spesifik reseptörlerine bağlanırlar. Hormon reseptör kompleksi daha sonra çekirdekte belirli genlerin transkripsiyonu üzerinde etkisini gösterir. Belirli mRNA moleküllerinin artan (ya da azalan) sentezi, karşılık gelen proteinlerin miktarlarının değişmesine yol açar. Bu da daha sonra bir hücresel cevabı harekete

geçirir (Şekil 2.1) (Jan Koolman ve Klaus-Heinrich 2003).



(a)



(b)

Şekil 2.1. Hedef hücrelerdeki hormonal sinyal iletiminin prensibi.(a) Hidrofilik hormonlar, (b) Lipofilik hormonlar (Jan Koolman ve Klaus-Heinrich 2003).

Steroid hormonları lipid yapısındaki hormonların en önemlilerinden olup, klinik durumlarının aydınlatılması ve özellikle bunların biyolojideki rolleri olan gelişim, farklılaşma, üreme ve hemostazdaki etkinliklerinin çözülmesi günümüzde önem kazanmıştır. Son yıllarda popülerliği oldukça artmış olan steroid yapısındaki hormonlardan biri de östrojenlerdir (Burçak 2002).

Östrojen hormonunu ilk kez 1923 yılında Allen ve Doisy tarafından domuzların folikül sıvısında tespit edilmiştir (Allen ve Doisy 1923). Elde edilen bu madde yumurtalıkları çıkarılmış farelere enjekte edildiğinde kızgınlık (östrus) meydana getirdiği için östrojen adı verilmiştir (Yılmaz 1999).

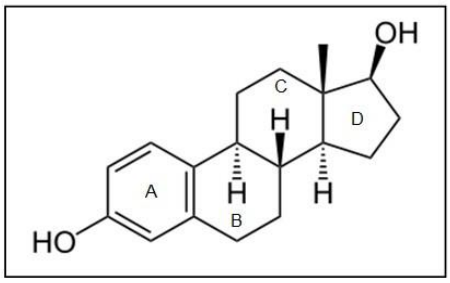
Kadınlarda ve erkeklerde östrojen hormonu bulunmakta olup kadınlardaki seviyesi üreme döneminde erkeklerden oldukça yüksektir. Yumurtalıkların teka interna hücrelerinde östrojen etkisi gösteren 20'den fazla kimyasal bileşik tanımlanmıştır. Dolaşımda bulunan doğal östrojen hormonlarının başlıcası 17β-estradiol (E2), estron (E1) ve estriol (E3)'dür. Bunların içinde, cinsel olgunluğa erişmiş bir kadının kanında en fazla bulunan ve en etkili olan östrojen hormonu yumurtalık kaynaklı olan 17β-estradioldür (Bayraktar 1996). Diğer bileşiklerin östrojenik aktivitesi ölçülürken 17β-estradiol referans alınarak bağıl değerleri rapor edilmektedir (Zava ve Duwe 1997).

2.2. 17β-Estradiol (E2)

17β-Estradiol(E2), östrojenlerin en önemli temsilcisidir. Yumurtalıklar tarafından ve hamilelik esnasında plesanta tarafından da sentezlenir. Erkeklerde de bulunur; fakat çok daha düşük derişimlerdedir. Dişilerde seks hormonlarının gelişimini, ikincil cinsiyet karakterlerinin meydana gelmesini ve devam etmesini sağlayan E2 nin diğer steroid hormon sentezi yapan bezlerdeki gibi, sentezi kolesterol üzerinden başlamaktadır (Jan Koolman ve Klaus-Heinrich 2003; Weigel ve Rowan 2001). Diğer tüm steroidler gibi, E2 siklopentanoperhidrofenantren halka yapısı içeren bir bileşiktir. Temel olarak bir siklopentanhalkasına bağlı (D), fenantrene benzeyen (A, B ve C halkaları) siklik çekirdek içerir (steron-siklopentano perhidrofenantren yapısı). E2 hormonunun yapısında aromatik A halkasının, 3. karbon (C3) atomunda bulunan fenolik

hidroksil grubu ile beraber 17. karbon (C17) atomunda hidroksil grubu yer almaktadır (Birkett ve ark. 2003; Khanal ve ark. 2006).

Molekül Formülü : $C_{18}H_{24}O_2$
Molekül Ağırlığı : 272.38 g/mol
Sudaki Çözünürlüğü: 3.6 mg/l[(a)]
Organik Çözücülerdeki Çözünürlüğü: Çoğu organik çözücüde çözülebilir
pKa: 10.4[(b)]
Dağılma Katsayısı (Log Kow): 4.01[(c)]
Kaynama Noktası: 180°C [(d)]
Henry Kanunu Sabiti: 6.3 x 10^{-12} atm.m^3/mol[(e)]
Buhar Basıncı: 2.3 x 10^{-10} mmHg[(f)]



Şekil 2.2. E2'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri (a:Hakk ve ark. 2005; b: Nghiem ve ark. 2004; c: Lai ve ark. 2000; d: Grady ve ark. 1973; e: Lai ve ark. 2002b; f: Lai ve ark. 2000).

Sentez edilerek kana verilen östrojen hormonu depo edilememektedir. Serumda E2'in %97'den fazlası plazma proteinlerine bağlı olarak taşınmakta olup, bunun %60'ı albümine, geri kalanı ise seks hormon bağlayıcı globülinlere (SHBG) bağlı haldedir. Hormonun sadece % 1-3 kadarı kanda serbest şekildedir. E2'in serbest ve albümine bağlı fraksiyonları biyolojik olarak aktiftir (Menteş 2002).

Östrojen hormonların enzimatik inaktivasyonu genellikle karaciğerde hidroksillenme, yükseltgenme, indirgenme, metillenme ve en son basamakta meydana gelen glukoronik asit (HGLU) ve sülfat konjügasyonuyla olmaktadır. Östrojenlerin glukuronik asit (HGLU) veya sülfat grupları ile C3 veya C17 pozisyonu üzerinden esterleşmesiyle konjuge östrojenler oluşur. Konjüge östrojenler biyolojik aktivite içermezler ve sulu çözeltilerde konjüge olmayan östrojenlere oranla daha iyi çözünürler. Östrojenlerin HGLU veya HSLU ile tepkimeye girmesi östrojenleri biyolojik olarak inaktif yapar ve vücuttan atılabilir forma dönüştürür (Khanal ve ark. 2006). Östrojenler

steroid omurgasını içerdiğinden ve memeliler steroid omurgasını yıkamadıkları için konjüge östrojenler idrar ile ve bir dereceye kadar da safra ile atılır (Rosselli ve ark. 2000; Zhu ve Conney 1998). Bu konjüge östrojenler dışkıdaki E.coli bakterileri varlığında östrojene ve glukoronik/sülfürik asite (HGLU/HSUL) hidrolizlenirler. Konjüge östrojenlerin, östrojenlere hidrolizi termodinamik açıdan geri dönüşümsüz olduğu varsayılır. Hidroliz için gerekli enzimler Eİ–3,(17)-GLU/SLU için sırasıyla GLUaz ve SULaz diye adlandırılır (i=1,2,3). Eİ–3,(17)-SLU'hidrolizi Eİ–3,(17)-GLU'ya göre daha zordur. Bu yüzden Eİ–3,(17)-SLU, Eİ–3,(17)-GLU'ya göre doğada daha kararlıdır ve kent atık sularında, atık su arıtma sistemlerinde Eİ–3,(17)-SLU varlığı rapor edilirken, Eİ–3,(17)-GLU bulunamamıştır (Ternes ve ark. 1999b; D'Ascenzo ve ark. 2003). Konjüge östrojenlerin östrojenik aktivite göstermemeleri, bunların östrojenlere hidrolizi toplam östrojenik aktivitede artışla sonuçlanır (Khanal ve ark. 2006).

Bir hormonun hedefi olan hücreler, bu hormonu bağlayan ve hücresel etkilerini sağlayabilmek için özel moleküller içermektedir. Protein yapısındaki bu moleküller "reseptör" olarak adlandırılmaktadır. Östrojen reseptörlerinin östrojen reseptör a ve östrojen reseptör b olmak üzere iki alt tipi mevcuttur (Baxter ve Funder 1979; Mainwaring 1980; Enmarrk ve Gustafsson 1999).

Bütün reseptörlerde, hormonun bağlanabileceği bir veya birden fazla bölge bulunmaktadır (Pombo ve Castro-Feijóo 2005). Serbest reseptörler inaktiftir; ancak hormonun bağlanması ile oluşan değişiklikler bunlara deoksiribonükleik asit (DNA)'e bağlanma yeteneği kazandırmaktadır.

Hücrelerin plazma zarları lipid tabakasından oluştuğu için ve östrojenler lipofilik karakterde olduklarından östrojenler bütün hücrelere kolaylıkla girebilirler. Daha sonra sitoplazmada bulunan hidrofob proteinlere östrojenler bağlanırlar. Östrojenlerin etkinliğini işte bu hedef hücrelerinin sitoplazmalarındaki hidrofob proteinler yani bu özgül reseptörler belirlerler. Reseptöre bağlanan östrojen kompleksi daha sonra çekirdeğe göç eder ve kromatine oldukça sıkı bir şekilde bağlanır. Örneğin Steroid bir hormon olan 17β-Estradiol damardan verildiğinde hedef hücre çekirdeklerinde toplandığı görülmektedir. Daha sonra çekirdekteki özgül genleri etkileyerek mesajcı RNA'lar oluşturmakta ve bu mesajcı RNA'lar sitoplazmaya geçerek ribozomlarda yeni proteinlerin sentezini başlatmaktadırlar.17β- Estradiol(E2) tarafından

kontrol edilen proteinlerin sentez hızlarındaki değişim hormon cevabını ortaya çıkarmaktadır (Hortwitz ve McGuire 1980; Bagchi ve ark. 1992).

E2 hormonunun ikincil seks karakterleri üzerine (Weigel ve ark. 2001), hipotalamusa ve hipofize (Yılmaz 1999; Marshall 2001), koagülasyon ve fibrinolitik sistem üzerine (Tolbert ve Oparil 2001), protein sentezi üzerine (Gyllenborg ve ark. 2001), plazma kolesterolü üzerine (Wiliams ve ark. 1992; Kitler 1994), elektrolit dengesi üzerine (Stachenfeld ve ark. 1998), antiinsülin seviyesi üzerine (Sherwood 1991), deriye (Brincat ve ark. 2005) ve kemiklere (Yılmaz 1999) etkisi olduğu saptanmıştır.

2.3.Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular; endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştirerek organizmada veya organizmanın yavrularında istenmeyen etkilere yol açan ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedir. Bunu da hormonları etkileyerek, hormonları taklit ederek veya vücuttaki hücre reseptörlerini etkileyerek geçekleştirmektedirler. Endokrin bozucu maddeler doğal olarak bulunabildiği gibi sentetik ürünlerin içerisinde de bulunabilmektedirler (Lee 2007).

Steroid hormonlar; östrojen, progesteron, fitoöstrojenler doğal endokrin bozucular olarak tanımlanırken, sentetik üretilmiş hormonlar (dietilstilbesterol, 17α-etinilestradiol), DDT, dioksinler, furanlar sentetik endokrin bozuculardan bazılarıdır (Com 2001). Bunların dışında endokrin bozucu potansiyeli olan fungusitler, pestisitler, herbisitler, plastikler, boyalar ve çözücüler gibi kimyasal maddeler de vardır. Bu kimyasal maddelerin çoğunun yıkılması, zararsız hale getirilmesi zor olduğundan vücutta zararlı etkilerde bulunabilmektedirler ayrıca yağda çözünebildiklerinden yağ dokusunda birikmekte ve vücutta uzun süre kalmaktadırlar (Lee 2007; Solomon ve Schettler 2000).

17β-estradiol (E2), estron (E1) gibi doğal östrojenler ve 17α-etinilestradiol gibi sentetik östrojenler, insan ve hayvan tarafından idrar yoluyla çevreye ve atık sulara ulaşır. İnsan ve hayvan dışkıları kayda değer miktarda doğal

östrojen ihtiva etmektedir (Khanal ve ark. 2006). Geleneksel biyolojik atıksu arıtma tesislerinden ayrılan sudaki östrojenik hormon (özellikle 17β-estradiol, estron, estriol) derişimleri litrede birkaç nanogram (ng/L) ile birkaç mikrogram (µg/L) aralığındadır. Bu mikrokirleticiler endokrin bozucu kimyasal özelliğe sahiptir ve pek çok türün (insanlarda dahil) endokrin sistemine ng/L seviyesinde bile zarar verdiği saptanmıştır (Tyler ve ark. 2005; Purdom ve ark. 1994). Doğal steroid östrojen adı verilen insan ve hayvan kaynaklı steroid hormonlar, dışsal endokrin bozucu kimyasallar (EDC) ve sentetik kimyasallarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek östrojenik aktiviteleri ile karakterize edilmiş ve içsel steroid EDC olarak sınıflandırılmıştır (Water 21). İçsel steroid östrojenlerin dışsal EDC'lara göre 10,000-100,000 kat daha fazla östrojenik aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişler. Hayvan atıklarının uygulandığı toprak arazileri çevresel östrojenlerin bir diğer kaynağıdır.

Kümes hayvanlarının çöplerinin döküldüğü üretim arazilerinde östrojen derişimi araziye bitişik gölcük/havuz ve akarsularda 2350 ng/L'ye, toprakta ise 675 ng/kg'a yükseldiği tespit edilmiştir (Finlay-Moore ve ark. 2000). Atıksu temizleme işlemleri de bir diğer östrojen kaynağıdır (Layton ve ark. 2000). Bu kirleticilerin yüksek düzeylerinin biyokatılardan geldiği ve daha sonra biyokatı uygulama arazilerine geçtiği düşünülmektedir. Atıksu arıtma işlemleri sonucunda uzaklaştırılamamış östrojen ng/L seviyelerinde sulara geçtiğinde yüksek sorpsiyon özelliklerinden dolayı nehirlerde çökelti oluşturur (Williams ve ark.,1992; Baronti ve ark., 2000).

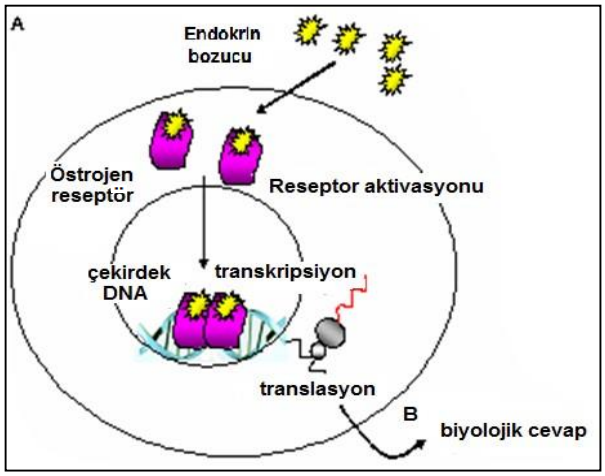
Endokrin bozucular kimyasal yapılarına göre değil, endokrin sistem üzerindeki etkilerine bakılarak tanımlanır. Ayrıca endokrin sistem üzerinde ortaya çıkacak olumsuz etki canlının endokrin bozucuya maruz kaldığı etkilenme süresi ve doz miktarı da etkilemektedir. Doz miktarı artıkça ve etkilenme süresi uzadıkça endokrin sistem üzerinde oluşan olumsuz etki artmaktadır(Lee 2007; Leif 2007). Endokrin bozucu maddelerin endokrin sistem üzerindeki etki mekanizmaları çok komplekstir. Çizelge 2.1'de endokrin bozucuların etki mekanizmaları ve örnekleri özetlenerek sunulmuştur.

Çizelge 2.1.Endokrin bozucuların etki mekanizmaları.

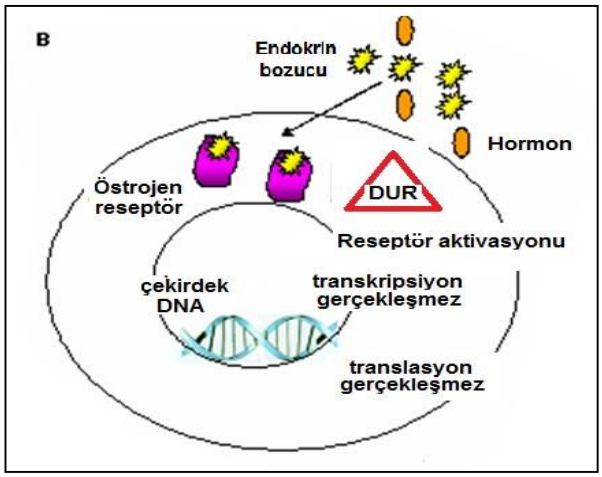
Tip	Mekanizma	Örnek
Agonistik etki	Bileşikler doğal östrojen olarak davranır, bağlanır ve östrojen reseptörünü aktive eder (Şekil 2.3.a).	Gökkuşağı alabalığındaki oosit olgunlaşması üzerindeki imidazol ve triazol fungusitler (Monod ve ark. 2004).
Antagonistik etki	Bileşikler östrojen reseptöre bağlanır fakat aktive etmez (hormon bloklayıcı) (Şekil 2.3.b).	DDE erkeklerde testosteronu bloke ederek gelişimsel problemlere neden olur (Birkett 2003).
Anormal cevap	Doğal hormonların üretiminde, taşınımında, metabolize olmasında ya da sekresyonunda aksaklıklar ve reseptörlerin işlev ve üretiminde aksaklıklar (Şekil 2.3.c).	Dioksin ve furanlar

Doğal yaşamda, endokrin bozucuların etkileri en çok üreme sistemi ve gelişme anormallikleriyle ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler birçok hayvan türünde (bazı balıklarda,kuşlarda ve memelilerde) cinsiyet bozukluklarına, cinsiyetsiz doğumlara, Sperm sayılarında azalmaya, sperm yapısında anormalliğe ayrıca insanlarda testis ve prostat ağırlığının azalması, uterus ve over ağırlığının artması, erkeklerde İnmemiş testis ve erken ya da geç ergenliğe girilmesi gibi sorunlara neden olabilmektedirler (Carlsen ve ark. 1992; Skakebek 2001). Ayrıca endokrin bozucular üreme sistemi dışında insanlarda hipofiz, hipotalamus, adrenal bez, tiroid, timus ve meme dokusu gibi organ ve dokuları etkileyerek çeşitli sistemlerin (büyüme , gelişme ve immünolojik sistemi gibi) etkilenmesine neden olur (Yokosuka ve ark. 2007; Kawato 2004; Fenton 2006; Waring ve Haris 2005; Pombo ve Castro-Feijóo 2005).

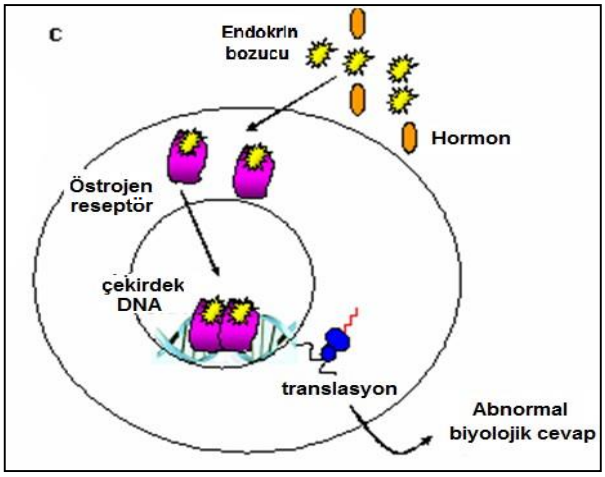
Her yıl kimyasal ve ilaç pazarına giren çok sayıda maddelerle birlikte çevre sularına karışan her kirleticinin ekosistem üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu inancı ve etkilerinin anlaşılması için detaylı incelemelerin gerekliliği giderek güçleşmektedir. Buna bağlı olarak, çok düşük derişimlerdeki potansiyel toksik bileşikler için yeni tayin ve uzaklaştırma yöntemleri gerekmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 2.3 Endokrin bozucuların etki mekanizmaları.(a) Agonistiketki,(b) Antagonistik etki, (c) Anormal cevap (Pocar ve ark., 2003).

2.4. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir (Denizli 2011).

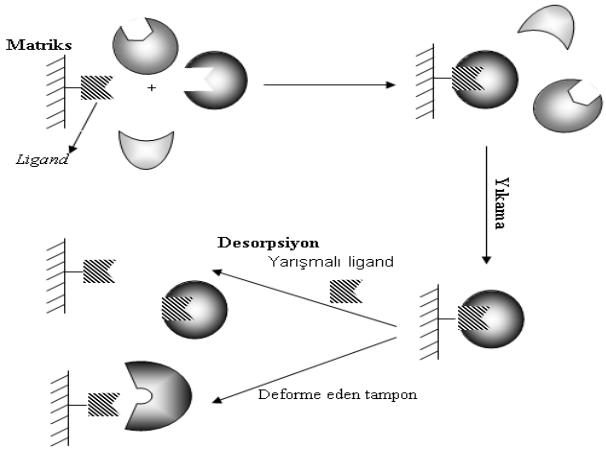
Klasik yöntemlerden farklı olarak, bu teknikte biyolojik moleküller çok seçici olarak "Biyolojik Tanıma" yeteneğine sahip "ligandlar" sayesinde saflaştırılmaktadır.

Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge2.2 ' de gösterilmiştir (Axen and Ernback 1971).

Çizelge 2.2. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.

Saflaştırılacak Madde	**Ligand**
Enzim	Substrat, kofaktör, inhibitör
Hormon, Vitamin	Taşıyıcı protein, reseptör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, Nükleik asit polimeraz, histon,bağlayıcı protein
Lektin	Glikoprotein, polisakkarit, hücre yüzey reseptörü, hücre
Hücre	Lektin, hücre yüzey spesifik proteini

Şekil 2.4' te afinite kromatografisinin temel basamakları gösterilmektedir. Afinite kromatografisinde matriks (katı destek madde), ligant ve uzantı kolundan oluşan kompleks yapı bulunur. Bu yapıda uzantı kolu her zaman bulunmaya bilir. Bu yapılar birbirine kovalent bağ ile bağlanmışlardır. Ayrılmak istenen madde (biyomolekül) ligant üzerinden kompleks yapıya fiziksel etkileşmeler ile adsorplanır (tutunur).



Şekil 2.4. Afinite kromatografisindeki temel basamakların şematik gösterimi (Öncel 2004)

2.4.1. Matriks Seçimi

Katı destek maddelerinin geliştirilmesi afinite kromatografisinin gelişmesindeki en önemli etmenlerden biridir. Katı destek aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

- Ortamda çözünmemelidir.
- Büyük iç yüzey alanı özelliğine sahip olmalıdır.
- Mikrobiyal ve enzimatik etkilere karşı dayanıklı olmalıdır.
- Non-spesifik adsorpsiyonu düşük olmalıdır.
- Ligantın bağlanması için fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır.
- Saflaştırılacak madde ile etkileşime girmemelidir.
- Yüksek sertlik ve uygun partikül yapısı bulunmalıdır.
- Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon ve desorpsiyon durumlarına karşı kimyasal olarak kararlı yapıya sahip olmalıdır.
- Hidrofilik karakterde olmalıdır (Alkan 2009).

Ticari olarak çok sayıda katı destek maddesi, bunların aktive edilmiş yapıları ve hemen kullanuma hazır hale getirilmiş afinite katı destek maddeleri bulunmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri

Tür	**Kimyasal Yapı**
Biyopolimerler	Agaroz, DekstranSelüloz
Sentetik kopolimerler	Poliakrilamid, poli (HEMA), polistiren
İnorganik malzemeler	Gözenekli cam, demir oksit
Biyopolimer/sentetik kopolimerler	Agaroz, poliakrilamid
İnorganik malzemeler/organik kopolimerler	Silika/hidrofilik kopolimerler

2.4.2.Ligand Seçimi

Afinite kromatografisinde kullanılacak bir ligandın iki önemli özelliği taşıması gerekir.

- Saflaştırılacak biyomolükül ile tersinir ve seçici bir kompleks oluşturmalıdır.
- Katı desteğe bağlanacak fonksiyonel gruplar içermelidir.

Bu özellikleri taşıyan pek çok ligand bulunmaktadır. Afinite kromatografisi yönteminin etkinliği afinite kromatografisi prensiplerinin pratiğe uygulanmasında kullanılan çeşitliliğe bağlıdır. Bu çeşitliliği etkileyen faktörler şunlardır:

- İstenilen amaca uygun ligandların çeşitliliği
- Grup-seçici ligandların kullanımı,
- Bir biyomolekülün saflaştırılması için ligandların çeşitliliği.

Farklı türde maddeler afinite ligantları olarak kullanılabilmektedir. Afinite ligantları yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olabileceği gibi düşük molekül ağırlıklı billeşikler ya da biyolojik işlevi olmayan moleküller de olabilirler. Ligandlara örnekler Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand grupları (Denizli 2011)

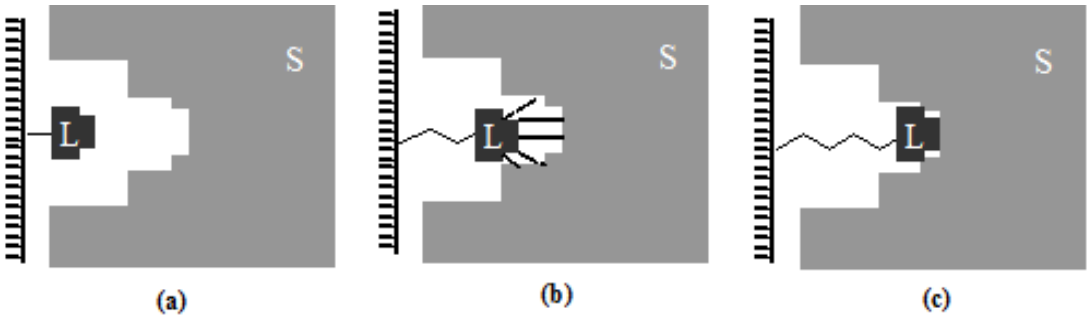
Uygulama Alanı	Ligand
Enzimoloji (enzimler, inhibitörler, kofaktörler)	Enzimler, substratlar ve analogları, ürünleri, inhibitörleri, allostarik efektörleri, kofaktörler, antibadiler, biolojik işlevi olmayan maddeler
Peptidler	Enzimler, antibadiler
İmmünoloji	Haptenler, antijenler, antibadiler
Protein kimyası (reseptörler, taşıma proteinleri, glikoproteinler)	Hormonlar, vitaminler, steroidler, lektinler, lipidler, antibadiler, mono- ve polisakkaritler
Nükleik asitler, nükleotidler	Nükleik asit bazları, nükleozidler, oligonükleozidler, dihidroksiboril türevleri
Hücre ve virüslerin izolasyonu	Antijenler, antibadiler, lektinler, hormonlar

Afinite ligandları seçicilik ve kapasite bakımından oldukça geniş bir dağılıma sahiptirler. Antijen-antibadi etkileşimi gibi yüksek afiniteli etkileşimler ve enzim substrat etkileşimleri gibi daha düşük afiniteli etkileşimler afinite kromatografisinde kullanılabilir.

Dar bir seçicilik aralığına sahip ligandın veya çok seçici bir ligandın kullanılması yüksek etkinlik ve saflıkta tek bileşiğin saflaştırılmasına olanak verir. Bu aynı zamanda saflaştırılacak her madde için özel bir ligand-matriks bileşimi gerektireceğinden bir dezavantajdır. Dolayısıyla grup-seçici ligandlar çok daha büyük pratik öneme sahiptir (Denizli 2011).

2.4.3. Uzantı Kolu

Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi genellikle molekülün içi kısımlarına doğru yerleşmiştir. Bu yüzden küçük ligandların (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlanması sonucu hazırlanan adsorbanlarda, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında istenmeyen etkileşimler meydana gelebilir. Bu durumlar da istenmeyen bağlanmaları ortadan kaldırmak için ligand ile matriks arasına uzantı kolu adı verilen moleküller sokulur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Uzantı kolun fonksiyonunun temeli **(a)** bağlanmama, **(b)** zayıf etkileşim, **(c)** ligand ve substrat arasında optimum etkileşim

Uzantı kolunun işlevini tam olarak yerine getirebilmesi için uzunluğu çok önemlidir. Eğer uzantı kolu çok kısa olursa, kol etkisiz kalır ve ligand numunedeki saflaştırılacak maddeyi bağlayamaz. Aksine uzantı kolu çok uzun olursa, spesifik olmayan etkiler fazlalaşır ve böylece ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları çok uzun uzantı kolu kullanarak yaptığı deneyde, uzantı kolunun numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını gözlemlemiştir. Spesifik olmayan bu hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisi için arzu edilen bir durum değildir (Ocarra ve ark. 1974).

Afinite kromatografisinin farklı yaklaşımlarla türevlendirilmesiyle değişik afinite uygulamaları ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerin çoğu kendine özgü bilimsel isimleriyle kabul edilmektedir. Bu yöntemlerin önemli bir bölümü Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Afinite kromatografisinin dalları (Denizli, 2011)

AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ
• Hidrofobik Etkileşim Kromatografi
• İmmünoafinite Kromatografisi
• Moleküler Baskılama
• Membran Afinite Kromatografisi
• Afinite Kuyruk Kromatografisi
• Kovalent Afinite Kromatografisi
• Lektin Afinite Kromatografisi
• Metal-Şelat Afinite Kromatografisi
• Boya Afinite Kromatografisi
• Reseptör Afinite Kromatografisi
• Perfüzyon Afinite Kromatografisi
• Zayıf Afinite Kromatografisi
• Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
• Kütüphane Türevli Afinite Sistemleri
• Afinite Çöktürme
• Afinite Kapiler Elektroforez
• Santrifüj Afinite Kromatografisi
• Afinite İtme Kromatografisi
• Tiyofilik Afinite Kromatografisi

2.4.4. Hidrofobik Etkileşim kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, biyomoleküllerin kendi yüzey hidrofobisitelerine(hidrofobik derecesine) göre katı destek malzemesinin yüzeyine

tutunması işlemidir. Ayırma işlemi hidrofilik (suyu seven) katı destek malzemesi üzerine immobilize edilmiş hidrofobik (suyu sevmeyen) ligand ile biyomolekülün hidrofobik kısımları arasında gerçekleşir (Jenissen, 2002).

İlk kez 1948 yılında Tiselius tarafından Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) tanımlanmıştır. Tiselius, "Biyomoleküllerin (proteinler ve diğer moleküllerin, çökmeleri için gerekli yüksek tuz derişimlerinden daha az tuz içeren çözeltilerde sıklıkla oldukça kuvvetli adsorbe olduklarını ve bazı adsorbentlerin, bir dereceye kadar yüksek tuz derişimlerinde mükemmel adsorbentler olurken, tuzsuz çözeltiler içinde, biyomoleküllerin hiç veya oldukça az afinite gösterdiklerini" belirtmiştir. 1948'de temeli belirlenmiş olan bu yöntem, kromatografik destek malzemelerinin ve destek malzemelere ligandların immobilize edilmesindeki yöntemlerin gelişmesine paralel olarak, 1970'lerden itibaren çeşitli hidrofobik adsorbentlerin senteziyle günümüze kadar hızlı bir gelişim göstermiştir.

Termodinamik açıdan hidrofobik etkileşim kromatografisinde (HEK), hidrofobik moleküller arasındaki etkileşim bir entropiye dayalı süreç olup bu durumda iki biyomolekül (proteinler gibi) arasındaki hidrofobik etkileşim bu süreç boyunca sıcaklık (T) ve basınç (P) sabit kaldığı göz önüne alınarak termodinamiğin ikinci kanuna dayanmaktadır. Eşitliği ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) düşünürsek, non-polar moleküller polar bir çözücü (genellikle su) ile etkileşime girer, hidrofobik molekülü çevreleyen çözücü moleküllerin düzenli dizilişi entropide azalışa neden olur ($\Delta S < 0$). Entalpi de (ΔH) önemli bir artış olmadığında Gibbs enerjisinde ($\Delta G > 0$) pozitif bir değişme meydana gelir. Dolayısıyla, non-polar bir molekül, polar çözücüde kendiliğinden çözünme meydana gelmemesi, termodinamik açıdan elverişsizdir.

Termodinamik durum bir polar çevrede iki veya daha fazla non-polar molekül yerleştiği zaman değişir. Bu durumda, hidrofobik moleküller hidrofobik etkileşimden dolayı birbirleri ile birleşirler ve bu yolda biyomoleküllerin hidrofobik yüzeyi polar çevreden saklanırlar. Entropi ($\Delta S > 0$), hidrofobik moleküllerin bileşimi ile çevresini düzenli bir şekilde saran çözücü moleküllerin azalmasına yol açar buda entropinin artışına yol açar. Bunun bir sonucu olarak, Gibbs enerjisi azalır ($\Delta G < 0$). Bu nedenle, hidrofobik etkileşim termodinamik olarak uygun hale gelir. Sonuç olarak, bir polar çözücü çözeltisinde iki veya daha fazla non-polar molekül arasındaki hidrofobik etkileşim entropi de bir değişim tarafından yönetilen kendiliğinden oluşan bir

süreçtir (Querioz ve ark., 2001).

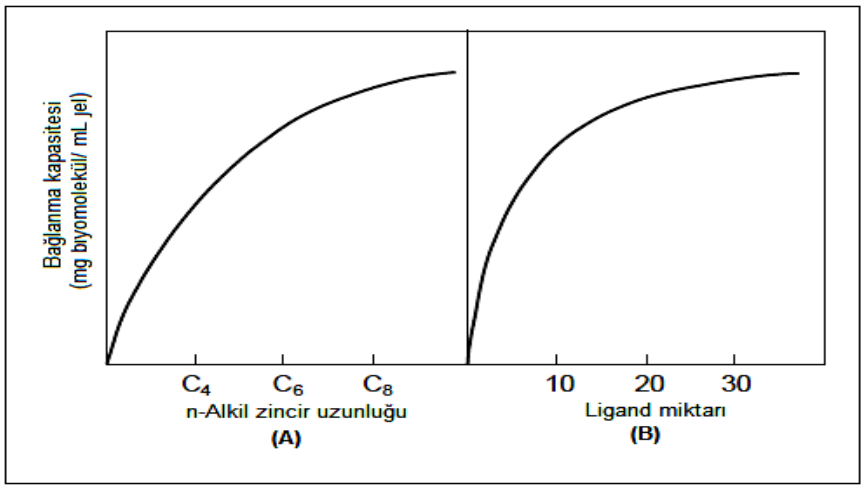
2.4.5. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini Etkileyen Faktörler

HEK ortamı ve ayırma işlem optimizasyonu için HEK' i etkileyen başlıca faktörler;

- Ligand tipi ve miktarı
- Ana matriksin tipi,
- Tuz tipi ve derişimi,
- pH,
- Sıcaklık,
- Katkılar (eklenen kimyasal maddeler)

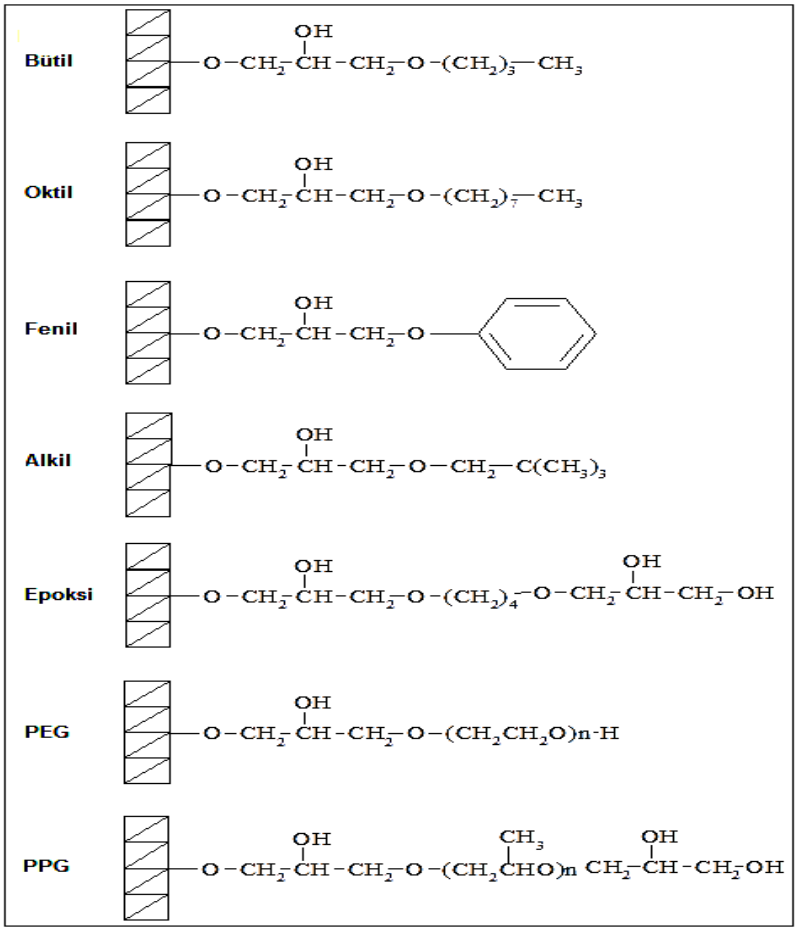
2.4.5.1. Ligand Tipi ve Miktarı

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan adsorbanların başlıca seçiciliğini belirleyen faktör immobilize ligand tipidir (alkil veya aril) (Hofstee ve Otillio, 1978; Hofstee, 1973; Shaltiel ve Er-el, 1973). Genel olarak düz zincir alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken aril ligandları karışık modda davranış sergiler (hem aromatik hem hidrofobik etkileşim) (Shaltiel ve Er-el, 1973). Sabit katılma derecesinde, bağlanma kapasiteleri kıyaslandığında alkil zincirlerinin uzunluğunun artmasıyla beraber HEK sorbentlerinin bağlanma kapasitesinin de arttığı Şekil 2.6.A' da görülmektedir. Ayrıca HEK sorbentinin bağlama kapasitesinin immobilize ligand miktarı arttıkça arttığı Şekil 2.6.B 'de görülmektedir. Aşırı miktarda ligand immobilizasyonunda ise bağlanma kapasitesi sabit kalırken etkileşim kuvveti artmaktadır (Jennissen ve Heilmeyer 1975; Rosengren ve ark., 1975; Maisano ve ark. 1985). Bu koşullar altında çözünenin, çok bölgeli bağlanmadan kaynaklı elüsyonu oldukça zordur (Jennissen, 1978).



Şekil 2.6. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde (A) Alkil zincirinin uzunluğunun ;(B) Ligand miktarının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi (Hofstee ve Otillio, 1978; Jennissen, ve Heilmeyer, 1975).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan bazı ligand yapılarının şematik olarak gösterimi Şekil 2.7'te verilmiştir.



Şekil 2.7. HEK için bazı ligandların yapılarının şematik olarak gösterilmesi (Öncel, 2004).

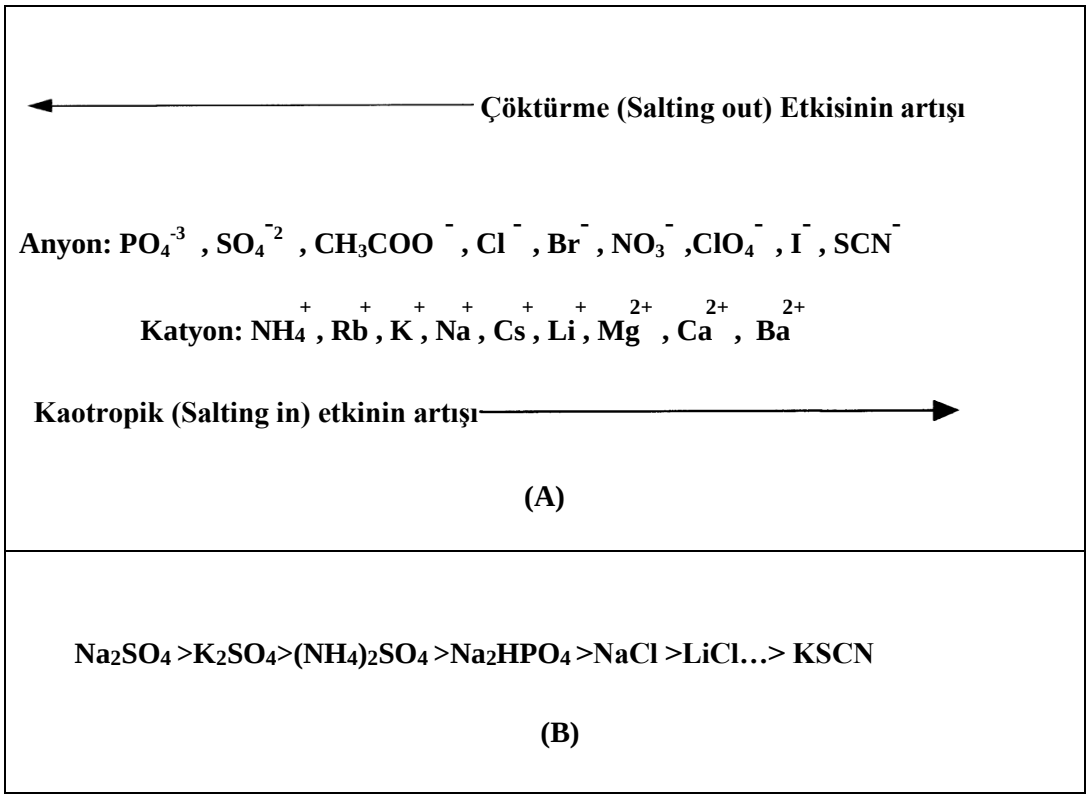
2.4.5.2.Ana Matriksin Tipi

Destek malzemeleri hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılırken hidrofilik ve adsorplanacak madde ile etkileşime girmeyecek şekilde seçilmelidir.Bu kriterlerde kullanılan matriks tipleri genelde agaroz veya sentetik kopolimer malzemeleridir (Jenissen, 2002).Yeni nesil hidrofilik destek malzemelerinin spesifik yüzey alanları ve adsorpsiyon kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle bunların kullanımı da yaygınlaşmıştır (Bayramoğlu ve ark. 2002). Poli(2–hidroksietil metakrilat), p(HEMA), polimerik malzeme olarak biyouyumluluğu ve hidrofilik karakteri yüksek olması nedeniyle biyomolekül immobilize edilmiş çalışmalarda çeşitli modifikasyonlarla (kopolimerizasyon) hidrofilik ve hidrofobik destek malzemesi olarak kullanılmaktadır (Arıca ve ark. 1997; 1999; Basri ve ark.1994 a,b).

2.4.5.3. Tuz Tipi ve Derişimi

Çeşitli tuzların yürütme ve dengeleme tamponuna eklenmesi ligand-biyomolekül etkileşimini hidrofobik etkileşim kromatografisinde artırır (Arakawa ve Narhi, 1991;; Narhi ve ark., 1989; Porath ve ark., 1973). Adsorplanan biyomolekül miktarı belli bir tuz derişimine kadar doğrusal olarak artar daha yüksek derişimlerde ise üstel bir şekilde artmaya devam eder.

Hidrofobik etkileşimlerin artırılması için kromatografide yüksek nötral tuz uygulaması benzil eter agaroz üzerine Porath (Porath ve ark., 1973) tarafından gerçekleştirilmiştir ve homojen seri Hjertén (Hjertén, 1973) tarafından oluşturulmuştur. Dahası mekanizmanın ispatı ve temel prensiplerin oluşturulması eş zamanlı gerçekleşmiş ve adsorpsiyon ve elüsyon üzerine tuzların etkileri rapor edilmiş ve Hofmeister serisi oluşturulmuştur (Jenissen ve Heilmeyer, 1975; Raibaud ve ark., 1975).Holfmeister serileri, hidrofobik etkileşim kromatografisinde tuz etkilerini biyomoleküllerin çöktürülmesi veya bunların suyun molal yüzey gerilimini artırıcı etkilerini açıklamaktadır (Şekil 2.8.(A),(B)).Bu etkiler hidrofobik etkileşimi başlatan kozmotropik tuzlara ve hidrofobik etkileşimi azaltan kaotropik tuzlara bağlıdır (Melander ve Horvath, 1977)



Şekil 2.8. (A) Holfmeister serileri salting-out ve salting-in etkileri; (B) Suyun molal yüzey gerilimine bazı tuzların bağıl etkileri.

Her iki durumda da sodyum, potasyum ve amonyum sülfatlar bağıl olarak daha yüksek çöktürme ve yüzey gerilimini artırma etkisine sahiptir. HEK adsorbanlarından desorpsiyon oldukça basit olup elüsyon su veya nötral pH' da seyreltik tampon ile yıkanması ile gerçekleşir.

2.4.5.4. pH Etkisi

pH, hidrofobik etkileşimlerin optimizasyonu için önemli bir parametredir. pH değerindeki artış biyomoleküllerin hidrofilisitesini artırdığı için yüklü grupların miktarını artırır sonuç olarak hidrofobik etkileşimleri zayıflatır (Hjertén, 1973; Porath ve ark., 1973). Diğer taraftan pH değerindeki azalma, hidrofobik etkileşimlerdeki artma ile sonuçlanır. Bu yüzden nötral pH değerinde bağlanmayan moleküller asidik pH değerinde bağlanır (Halperin ve ark., 1981). Biyomoleküllerin alıkonma süreleri pH 8.5' in üzerinde ve pH 5 'in altında belirgin bir şekilde değiştiği bulunmuştur (Hjertén ve ark., 1986).

2.4.5.5. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın artması, hidrofobik bölgeleri saran düzenli su moleküllerini serbest forma dönüştüreceği için suya maruz kalan hidrofobik yüzeyler azalır ve kuvvetli hidrofobik etkileşime neden olur. Sudaki hidrofobik çözünenlerin etkileşimi için geliştirilen teoriye dayanarak, hidrofobik etkileşimlerin entropi ilerleyişli olduğu [$\Delta G=(\Delta H-T\Delta S)\sim-T\Delta S$] sonuç olarak sıcaklık artışının hidrofobik etkileşimleri artırdığı bulunmuştur (Hjertén, S., 1976). Hidrofobik etkileşimleri sağlayan van der Waals çekim kuvvetlerinin de sıcaklık arttıkça arttığı dikkate alınmalıdır (Parsegian ve Ninham,1970).

2.4.5.6. Katkılar (Ek Kimyasallar)

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

Desorpsiyon sırasında seçiciliği artırmak için katkı içeren desorpsiyon tamponları kullanılmasına rağmen, biyomoleküllerin denatüre olma veya bu kimyasallara yüksek derişimlerde maruz kalarak inaktive olma riski göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte jel ortamına bağlı kuvvetli hidrofobik biyomolekülleri olan HEK kolonlarının temizlenmesinde katkılar çok etkili olabilir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2008).

2.2. Polimerizasyon

Polimer ile ilişkili temel tanımlar tez kapsamında aşağıda verilmiştir;

Monomer: Küçük mol kütleli kimyasal maddelerin birbirine kovalent bağlarla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen bu küçük mol kütleli birimler için kullanılmaktadır (Saçak, M., 2002).

Polimer: Çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirini tekrarlamasıyla oluşturduğu çok büyük moleküller için kullanılmaktadır (Saçak, M., 2002).

Polimer zinciri: Çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirini tekrarlamasıyla oluşturduğu polimer molekülü ya da uzun büyük molekül zincire benzetilebilir.Bu polimer molekülünü oluşturan monomerler de zincirin halkasına benzetilebilir.Bu yüzden polimer molekülüne polimer zinciri de denilmektedir (Saçak, M., 2002).

Ana zincir: Monomerlerin kovalent bağlarla birbirini tekrarlamasıyla oluşturduğu polimer zincirin ana isteletini oluşturan atom dizisi için kullanılmaktadır (Saçak, M., 2002).

Yan grup: Polimer zincirinin ana isteletini oluşturan atom dizisi dışındaki atom veya atom gruplarına denilmektedir (Saçak, M., 2002).

Doğrusal polimer: Polimerin ana iskeletinin kovalent bağlarla başka zincirlere bağlı olmadığı yalnız yan gruplarla bağlı olduğu polimerler için kullanılmaktadır (Saçak, M., 2002).

Dallanmış polimer: Polimerin ana iskeletinin kovalent bağlarla başka zincirlere bağlı olduğu ve bu zincirlerin polimerizasyon sırasında dallanmaya yol açan yan tepkimeler ya da ikincil tepkimeler sonucu oluştuğu polimerler için kullanılmaktadır (Saçak, M., 2002).

Çapraz bağlı polimer: Polimer ana zincirlerinin birbirine değişik uzunluktaki zincir parçalarıyla kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşan polimerlere denilmektedir (Saçak, M., 2002).

Polimerizasyon Reaksiyonları: Monomerlerin birbirlerine bağlanarak polimer oluşturduğu tepkime dizisine polimerizasyon reaksiyonları denilmektedir. Basamaklı polimerizasyon ve katılma polimerizasyonu olmak üzere iki polimerizasyon reaksiyonu vardır.

Basamaklı polimerizasyonda polimerizasyon ortamında bulunan her boy monomer fonksiyonel guplar üzerinden birbiri ile tepkimeye girip polimer zincirleri adım adım ve yavaş bir şakilde büyür.Yüksek mol kütleli polimerler polimerizasyon sonlarında elde edilir. Katılma polimerizasyonunda ise monomerler aktif merkez dedimiz serbest radikal, karbonyum veya karbanyon üzerinden birer birer katılarak polimer zincirini büyütürler ve polimerizasyon süresince zincir büyüklüğü fazla değişmez (Saçak, M., 2002).

Bu tezde katılma polimerizasyonu ile polimer elde edilmiştir.

2.2.1. Polimerizasyon Yöntemleri

Polimer partiküller taşıyıcı matriks olarak medikal ve biyolojik aktivitelerde kullanılırlar. Kullanıma bağlı olarak partiküllerin özellikleri ve boyutları değişmektedir (Kawaguchi, 2001). Bu kullanımlarda partiküllerin performansını partikül boyutlarının birbirine benzerliği, yüzey dokusu, kimyasal içeriği ve morfolojisi etkilemektedir. Polimer partiküllerin boyutlarını kullanılan polimerizasyon yöntemi etkilemektedir. Buna bağlı olarakta polimer partikülün performansını etkilemektedir.

Polimerlerin eldesine baktımızda ticari polimerlerin çoğunluğu radikalik katılma polimerizasyonu üzerinden sentezlenmektedir. Bu katılma polimerizasyon tepkimeleri çoğunlukla ekzotermik olduğundan tepkimenin gerçekleştiği kap veya reaktörlerin ısınmasına neden olur. Bu yüzden bu ısının ortamdan sürekli uzaklaştırılması gerekir. Ayrıca polimer çözeltilerin viskozitesi çok yüksek olduğundan karıştırmayı ve ısı aktarımını güçleştirmektedir. Tabi ki de yüksek dönüşümlerin gerektirmediği ticari üretimlerde ve küçük miktarların üretildiği araştırma laboratuvarlarda bu iki sorun önemli değildir. Fakat endüstride büyük ölçekte üretim yapılan sistemlerde aşılması gereken sorunlardır.

Bu sorunlara bağlı olarak endüstride polimerizasyon ortamının özelliklerinin değiştirilmesiyle farklı polimerizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Yığın, çözelti, süspansiyon, dispersiyon ve emülsiyon polimerizasyonları, polimerizasyon yöntemlerine örnek verilebilir.

2.2.1.1. Yığın Polimerizasyonu

Yığın polimerizasyonunda ortamda monomer ve uygun bir başlatıcı (kimyasal madde, ısı, ışın vb) ile polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir. Endüstride katı monomerlerin yığın polimerizasyonu önemsiz olup sıvı ve gaz monomerlerin yığın polimerizasyonu önemlidir. Bu yöntemin diğer polimerizasyon yöntemlerine göre ekonomik olması, polimerizasyon hızının yüksek olması, dönüşümün yüksekliği, temiz polimer eldesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Dezavantajlarına baktığımızda ise tepkimeye girmeyen monomerin uzaklaştırılması gerekir ayrıca sıvı monomerlerin katılma polimerizasyonlarının ekzotermik olması ve yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin hemen oluşması viskoziteyi artmakta ve buna bağlı olarak ısı aktarımı ve karıştırma zorlaşmaktadır (Saçak, 2012).

2.2.1.2. Çözelti Polimerizasyonu

Çözelti polimerizasyonunda kullanılan çözücü hem monomeri hem de başlatıcıyı çözdüğünden başlangıçta ortam homojendir. Çözücünün oluşan polimeri çözmesine bağlı olarak daha sonra ortam homojen yada heterojen olabilmektedir.Bu polimerizasyonda çözücünün varlığı yığın polimerizasyonunda karşılaşılan yüksek vizkosite ve ısı aktarım sorunlarını engeller. Çözelti polimerizasyonunda ısı aktarımının kolaylığı, vizkozitenin düşüklüğü, sıcaklığın kolay kontrolü ve ürünün doğrudan kullanımı gibi avantajları bulunsa da çözücünün polimerik radikalle transfere girmesi (polimerin molekül ağırlığını düşürür), çözücünün pahalı olması, çözücünün polimerden uzaklaştırılması işemleri, çözücüden dolayı çevre kirliliği gibi dezavantajları vardır (Saçak, 2012).

2.2.1.3. Süspansiyon Polimerizasyonu

Çözelti polimerizasyonunda genellikle monomerler organik karakterdedir ve buna bağlı olarak çözücüler de organik karakterdedir. Süspansiyon polimerizasyonunda ise ortamda su bulunur ve monomer organik karakterde olduğundan suda çözünmez. Monomerin su ortamında damlalar halinde dağılması ve faz ayrımının olmaması için ortam karıştırılır ve stabilizatör (stabilizatör suyun yüzey gerilimini düşürerek

damlaların birleşmesini engelleyen kimyasal maddelerdir) denilen kimyasal maddeler eklenerek çapı 0,1-5 mm arasında değişen monomer damlaları elde edilir. Ayrıca süspansiyon polimerizasyonunda başlatıcı, monomerde çözünen türtendir. Süspansiyon polimerizasyonu sonunda çapı 0,1-1 mm arasında değişen polimer tanecikleri elde edilir. Bu polimer taneciklerin çapını stabilizatörün türü, su/monomer oranı, zaman, karıştırma hızı ve sıcaklık gibi faktörler etkiler. Süspansiyon polimerizasyonun viskozitenin düşüklüğü, ısı aktarımının kolaylığı, sıcaklığın kolay kontrolü, organik çözücü kullanılmaması, polimerin mol kütlesi dağılım aralığının darlığı gibi avantajları yanında sürekli karıştırma, suyun ve stabilizatörün polimerden uzaklaştırılması, camsı geçiş sıcaklığı polimerizasyon sıcaklığın altında olan polimerlerin üretiminde kullanılamayışı, daha cok kesikli üretime uygunluğu gibi dezavantajları da vardır (Saçak, 2012).

2.2.1.4. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu 0.1–10 μm boyut aralığındaki eş boyutlu polimerik partiküllerin tek basamakta hazırlanmasını sağlayan bir yöntemdir (Ober ve ark., 1985, Tseng ve ark., 1986). Dispersiyon polimerizasyonunda monomer ve başlatıcı polimerizasyon ortamındadır, fakat ortam oluşacak polimer için saf çözücüdür. Reaksiyon çözelti polimerizasyonu gibi başlar (Horak, 1999).

2.2.1.5. Emülsiyon Polimerizasyonu

Günümüzde biyoteknoloji, biyomühendislik ve mikroelektronik alanlarındaki birçok uygulamada kontrollü boyut ve yüzey özelliklerinden dolayı polimer mikro tanecikleri kullanılmaktadır. Aynı biçimde lateks partikül üretiminde kullanılan polimerizasyon yöntemleri, süspansiyon, şişmiş emülsiyon, dispersiyon polimerizasyonları ve bunların modifiye formlarıdır (Tuncel ve Çiçek, 1997). Süspansiyon polimerizasyonu genellikle partikül boyutu 50-1000 μm aralığındaki partiküllerin üretiminde tercih edilen bir yöntemdir.

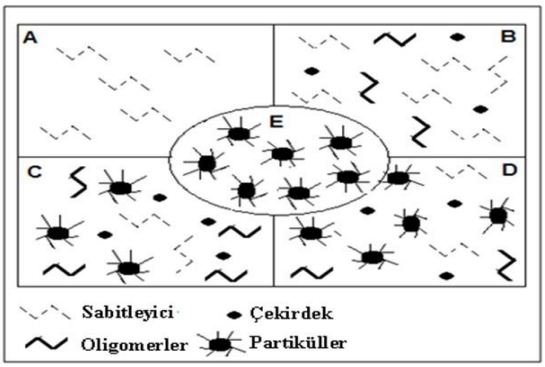
Monomer tanecikleri polimerizasyon sırasında ortamda bulunan stabilizör varlığında ve yağda çözünür başlatıcılar kullanılarak mikron boyutlu partiküllere dönüşür. Geniş boy dağılımı gösteren lateksler elde edilir. Geniş boy dağılımının sebebi

ise oluşan topaklaşma ve mekanik homojenizasyonun oluşturduğu kalıtsal boy dağılımıdır. Emülsiyon işlemleri genellikle 0.05-1.5 μm aralığında uniform polimerik partiküllerin üretiminde kullanılan bir yöntemdir.

Şişmiş emülsiyon yöntemi Ugelstad ve ark. tarafından 2-100 μm aralığında uniform polimer partikülleri sentezlemek amacıyla geliştirilmiştir (Ugelstad ve ark., 1980, 1982). Bu yöntem birkaç şişme basamağından sonra bunu takip eden polimerizasyonlar ile partikül boyutunun artırılması ancak eş boyutluluğun sabit tutulması esasına dayanır.

Tez kapsamında yöntem olarak emülsiyon polimerizasyonu kullanılmıştır.

Emülsiyon polimerizasyonu sürekli üretimlerde oldukça elverişli bir yöntemdir. Emülsiyon ortamının genellikle su olması nedeniyle, pahalı çözücüler kullanılması ya da ortamdan çözücünün uzaklaştırılması gibi problemler ortadan doğrudan kalkmıştır. Yüksek polimerizasyon hızlarında yüksek molekül ağırlıklı ürünler elde etmek mümkün.



Şekil 2.9. Önerilen partikül oluşum mekanizması

Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genellikle 50 nm den daha küçük partiküller (nanopartiküller) içeren lateksler elde edilir. Bu yöntemde hızlı polimerizasyon reaksiyonlarıyla yüksek molekül ağırlıklarına (birkaç milyon mertebesinde) ulaşılır. Partikül boyutu nedeniyle mikroemülsiyon lateksleri, emülsiyon ve mini emülsiyonun tersine şeffaf ve uçuk mavimsi renktedir. Bu latekslerin kontrollü çapraz bağlama yöntemleri ile gözenekli katılara da dönüştürülmesi mümkündür (Candau 1987, 1992).

a. Monomer/Su mikroemülsiyonları

İlk olarak monomer/su mikroemülsiyonuyla metil metakrilat (MMA) ve metil akrilatı (MA) polimerleştirmek 1980 yılında denenmiştir (Stoffer ve Bone 1980). Fakat polimerizasyon sırasında faz ayrımı nedeniyle başarı sağlanamamıştır. Daha sonra çok az miktarda stiren (% 1,9), %1,9 setilmetil amonyum bromür (CTAB) ve yaklaşık % 1 hekzanol ile stabilize edilmiş ve monomer/su mikroemülsiyonu ile polimerleştirme gerçekleştirilmiştir (Atik ve Thomas, 1981). Düşük stiren içeriği daha sonra, ağırlıkça % 6-10 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve çok az miktarda 1- pentanol kullanılarak ağırlıkça % 3-6' ya çıkarılmıştır. Ayrıca stiren ve/veya MMA mikroemülsiyon polimerizasyonu, UV lazer başlatıcı, foto-redoks polimerizasyonu ve Raman spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir (Holderoff 1990; Feng ve ark.1990).

b.Su/Monomer mikroemülsiyonları

Akrilamid(AM), akrilik asit(AAc), 2-hidroksietilmetakrilat(HEMA) ve üreformaldehit (UF) gibi suda çözünür monomerler, su/monomer mikroemülsiyonlarında polimerleştirilebilir. Bu suda çözünür monomerler, su/monomer mikroemülsiyonun misel çözünürlük kapasitesini artırarak yardımcı yüzey aktif madde rolü oynarlar. Bu tür mikroemülsiyonlarda sürekli faz organik bir çözeltidir ve yüzey aktif maddeler de bu organik çözeltide çözünür ve misel yapısını bu çözeltide oluştururlar.

c.Arayüzey mikroemülsiyonları

Ara yüzey mikroemülsiyonları için, organik ve su fazları birbirleriyle iç içedir ve yüzey aktif madde moleküllerinin çoğu monomer-su ara yüzeyinde toplanmıştır. Bu polimerizasyon yöntemiyle, yüksek miktarlarda suda ve organik fazda çözünen monomerler kopolimerleştirilebilir. Polimerleşen organik faz içeren ara yüzey mikroemülsiyonu için (örneğin; stiren veya MMA), polimerizasyon sonucunda gözenekli katı malzemeler elde edilebilir (Palani ve ark.1993; Gan ve ark. 1996). Bazı ara yüzey mikroemülsiyonlarına uygun polimerleşebilen yüzey aktif madde ve/veya yardımcı yüzey aktif madde katılımı ile su dışında tüm bileşenlerin polimerizasyonuyla polimerik yapılar elde edilmiştir (Gan ve ark. 1996).

En çok kullanılan, polimerleşebilen yüzey aktif maddeler AAc ve HEMA' dır. Çalışılan bazı polimerleşebilen yüzey aktif maddeler, PUD, SAAS, akrilamidoundekanoat, sodyum11-(N-etilakrilamido)undekanoat (SEAAU) ve metakriloyloksundesil bütilmetilamonyum bromür (MBDB)' dır. PUD dışında bu yüzey aktif maddeler oldukça reaktiftir ve kolaylıkla yüksek molekül ağırlıklarına ulaşılabilir (Paleos ve ark., 1983).

Polimerleşebilen yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde dışında, polimerik gözenekli yapıyı uzatmak için ara yüzey mikroemülsiyonu reçetesine etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı olarak katılabilir. Bu tür ara faz mikroemülsiyonlarının polimerizasyon sonrası şeffaf katı polimerik yapılar oluşturdukları bilinmelidir.

Mikroemülsiyon Polimerizasyonunun Mekanizması ve Kinetiği

Emülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyon işlemleriyle sulu fazda dispersiyonla yüksek reaksiyon hızlarına ve molekül ağırlıklarına (10^5-10^6) ulaşmasına karşın, kinetik, bazı yönlerden farklıdır.

Klasik emülsiyon polimerizasyonlarında, reaksiyon süresince 3 hız aralığı gözlenebilir. I. aralıkta partiküller oluşur ve reaksiyona giren partiküllerin sayısı arttıkça, polimerizasyon hızı da zamanla artar. Bu aralığın sonlanması misellerin yok olması ve büyüyen partiküllerin yüzeylerine yüzey aktif maddelerin adsorplanması ile olur. Bu olay, % 2-15 dönüşümleri arasında gerçekleşir. II. aralık'ta (gelişme basamağı), reaksiyon monomerce şişmiş polimerik partiküllerin içinde devam ederken, sulu fazdan monomer difüzyonuyla monomer derişimi polimerik partiküllerin içinde doygunluk değerine ulaşır.

Sulu fazda monomer derişimi emülsifiye edilmiş damlacıklar tarafından dengelenir. Bu aralıkta, reaksiyon hızı çoğunlukla sabit kalır veya jel etkisinden dolayı bir miktar artar (Odian, 1981). Gelişme aralığı, tüm emülsifiye edilmiş monomer damlacıklarının tüketildiğinde sonlanır. III. aralıkta (sonlanma basamağı) ise, reaksiyon hızı düşer; çünkü reaksiyon, oluşan partiküllerde kalan monomerin tümü tüketilinceye veya monomer-polimer karışımının camsı geçiş sıcaklığı (Tg) reaksiyon sıcaklığına eşit oluncaya kadar düşer. Mikroemülsiyon polimerizasyonunda, yalnızca

iki hız aralığı gözlenir (Guo ve ark.,1989; Gan ve ark., 1992; Full ve ark., 1992; Puig ve ark., 1993; Rodriguez-Guadarrama ve ark., 1993); çekirdeklenme ve büyüme. Bu iki aralık, polimerizasyon hızının (R) % 15-25'e kadar dönüşüm artışı ve derişimin büyüyen polimer partiküllerinde tüketilmesiyle azalmayı tanımlamaktadır. Bu olay, I.aralıkta partikül çekirdeklenmesi ve II. aralıkta büyüme basamağı olarak isimlendirilir. I. aralıkta polimerizasyon hızı zamanla artar, çünkü çoğalan birimlerin sayısı artar. Bu aralıkta, aktive edilmemiş damlacıkların monomerin difüzyonla transferi sayesinde, büyüyen partiküller içinde monomer derişimi sabit kalır. Bu çekirdeklenme basamağı, bütün mikroemülsiyon damlacıklarının polimerik partikül haline gelmesiyle veya monomerlerin monomerce şişmiş reaksiyon oluşturan partiküller içine difüzyonu ile sonlanır. Aktive edilmemiş damlacık bittiğinde, reaksiyon hızı doğrudan azalır. Klasik emülsiyon polimerizasyonunun tersine, mikroemülsiyon polimerizasyonunda sabit hız aralığı veya jel etkisi görülmez (Odian, 1981). Emülsiyon polimerizasyonunda, partikül oluşmasının misellerin sonlanması ile bittiğine inanılır. Oldukça fazla yüzey aktif madde derişimi nedeniyle mikroemülsiyon polimerizasyonunda, polimerizasyon sırasında partikül oluşumu devam eder. Guo ve arkadaşları hipotezlerini desteklemek için dönüşüm ile lateks içinde partikül sayısının arttığını göstermişlerdir. II. aralık'ta reaksiyonun ilk basamaklarında polimerizasyon hızının düşmesi, mikroemülsiyon damlacıklarında monomer çekirdeklerinin polimerizasyon sırasında erken sonlanmasına bağlanmıştır. Polimer partiküllerinin yüksek monomer/polimer şişme oranından dolayı, polimerizasyon sırasında, monomerlerin çoğu polimer partiküllerinin (I. aralık'ta üretilen) içinde bulunmaktadır. Gerçek mekanizmanın oluşması böylece, suda çözünmez (stiren, bütil metakrilat) ve suda çok az çözünür (MMA, tetrahidrofurfuril metakrilat) polimerler için monomer/su mikroemülsiyon polimerizasyonunda gözlenen aralık II genel bir kabul görmüştür (Full ve ark., 1992; Gan ve ark., 1991, 1992; Perez-Luna ve ark., 1990; Puig ve ark., 1993; Rodriguez-Guadarrama ve ark., 1993).

a.Monomer derişiminin etkisi

Emülsiyon polimerizasyonunda, monomerin çoğu emülsifiye edilmiş damlacık içindedir ve yalnızca monomer kaynağı olarak rol oynarlar. Bundan dolayı, başlangıç monomer derişimi düşüktür veya reaksiyon hızına etkisi yoktur. Mikroemülsiyon

polimerizasyonunda, reaksiyon hızı ve dönüşüm, monomer derişimi arttıkça artar. Polimerizasyon hızındaki artış, monomer derişiminin artmasıyla mikroemülsiyon damlacık boyutlarının artmasından kaynaklanır. Polimerleşen mikroemülsiyon lateksler iki yıl kararlı kalabilirler. Lateksler düşük monomer içeriğinde mavimsi ve şeffaftırlar; fakat monomer derişimi arttıkça bulanıklıkları ve boyları artar. Yüksek monomer derişiminde ışığı geçirmez hale gelirler. Sonuç lateksin, partikül boyutunun ve molekül ağırlığının da başlangıç monomer derişimine bağlı olduğu ve partikül boyutu mikroemülsiyon içindeki monomer derişimi ile arttığı gösterilmiştir.

b.Başlatıcı etkisi

Mikroemülsiyon sistemlerinde polimerizasyon hızı başlatıcı tipi ve derişimine ve yüzey aktif maddeye bağlıdır. Başlatıcı derişimi arttıkça polimerizasyon hızı ve toplam dönüşüm artar. Bunun nedeni, serbest radikallerin şişmiş miseller içine olan akısının artmasıdır. Guo ve ark. suda ve monomerde çözünür başlatıcılar kullanarak stirenin SDS ve yardımcı emülsiyon yapıcı madde olarak pentanol kullanarak mikroemülsiyon polimerizasyonunu incelemişlerdir (Guo ve ark., 1989). Reaksiyon hızı ve toplam dönüşüm potasyum per sülfat (KPS) ile 2,2-Azobis (2- metilbütironitril) (AMBN)'den daha yüksektir. Her iki başlatıcıyla da 20-30 nm boyutlarında kararlı, mavimsi lateksler elde edilmiştir. En yüksek polimerizasyon hızı, KPS'nin 0.47, AMBN'nin 0.39 kuvvetiyle değişmektedir. Molekül ağırlıkları oldukça yüksek bulunmuştur ve sırasıyla KPS ve AMBN'nin -0.07 ve -0.55 kuvvetiyle değişmiştir. Ayrıca KPS ile AMBN'den daha uzun çekirdeklenme periyodu (aralık I) bulmuşlardır (Guo ve ark., 1989). Gan ve arkadaşları bütil karbitolün yardımcı emülsiyon yapıcı madde olarak kullanıldığı sodyum dodesil sülfat (SDS) veya setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) mikroemülsiyonlarını KPS ve azobisizobütironitril (AIBN) ile başlatmışlardır. Polimerizasyon hızının KPS'nin 0.47 kuvvetiyle, AIBN' nin 0.39 kuvvetiyle değiştiğini ve KPS ile uzun çekirdeklenme periyodunu yayınlamışlardır. Ayrıca SDS ile CTAB mikroemülsiyonlarından daha hızlı polimerizasyon olduğuna işaret etmişlerdir (Gan ve ark., 1992).

c.Sıcaklığın etkisi

Mikroemülsiyon polimerizasyonu hızına sıcaklığın etkisi, suda veya monomerde çözünen başlatıcılarla stiren ve metil metakrilat (MMA) için çalışılmıştır (Guo ve ark. 1989; Gan ve ark.1992). Toplam dönüşüm de sıcaklığın artmasıyla artar. Bunun nedeni sıcaklıkla makromoleküllerin hareketi, özellikle reaksiyon veren damlacıklardaki polimer-monomer karışımının camsı geçiş sıcaklığı üzerinde reaksiyon sıcaklığı ile artmasıdır. AIBN ile başlatılmış stirenin CTAB veya SDS mikroemülsiyon polimerizasyonunda, Arrhenius eğrilerinden, aktivasyon enerjileri sırasıyla 49 ve 54 kJ/mol, KPS ile 92 ve 88 kJ/mol olarak bulunmuştur. MMA'nın mikroemülsiyon polimerizasyonu için, KPS ve AIBN için aktivasyon enerjileri sırasıyla 56 ve 43 kJ/mol olarak bulunmuştur. Bu değerler AIBN ile MMA'nın yığın polimerizasyonu için belirtilen değerden (83.7 kJ/mol) küçüktür. Sonuçta elde edilen lateksler sıcaklığa (ve başlatıcı derişimine) bağlı olarak mavimsi şeffaflıktan opak görünüme gider. Çok düşük reaksiyon sıcaklıklarından dolayı oldukça opak örnekler sentezlenmiştir.

d.Elektrolit etkisi

Emülsiyon polimerizasyonunda inorganik elektrolitlerin etkisi karmaşıktır ve elektrolit derişimine, doğasına ve türüne bağlıdır. Genellikle, elektrolitler sulu çözeltinin iyonik gücünü (veya pH'nı ayarlamak için) artırmak için eklenir ve bunun sonucunda ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımı artar. Ayrıca elektrolit eklenmesi reaksiyon sırasında emülsiyonun kararlılığını bozar. Elektrolit eklenmesinin mikroemülsiyon polimerizasyonu kinetiği üzerinde etkisi son zamanlarda çalışılmıştır. Elektrolit eklenmesi su/monomer/yüzey aktif madde sistemlerinin faz davranışını önemli ölçüde etkiler. Genellikle tuzlar su ve yüzey aktif madde arasında çözünürlüğü azaltır, tek faz mikroemülsiyon bölgelerini daraltır ve sıvı kristalin faz oluşumunu engeller. Çekirdeklenmiş emülsiyon polimerizasyonu için serbest radikallerin polimer partikülleri içine girişlerinin sulu fazda monomer derişimine bağlı olduğu kanıtlanmıştır. Böylece mikroemülsiyon polimerizasyonunda tuz ilavesiyle reaksiyon hızının azalması, elektrolit eklenmesi sonucu monomer çözünürlüğünün düşmesi ve böylece serbest radikallerin polimerik partiküllere giriş hızının azalması olarak açıklanabilir. Bu etki gözlenen polimerizasyon hızında önemli bir azalış yaratır.

Polimerizasyon hızının düşmesinin diğer bir açıklaması da, miseller (pozitif yüklü) ile serbest radikaller (negatif yüklü) arasındaki elektrostatik etkileşmedir. Çünkü polimerizasyonun azalış hızı, şişmiş miseller üzerindeki görünür pozitif yükteki azalış ile paraleldir. Negatif yüklü radikallerin giriş hızı, mikroemülsiyon yüzey potansiyelinin düşmesiyle biraz azaltılabilir. Ancak polimerizasyon hızı, pozitif yüklü serbest radikaller üreten suda çözünür başlatıcı (V-50) ile de tuz derişimi artıkça azalır. Burada elektrostatik etkiler çok önemli değildir.

e.Kullanılan yüzey aktif maddeler

Literatürde tanımlanan mikroemülsiyonların büyük bölümü kırılgan SDS/pentanol veya katyonik DTAB veya CTAB sistemleri üzerinedir. Aşağıdaki özelliklere sahip, mikroemülsiyon yapabilecek yeni yüzey aktif maddeleri bulma çabaları devam etmektedir:

- Daha küçük lateks sentezini gerçekleştirebilen,
- Ara yüzeyleri stabilize etmek için daha etkili çalışılabilen,
- Toksik olmayan ve biyobozunur olabilen,
- İstenen fonksiyonel grupları olan monomerlerin mikroemülsiyonunu gerçekleştirebilen.

Fonksiyonel Grup Eklenmesi

Polimerik partikül yüzeylerinde fonksiyonel grup bulundurulması mikro partiküllerden kimyasal yöntemler ile türetilecek uygulamalarda kullanılabilmeleri için gereklidir. Fonksiyonel grup içermeyen polimer yüzeyleri ile bu tür uygulamalar yapmak oldukça zordur. Fonksiyonel polimer mikropartiküllerinin sentezi, apolar monomer olan stiren gibi hidrofobik monomerin fonksiyonel grup içeren polar monomer ile kopolimerleştirilmesiyle elde edilir. Akrilat-bazlı fonksiyonel komonomerler genellikle tercih edilir. Karboksil, hidroksil, amin, amid, ya da klorometil fonksiyonel grupları polimerik mikropartiküle son ürünün eş boyutluluğu bozulmadan eklenebilir (Tseng ve ark. 1986; Okuba ve ark. 1992, 1994; Tuncel ve ark., 1994; Shirahama ve Suzawa, 1988). Kopolimerizasyon yönteminin seçiminde polariteler ve monomer ve komonomerin reaktiflikleri önemli rol oynar. Tek-basamaklı

yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu bazı limitasyonlarla birlikte apolar monomer ile polar monomerin direk kopolimerizasyonunda kullanılabilir. Bu yöntemin dezavantajları:

1. Fonksiyonel komonomerlerin sudaki çözünürlükleri oldukça yüksek olduğu için, ortamdaki başlatıcı ya da komonomer derişiminin yüksek olmasıyla sulu fazda reaksiyon başlaması çok hızlı olabilir. Emülsiyon kopolimerizasyon reaksiyonuna fonksiyonel komonomerin çözelti veya dispersiyon polimerizasyonu eşlik edebilir. Bu da farklı kompozisyonlarda ve molekül ağırlıklarında partikül, agregat ve çözünür polimer formunda polimerik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanabilir.

2. Çok hızlı reaksiyon başlangıcı partiküllerin topaklanmasına neden olabilir.

3. İkincil çekirdeklenme ile oluşan kopolimer partikülleri nedeniyle eş boyutluk kontrol edilemeyeceği için son ürünün boy dağılımı geniş olabilir.

Bu yöntem genellikle oluşan tek boyutlu partiküle çok küçük miktarda komonomerin eklenmesi için uygun bir yöntemdir. Tek boyutlu poli(St/ AAm), poli(St/HEMA), poli(St/AAc) ve poli(St/AAm/AAc) lateksler direk emülsiyon kopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır (Tamai ve ark., 1989). Bir başka çalışmada hidroksil grup taşıyan poli(St/DVB) partikülleri polimerizasyon reçetesinde PVA'yı stabilizatör olarak içeren çok basamaklı emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile elde etmiştir. Reaktif gruplar içeren, stiren-akrilonitril (S/AN) ve stiren-glisidil metakrilat (S/GMA) "coreshell" emülsiyon kopolimerizasyonu veya yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon kopolimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır.

2.3. Önceki Çalışmalar

Öncel (2004) poli(HEMA-MAPA) hidrofobik partikülleri üzerine 25 mg/g lizozim adsorpsiyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Yoon ve ark. (2005) doğal su ve nehir suyu içinde bulunan 3 H – etiketli 17-β-estradiolü toz haline getirilmiş aktif karbon (PAC) üzerine adsorplama çalışmasını

yapmışlar. Ayrıca toz haline getirilmiş aktif karbonun (PAC) farklı derişimlerinin E2 üzerine etkisini ve NaCI, Na_2SO_4, $CaCI_2$ tuzlarının adsorpsiyona etkisini araştırmışlardır. Örneklerdeki 3 H radyo işaretli 17-β-estradiol(E2) miktarını ölçmek için sıvı sintilasyon sayımını kullanmışlardır. Sıvı sintilasyon sayacının saptama sınırı 0,005 nM(1.36 ng /L) olarak saptanmış. Aktif karbonun su arıtma tesislerinde uygun bir teknoloji oldunu bulmuşlar.

Türkmen ve ark. (2008) antikor arıtma için hidrofobik nanoküreler içeren fenilalanin hazırlamışlardır. Hidrofobik monomer olarak N Methacryloyl-(L)-fenilalanin metil ester (MAPA)'ı kullanılarak yaklaşık olarak 158 nm büyüklüğündeki yeni bir hidrofobik nanosferler, sulu bir dispersiyon ortamına bağlı bir şekilde, MAPA ve HEMA'nın yüzey aktif serbest emülsiyon polimerisasyonu tarafından üretmişler. Özel gözeneksiz yüzey alanda nanoküreler 1874 m^2 /g olarak bulmuşlar. Poli(HEMA-MAPA) nanoküreler FTIR ve SEM tarafından karakterize etmişler. Nitrojen için MAPA'nın element analizi 0,42 mmol/g polimer olarak varsaymışlar sonra poli(HEMA-MAPA) nanosferler yığın sistemde İmmunglobulin G (lgG)'nin adsorpsiyonunda kullanmışlar. Poli(HEMA-MAPA) nanosferleri hem sulu çözeltilerde hem de insan plazmasında kullandıkları zaman yüksek adsorpsiyon değerleri (780 mg/g) elde edmişlerdir. Adsorpsiyon olaylarının tipik bir Langmuir izotermini takip ettiğini gözlemişlerdir. lgG'nin sürekli olarak adsorbe edilebileceği ve adsorpsiyon miktarında önemli bir kayıp olmaksızın desorbe edilebileceğini gözlemişlerdir.

Denizli ve ark. (2009) yumurta akından lizozim saflaştırmak için poli (2-hidroksi etilmetakrilat) içeren metakriloil- fenilalanin (MAPA) temelli [m-poli(HEMA-MAPA)] nanopartiküller hazırlamışlar ve 517 mg/g maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır.

Saha ve ark. (2010) 17 beta-estradiol(E2) ve 17 alfa-etinil estradiol(EE2)' ün aktif karbonlar ve yüksek çapraz bağlı polimerik evreler yoluyla sudan uzaklaştırılmasını incelemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca gaz kromatografisi, kütle spektroskopisi (GC/MS) kullanılarak düşük seviyeli bir kontrol sistemi geliştirildikten sonra grup çalışmalarıyla E2 ve EE2'nin birçok granül aktif karbon ve makronet polimer üzerindeki adsorpsiyonu araştırılmıştır. E2 ve EE2'nin emme kapasitesini ölçmek için bütün adsorbentlere denge deneyleri yapıldı ve ortaya çıkan veriler

kullanılan geleneksel teorik tedavilerle paralel olduğu bulundu. Emicilerin daha iyi değerlendirilmesi için yüzey alanları, ortalama gözenek çapları, mikro gözenekli hacmi ve kimyasal yapılarını içeren fiziksel özellikleri ile N(2) adsorpsiyon yoluyla teorize etmişlerdir. Ayrıntılı karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), FTIR spektroskopisi, sodyum kapasite tayini, pH, titrasyon, proton bağlayıcı eğrileri ve zeta potansiyeli ölçümleri gelişimi ile gerçekleştirmişlerdir.

Murray ve ark. (2011) su ve atık sulardan 17-β-estradiol ve klorlanmış yan ürünlerini ayrıştırmak için baskılı olmayan polimer parçacıklarının (NIP) yeteneklerini değerlendirmişlerdir. NIP atık sulardaki 10 mg/L E2 derişiminin % 98'ini etkili bir şekilde ayrıştırmışlardır. Ayrıca sudaki 10 mg/L E2 derişiminde 5 mg/L klor bulunduğu zaman NIP, E2 nin klorlaştırılmış yan ürünlerini ayrıştırılmasında % 84.9 etkili olduğu bulunmuştur.Hümik asidin 5 mg/L bulunması durumunda NIP 10 mg/L E2'nin % 99.9 dan fazlasını ayrıştırmayı başarabilmişlerdir. Ayrıca10 mg/L E2, 5 mg/L hümik asit ve 10 mg /L klor ile klorlaştırıldıktan sonra NIP klorlaştırılmış yan ürünlerini ve E2 nin kalıntılarınıda % 99.9 'danda daha fazla ayrıştırabilmişlerdir.

Ogata ve ark. (2011) sudan östrojenlerin ayrıştırılması için aktif karbon ve ozon tedavisini kullanmışlardır.Tekli solüsyon ve çoklu solüsyon sistemlerinin pH sı ve kimyasal oksijen taleplerini araştırmışlar.Östrojenin uzaklaştırılması aktif karbon miktarı ile fazlalaştığı bulundu. Tekli solüsyon sistemlerinde aktif karbon tarafından ayrıştırılan östrojen yüzdesi üçlü solüsyon sistemlerindekine göre daha fazla oluduğu bulundu. Kimyasal oksijen talebini ve pH azaltan ozon kullanılarak östrojen tamamen ayrıştırmışlardır.

Özgür ve ark. (2011) 17β-estradiol'ün (E2) tayinine yönelik kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensör hazırlamışlardır. QCM biyosensör, QCM çipinin altın yüzeyine E2 baskılanmış poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-tirozin metil ester) (poli(HEMAT)) partiküllerinin tutturulmasıyla hazırlamışlardır. Baskılanmış partiküller, E2 varlığında MAT ve EDMA'nın miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonu ile hazırlanmışlar Ayrıca baskılanmamış poli(HEMAT) (NIP) partiküller aynı yöntemle sadece ortama kalıp molekül (E2) eklenmeksizin sentezlenmişler. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörler QCM sistemine bağlanarak hedef moleküle ait kinetik ve afinite bağlanma çalışmaları yapılmıştırlardır. Baskılanmış partiküllerin,

baskılanmamış partiküllere göre hedef moleküle (E2) daha fazla duyarlılık gösterdiğini bulmuşlar. Sonuçta, baskılanmış sensörün E2 için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermişlerdir.

Üzek ve ark. (2011) nano-iğneler içeren poli(2- hidroksietilmetakrilat-matekriloilamidofenilalanin), poli(HEMA-MAPA) kriyojeller hazırlayıp plazmid DNA 'ı saflaştırmışlardır. 25°C'de, optimum pH 5.5'de DNA adsorpsiyon kapasitesi 13.98 mg DNA/g kriyojel olarak bulunmuş. Başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi incelendiğinde maksimum adsorpsiyon kapasitesi poli(HEMA) için 8.28 mg/g ve poli(HEMA-MAPA) için ise 45.31 mg/g olarak bulmuşlardır ayrıca adsorpsiyon kapasitesi iyonik şiddet artışı (maksimum kapasite Na_2SO_4 ile elde edilmiştir) ve sıcaklık artışı ile (40°C'de maksimum kapasite 15.69 mg/g'dır) artını bulmuşlardır.

Li ve ark. (2012) granül aktif karbon(GAC) reaktöründen elde ettikleri biyolojik aktif karbonu (BAC) kullanılarak 17-β-estradiolü içme suyundan arındırmışlardır. GAC içeren reaktöründen (kolunundan) 20 µg/L içeren 17-β-estradiolü geçirdiğinde 200 ng/L konsantrasyona sahip 17-β-estradiol elde etmişlerdir. Sonra BAC ile denediklerinde reaktörden (kolunundan) 17-β-estradiolün konsantrasyonunu 50 ng/L olarak bulmuşlardır. Buna göre BAC ile yapılan ayırma GAC ile yapılan ayırmadan daha iyi olduğunu görmüşlerdir.

Han ve ark. (2013) suda öncelikli kirletici olan etinilestradiolün(EE2) adsorbant olarak sanayi tipi poliamid 612(PA612) partikülleri kullanarak sulu çözeltilerden hızlıca seçici bir şekilde uzaklaştırılmasını incelemişlerdir. İzoterm çalışmalar, gözenekli olmayan düşük yüzey alanlı (20 m^2/ g) PA612 parçacıkların sudaki EE2 için maksimum adsorpsiyon kapasitesi olan 25.4 mg/g 'a sahip olduğunu gösterdi ki bu da iki adet aktif karbon adsorbenti (10.4-27.6 mg/g) ile kıyaslanmasıyla elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğunu ya da karşılaştırılabilir olduğunu bulmuşlar. PA612' deki EE2' nin adsorpsiyonun yalancı ikinci dereceden kinetik parametreler izlediğini bulmuşlar bu da yüksek bir adsorpsiyon oranı ile aktif karbonunkini aşarak 5.3' ten 22,4 olarak bulunmuştur. Ayrıca su tuzluluğu (NaCI, 1 mM - 1M),metal iyonları(K(I), Ca(II), ve Zn(II); 0.1 M),doğal organik maddeler (hümik asit, 0.2-5

mg/L)ve pH derecesi (4.8-9.1) içeren bir dizi su kimyası parametrelerde PA612' nin EE2 adsorpsiyonun yüksek seçicilikte olduğunu gözlemişlerdir.

Türkoğlu (2014) 17-β-estradiol (E2) tayini için E2 baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörü hazırlamışlardır. E2 baskılanmış SPR sensörlerin duyarlılığını belirlemek için farklı derişimlerde hazırladıkları E2 çözeltileri kullanmışlardır. Ayrıca SPR çipin baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için E2 baskılanmamış SPR sensör hazırlamışlardı.

Caka ve ark. (2015) poli(HEMA-MAPA) membrandan kurkuminin salınımını(salgılanmasını) incelemişlerdir. Poli(HEMA-MAPA) membranlar UV polimerizasyon tekniği ile hazırlanmışlardır. Bu membranlar SEM, FTIR ve şişme çalışmalarla karakterize edilmişlerdir. Kurkuminin salınımı farklı pH ve sıcaklıklarda araştırılmıştır. Optimum ilaç salınım verimi 7.4 pH ve 37^{o}C ta iki saatlik bir zaman dilimi içinde % 70 oranında olduğu tespit etmişlerdir. Kurkuminin zamana bağlı salınımı da araştırılmış ve kurkuminin membrandan yavaş salınımı 48 saatlik zaman diliminde gözler önüne serilmişdir.

Li ve ark. (2015) kirli su ve inek dışkısından 17-β-estradiol(E2) ve dietilstilbestrolü (DES) uzaklaştırmak için indirgenmiş bakteri (Strain Rhodococcus sp. JX-2 ve strain Serratia sp. S) immobilizasyonlarını kullanmışlardır. Bakterileri alginate ile sabitleştirmişlerdir. İmmobilize bakteri, serbest bakteri ve bakterisiz kontrol ilişkilendirilmesi arasında karşılaştırma yaptılar.E2 ve DES' sin ayrıştırılmasına etki eden aşılama miktarı, pH değeri, nem içeriği ve dönüşme zamanı gibi faktörler incelemişler. İmmobilize edilmiş bakteriler belli koşullarda E2 yi % 95.85 oranında DES' si ise sudan tamamen ayrıştırabildiklerini buldular. İnek gübresinden ise İmmobilize edilmiş bakteriler DES' si %97.41 oranında E2'yi ise tamamen ayrıştığı bulmuşlardır.

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Kullanılan Kimyasallar

Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ve 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) Fluka A.G.(Buchs,isviçre) firmasından temin edilmiştir ve kullanılmadan önce polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmak için düşük basınç altında damıtılmıştır.Monomerler kullanılıncaya kadar 4ºC'da buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sigma (St.Louis,MO, ABD) firmasından L-Fenilalanin ve metakriloil klorür temin edilmiştir. Poli(vinil alkol) (PVAL; molekül ağırlığı: 100,000, %98 hidroliz edilmiş) Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Amonyum persülfat (APS) Sigma (St Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. 17β-Estradiol Sigma firmasından (St. Louis, ABD) alınmıştır. Diğer bütün kimyasal maddelar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt,Almanya) firmasından temin edilmiştir.Adsorpsiyon deneylerinde ve kimyasal sentezlerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque.IA) Ropure LP® ters ozmos ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANO pure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 MΩ'dir.

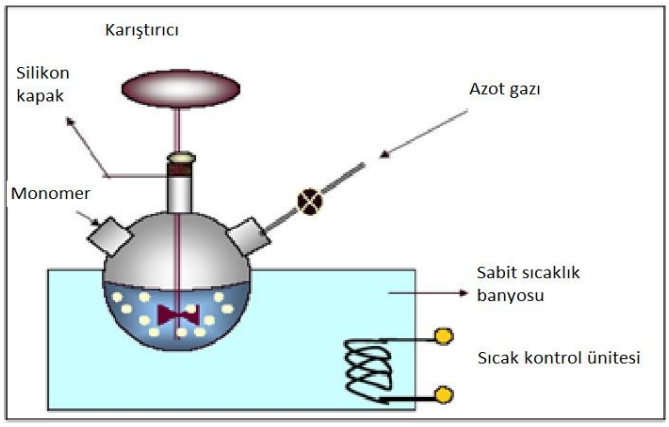
3.2. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.1. N-Metakriloilamidofenilalanin Sentezi

N-Metakriloilamidofenilalanin (MAPA) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 0.2 g hidrokinon ve 5.0 g L-fenilalanin 100 mL diklorometan içerisinde çözünüp 0ºC' ye soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiye ilave edilmiş ve bu çözeltinin üstüne de 5.0 mL metakroil klorür yavaşça dökülmüştür. Elde edilen bu son çözelti oda sıcaklığında ve azot atmosferinde manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır.Kimyasal reaksiyon sonunda % 10'luk NaOH çözeltisi kullanılarak reaksiyona girmeyen metakroil klorür ekstrakte edilmiştir.Son olarak döner buharlaştırıcı kullanılarak sulu faz uzaklaştırılmış ve kalan katı kısım MAPA, etanolde çözülmüştür.

3.2.2. poli(HEMA- MAPA) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Dispersiyon polimerizasyon işlemi sıcaklık kontrol sistemine sahip kapalı polimerizasyon reaktöründe (hacim: 500 mL) gerçekleşmiştir. HEMA ve MAPA polimerizasyonu tipik olarak şu şekildedir: Monomer faz 10 mL HEMA ve 1.0 g MAPA'den oluşmaktadır. Başlatıcı olarak APS kullanılmıştır ve 0.25 gramı monomer fazda çözülmüştür. Oluşan ürün, APS nin polimerizasyon ortamında tamamen çözünmesi için 200 W'de 5 dakika ultrasonik su banyosunda (Bransonic 2200, İngiltere) sonike edilmiştir. 4.0 gram poli(vinil alkol), homojen etanol (100 mL) çözeltisine eklenmiştir ve 100 mL su ile birlikte polimerizasyon reaktörüne eklenmiş ve reaktörün içindeki maddeler monomer eklenmesi boyunca 500 rpm de karıştırılmış, daha sonra reaktör 5 dakika boyunca köpüren azotla arındırılmıştır. Reaktör su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Polimerleşme zamanı reaktör sıcaklığı 70°C' ye ulaştığında azot atmosferi altında 8 saat olarak belirlenmiştir (karıştırma hızı: 500 rpm). Polimerizasyon periyodu tamamlandıktan sonra, reaktör içeriği oda sıcaklığına soğutulmuş ve dispersiyon ortamının alınması için 5000 rpm de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Bu polimerleşme reaksiyonunun sonunda soluk kahverengi poli (2-hidroksiletil metakrilat-N- metakriloilamidofenilalanin) [poli(HEMA-MAPA)] nanopartikülleri elde edilmiştir ve elde edilen polimer dağılması için 10 mL etanol içerisinde aynı şartlarda tekrar santrifüjlenmiştir. Etanolle yıkama, dönüşmemiş monomerler ve diğer kimyasalların uzaklaştırılması için 3 kere tekrarlanmıştır. Son olarak, poli(HEMA- MAPA) 10 mL su (kütlece 10%) ile tekrar karıştırılmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Poli(HEMA- MAPA) nanopartiküllerin sentezinde kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik gösterimi.

3.3. Poli(HEMA- MAPA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1.Yüzey Morfolojisi ve Ortalama Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin ortalama çap aralığı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM; QUANTA 400F, FEI, Hollanda) ve yüzey alanı ölçüm cihazı (BET) kullanılarak incelenmiştir. Nanopartiküller SEM ile görüntülenmeden önce etanol içerisindeki bir damla seyreltik partikül dispersiyonu cam yüzey üzerine yayılmış ve toz olmayan bir ortamda oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan numune ince altın tabaka ile kaplanmış ve vakumlanmıştır.

Taramalı elektron mikroskobunun (SEM) nanopartikül görüntüleri kullanılarak nanopartiküllerin ortalama çap aralığı hesaplanmıştır.

3.3.2.FTIR Çalışmaları

Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin karakteristik fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde Fourier transform infrared spektoroskopisi (FTIR, 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Nanopartiküller, 100 mg kuru, toz KBr (0.1 g, IR Grade, Merck, Germany), ile homojen olarak karıştırılmış pelet haline getirilerek FTIR spektrumu elde edilmiştir.

3.3.3.Yüzey Alanı Ölçümü(BET)

Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin yüzey alanı, yüzey alanı ölçüm cihazı (Quantachrome NOVA 2000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümlerde adsorplanan gaz azottur (Saflık % 99.99). Sıvı azot sıcaklığı 77 K'dir. Örnekten gaz uzaklaştırma işlemi vakumda 154 ºC sıcaklıkta 5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. 17β-Estradiol Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalişmalari

3.4.1. 17β-Estradiolün Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu

17β-Estradiolün-poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerine sulu çözeltilerden adsorpsiyonu kesikli sistemde incelenmiştir. Partiküller (0.1 g) 50 mL 17β-Estradiol çözeltisi ile 2.5 saat (denge zamanı), 150 rpm'de inkübe edilmiştir. 17β-Estradiol derişimi, tuz derişimi ve sıcaklık değişikliklerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Tuz derişiminin etkisi belirlenebilmesi için 0,1-1,5 M NaCl arasında değiştirilmiştir. 17β-Estradiolün başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisinin belirlenmesi için, derişim değerleri 5-150 mg/mL arasında değiştirilmiştir. Sıcaklığın etkisinin belirlenebilmesi için, adsorpsiyon çalışmaları 4-45°C arasında çalışılmıştır.17β-Estradiolün derişimleri 280 nm'de belirlenmiştir. 17β-Estradiol adsorpsiyon kapasitesi kütle denge denklemi ile hesaplanmıştır.

$$q = [(C_0 - C)V] / m \qquad (3.4)$$

burada, q partikül birim kütlesinin adsorpladığı 17β-Estradiol miktarı (mg/g); C_0 ve C sırasıyla, 17β-Estradiol başlangıç ve belirli bir süre muamele edildikten sonraki derişimleri (mg/mL); V sulu çözeltinin hacmi ve m kullanılan partiküllerin kütlesidir (g). Deneyler, kalite kontrolü ve istatiksel amaçlar için 3 kez yapılmıştır.

3.4.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Poli(HEMA-MAPA)'dan, adsorplanan 17β-Estradiolün desorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. 17β-Estradiolün adsorplanmış partiküller (0.05g), asetonitril:methanol (70:30; v:v) çözeltisi bulunan 10 mL desorpsiyon ortamında 150 rpm oda sıcaklığında 2.5 saat sürekli karıştırılmıştır. Partiküllerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için,17β-Estradiol adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı partiküller kullanılarak 10 kez tekrarlanmıştır. 17β-Estradiol desorpsiyon oranı Eşitlik 3.5 deki gibi hesaplanmıştır.

Desorp.oranı (%) = [(Desorb.17β-Estradiolün miktarı) /(Toplam adsorb.17β-Estradiol miktarı)] X 100 (3.5)

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

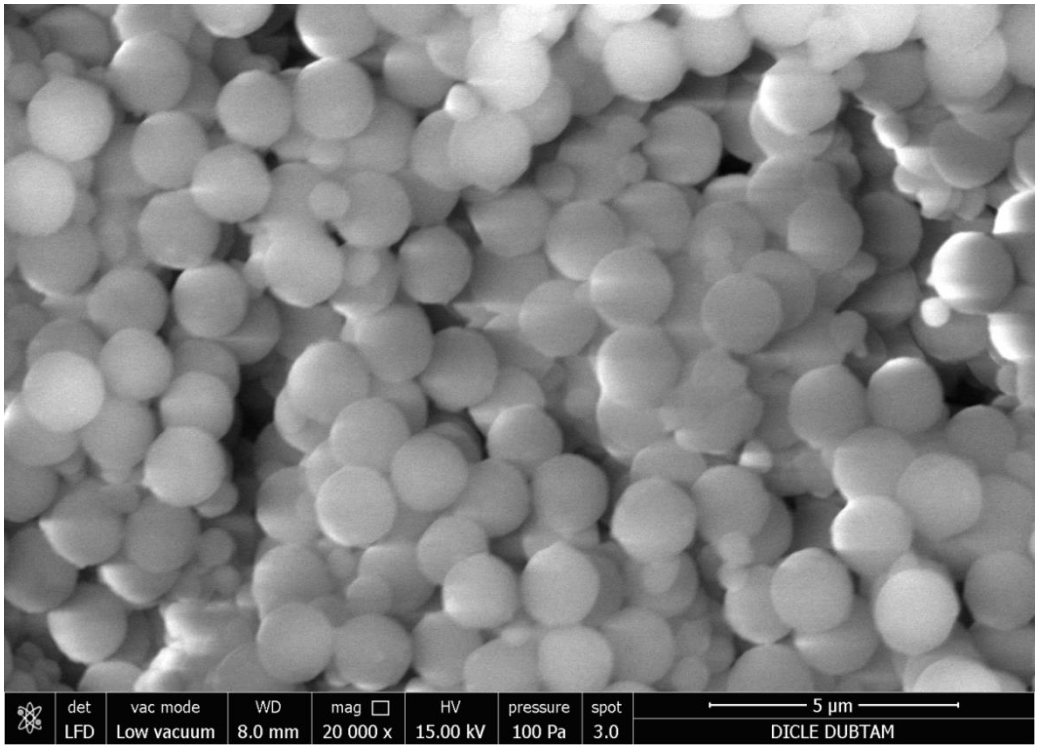
4.1. poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin karakterizasyonu

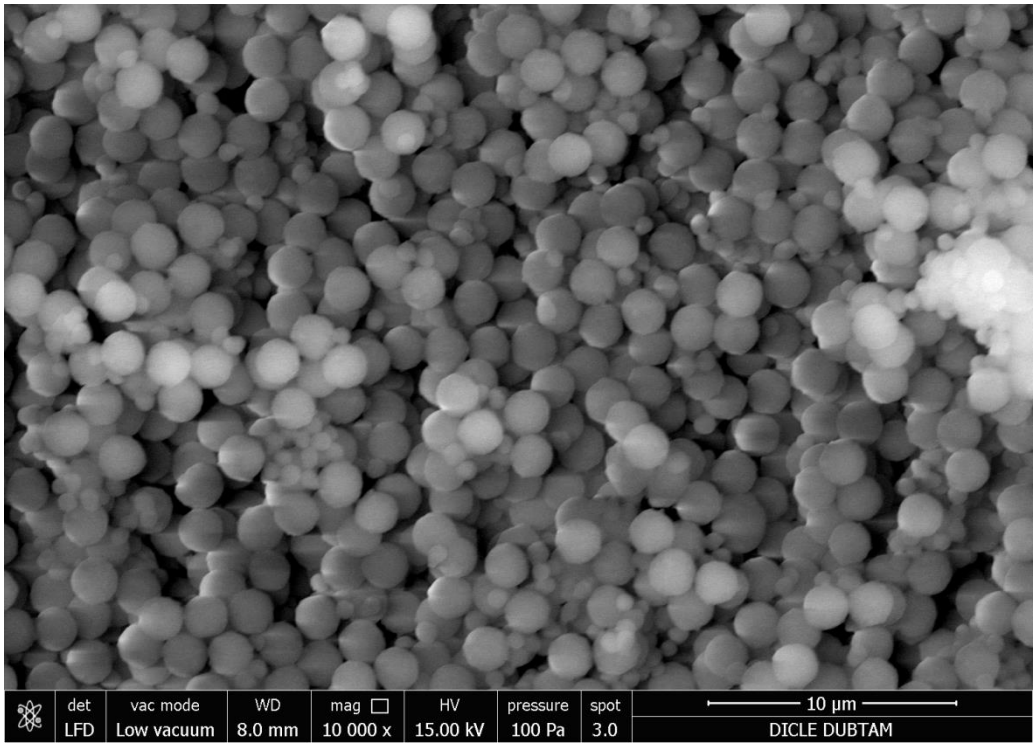
4.1.1.Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin SEM görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller mikroemülsiyon polimerizasyonu ile partikül formda ve 120-200 nm çap aralığında üretilmiştir. Ayrıca yüzey alanı ölçüm cihazı(BET) kullanılarak poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin yüzey alanı 1890 m^2/g olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi nanopartiküller partikül halindedir ve geniş yüzey özelliklerine sahiptirler. Sonuç olarak polimerik yapıya MAPA ilavesi, yapının hem yüzey morfolojisinde hem de yığın özelliklerinde değişime yol açmıştır.

4.1.2.Yüzey Alan Ölçümleri (BET)

Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı nanopartiküllerde önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermleri ve 0.005-1.0 arası bağıl basınçları (P/Po) ile ölçülmüştür. Yüzey alanı ölçüm cihazı (BET) ile poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin spesifik yüzey alanı 1890 m^2/g olarak bulunmuştur. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin bir avantajı da temas yüzeyinin oldukça büyük olmasıdır.

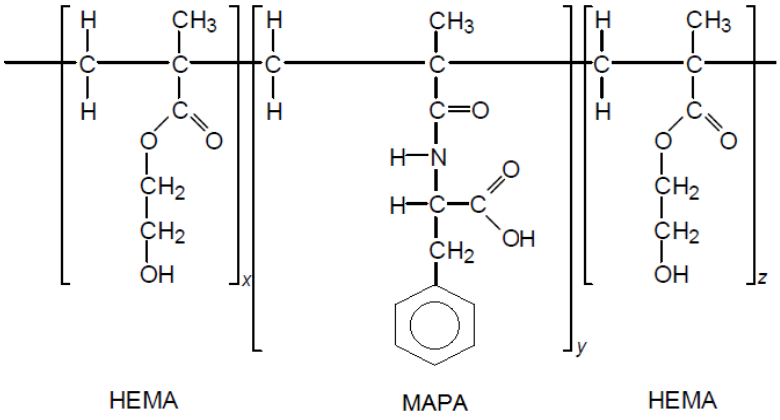




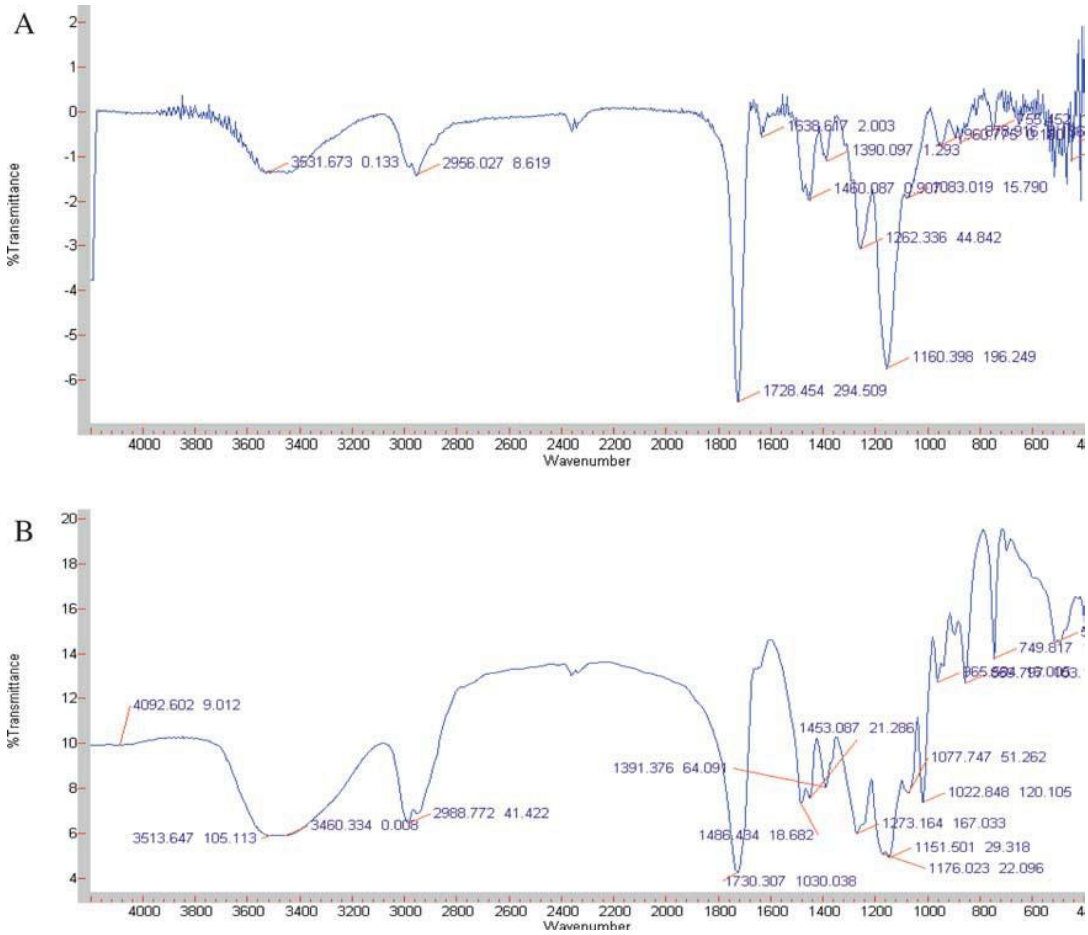
Şekil 4.1. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin SEM görüntüsü

4.1.3.FTIR Çalışmaları

Sulu çözeltilerden 17β-Estradiol Uzaklaştırılması için MAPA komonomer ve hidrofobik ligand olarak seçilmiştir.MAPA L-Fenilalanin ve metakriloil klorür kullanılarak sentezlenmiştir. Şekil 4.2 poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin molekül formülünü ve Şekil 4.3'te MAPA ve Poli(HEMA-MAPA) molekülünün FTIR spektrumunu göstermektedir. MAPA monomerinin yapıya girip girmediğinin belirlenmesi amacıyla poli(HEMA-MAPA) ve MAPA ' nın FTIR spektrumları alınmış ve Şekil 4.3'da verilmiştir. Her iki spektrumda da ortak olan bandlar MAPA monomerinden kaynaklanan; C=C gerilmesi (1500-1600 cm^{-1}), C-N gerilmesi (1180-1360 cm^{-1}), CH gerilmesi(aromatik, 3010-3100 cm^{-1}), karboksilik asitteki OH gerilmesi(3500-3650 cm^{-1}), asitin ve amidin CO gerilmesi (1690-1760 cm^{-1}) , NH gerilmesi(3300-3500 cm^{-1}) amidin CO gerilmesi (1657 cm^{-1}) ve CH gerilmesi (alkil, 2850-2970 cm^{-1}) dir. Bu da MAPA 'nın nanopartikülün yapısına girdiğini göstermektedir. Ayrıca spektrumlar incelendiğinde bu bandların poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için daha şiddetli ve geniş olduğu görülmektedir.Bu farklılık poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerindeki HEMA monomerindeki CO,CH,OH, -O- grupların gerilme veya bükülmelerinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.2. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin moleküler formülü



Şekil 4.3. (A) MAPA (B) Poli(HEMA-MAPA)'ya ait FTIR spektrumu (Türkmen ve ark. (2008))

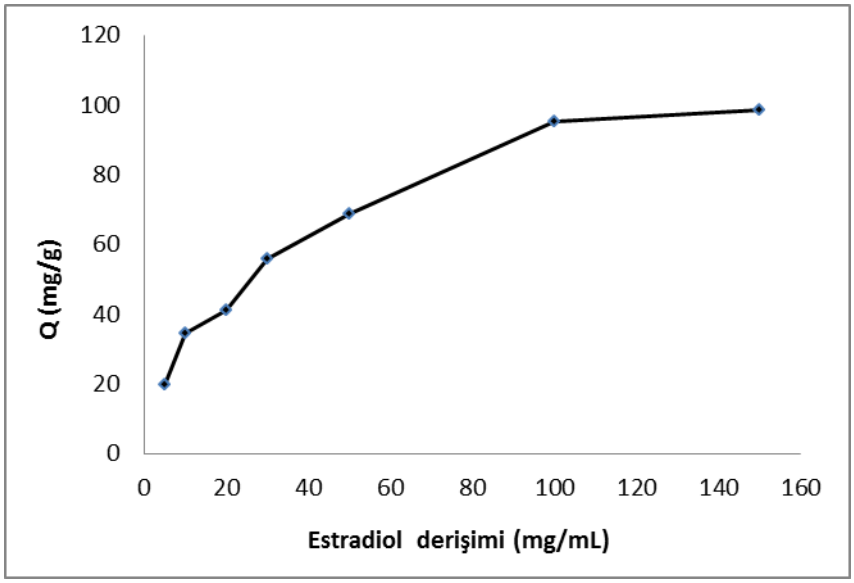
4.2. 17β-Estradiolün Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyonu

4.2.1. 17β-Estradiolün poli(HEMA-MAPA) Üzerine Adsorpsiyonu

4.2.1.1. 17β-Estradiolün derişiminin etkisi

17β-Estradiolün başlangıç derişiminin maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile olan ilişkisini anlamak için, 17β-Estradiolün derişimi 5-150 mg/mL arasında değişen değerlerde alınmıştır. Şekil 4.4. başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesi ile olan ilişkisini göstermektedir. Birim nanopartikül miktarında adsorplanan 17β-Estradiolün miktarı, ilk olarak başlangıç 17β-Estradiolün derişimiyla artmakta ve 100 mg/mL 17β-

Estradiolün derişimi değerinde platoya ulaşmaktadır. Bu durum nanopartiküllerin aktif bölgelerinin ortamdaki 17β-Estradiol ile tamamen etkileştiğinin göstergesidir.

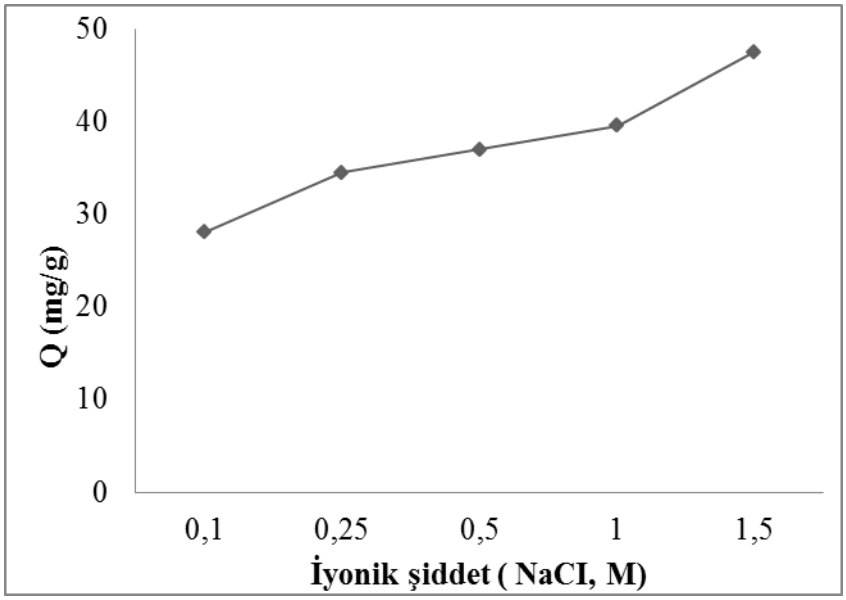


Şekil 4.4. Poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri ile 17β-Estradiolün adsorpsiyonuna 17β-Estradiolün başlangıç derişiminin etkisi: T: 25°C

4.2.1.2. İyonik şiddetin etkisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, yürütme ve dengeleme tamponuna çeşitli tuzların ilavesi ligand-biyomolekül etkileşimini artırır. Ortama eklenen nötral tuzun iyonik gücü, biyomoleküllerin de çözünürlüğünü etkiler. İyonik gücü, tuzu oluşturan katyon ve anyonların yük sayısı ve derişimi belirler.

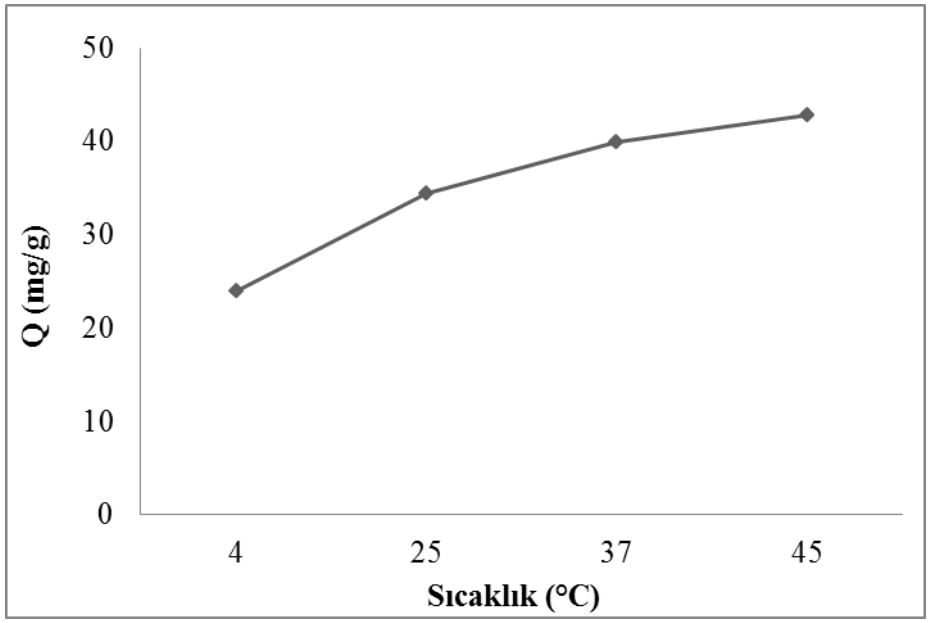
Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin 17β-Estradiol adsorpsiyonunda iyonik şiddetin etkisi sürekli sistemde incelenmiştir. İyonik şiddet NaCl ile ayarlanmış ve bu tuz için 0.1-1.5 M derişim aralığı taranmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de sunulmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi, tuz derişimi arttıkça 17β-Estradiol adsorpsiyon kapasitesi artmıştır. Tuz derişimi arttıkça sulu çözeltide bulunan 17β-Estradiol'nün tuzların çöktürme özelliğine (salting-out) bağlı olarak nanopartiküllere difüzyonu artacağı için 17β-Estradiol adsorpsiyon miktarı da artmaktadır.



Şekil 4.5. İyonik şiddetin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. 17β-Estradiol derişimi 20 mg/mL; sıcaklık: 25°C.

4.2.1.3. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın, 17β-Estradiolün adsorpsiyonuna etkisi 4-45°C aralığında incelenmiştir. Poli(HEMA-MAPA) üzerine 17β-Estradiolün adsorplanmasında sıcaklığın etkisi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.6'da gösterildiği üzere, poli(HEMA-MAPA) üzerine 17β-Estradiolün adsorpsiyonu sıcaklık 4°C'den 45°C'ye çıkartıldığında artmıştır. 17β-Estradiol, 4°C ve 45°C sıcaklıklarda sırasıyla 23.91 ve 42.79 mg/g miktarlarda adsorplanmıştır. HEK'de, sıcaklığın artırılması, biyomolekülün tutuklanmasını, sıcaklığın azaltılması ise biyomolekülün elusyonunu desteklemektedir. Gerçekten de, HEK entropiye dayanan bir işlemdir. ΔH küçük bir pozitif veya negatif değer olabileceğinden, ΔG pozitif entropi değeriyle kontrol edilir ve böylece de artan sıcaklıkla artmaktadır. Hidrofobik etkileşim artan sıcaklıkla artmaktadırlar.

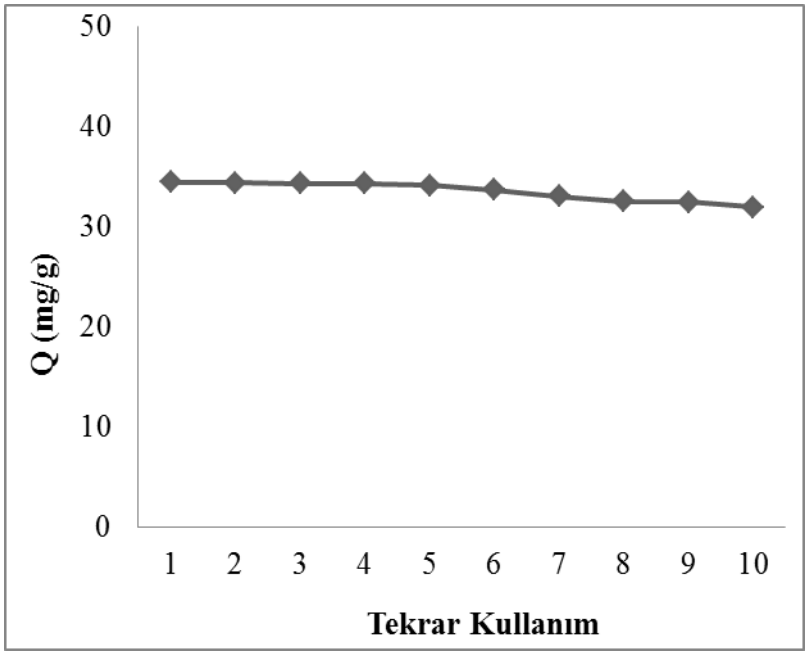


Şekil 4.6. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller 17β-Estradiol adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi: 17β-Estradiol derişimi: 20 mg/mL

4.2.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

17β-Estradiol desorpsiyonu asetonitril:methanol (70:30; v:v) çözeltisi ile kesikli sistemde çalışılmıştır. Nanopartiküllere adsorplanan 17β-Estradiol asetonitril:methanol içerisinde 4 saat kesikli sistemde 150 rpm'de oda sıcaklığında desorbe edilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki 17β-Estradiolün son derişimi 280 nm'de belirlenmiştir

Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliğini test etmek için, 17β-Estradiol adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı nanopartikülleri kullanarak 10 kez tekrarlanmıştır. Bir adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra sterilizasyon için, nanopartiküller 2 mM NaOH çözeltisinde 30 dakika yıkanmıştır. Bu işlemden sonra, nanopartiküller distile su ile 30 dakika yıkanmış. Şekil 4.7' den de görüldüğü üzere, nanopartiküller oldukça kararlıdırlar ve adsorpsiyon kapasitesini neredeyse sabit tutmaktadırlar. Tekrarlanan 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün sonunda, adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma olmamıştır. 17β-Estradiolün 10. adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde geri kazanım % 92.7 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin tekrar kullanılabilirliği:17β-Estradiol derişimi: 20mg /mL, adsorpsiyon süresi 2.5 saat, T: 25°C.

4.2.3.Adsorpsiyon Modelleri

Adsorplanan moleküllerin adsorbentle olan etkileşimini belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermleri, denge halinde çözeltideki moleküllerin derişimi ile katı faza (adsorbente) adsorplanan moleküllerin miktarı arasındaki bağıntıyı tanımlar.

Langmuir adsorpsiyon modeli, moleküllerin adsorplanacağı yüzeyin (adsorbentin) belli sayıda aktif bölgeler taşıdını bu aktif bölgelere moleküllerin adsorplandığını ve bu aktif bölgelerinin her birinin sadece bir molekül adsorpladığını öngörmektedir. Ayrıca bu aktif bölgelerin eşit enerjili olduğu ve komşu aktif bölgelerin birbirinden uzak olmasından dolayı bu aktif bölgelere adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadını varsaymaktadır.

Adsorpsiyon izotermleri adsorpsiyon biyomoleküllerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1'de verilmiştir. 17β-Estradiol için denge verileri dönüşümleri lineer bir grafik verdiğinden dolayı bu sisteme Langmuir modeli uygulanabilir ve Langmuir modeli aşağıdaki denklemle ifade edilmektedir:

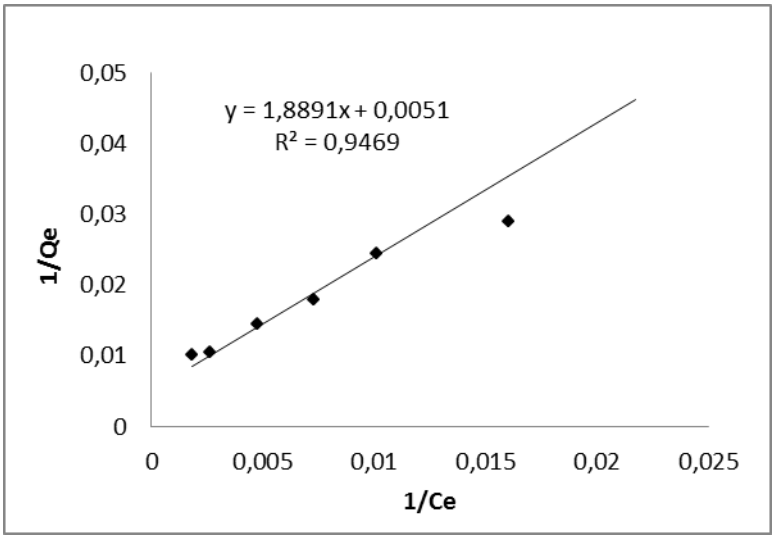
$$Q_e = Q_{max}. b . C_e / (1 + bC_e) \quad (4.1)$$

Q_e adsorplanmış 17β-Estradiol miktarı (mg/g), C_e dengedeki 17β-Estradiol derişimi (mg/mL),b Langmuir sabiti(mL/mg) ve Q_{max} ligantın 17β-Estradiolü maksimum adsorpsiyon kapasitesini göstermektedir(mg/g). Bu denklem lineerize edildiğinde;

$$1/Q_e = [1/(Q_{max}.b)].[1/C_e] + [1/(Q_{max})] \quad (4.2)$$

denklemi elde edilmektedir. $1/C_e$ x ekseni olarak, $1/Q_e$ de y ekseni olarak grafiğe geçildiğinde grafiğin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{max}$ değerini ve grafiğin eğimi de $1/(Q_{max}.b)$ değerini vermektedir (Şekil 4.8).

Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllere ait maksimum adsorpsiyon kapasitesi ($1/Q_{max}$) deneysel verilerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Langmuir korelasyon katsayısı (R^2) poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için yüksektir. Langmuir adsorpsiyon modeli bu afinite sistemine uygulanabilir.



Şekil 4.8. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için Langmuir adsorpsiyon İzotermi

Diğer bir izoterm olan Freundlich izotermine gore moleküllerin adsorplanacağı yüzeyin(adsorbentin) aktif bölgelerinin heterojen olduğu yani farklı türdeki aktif bölgelere sahip olduğunu,adsorpsiyonun tek katman oluşumuyla

sınırlandırılamayacanı,adsorpsiyonun tersinir olduğunu,adsorplanan moleküllerin miktarı tüm bölgelerdeki adsorpsiyonun toplamı olduğunu Langmuir izoterminden yola çıkarak adsorpsiyon davranışlarını açıklamaktadır.

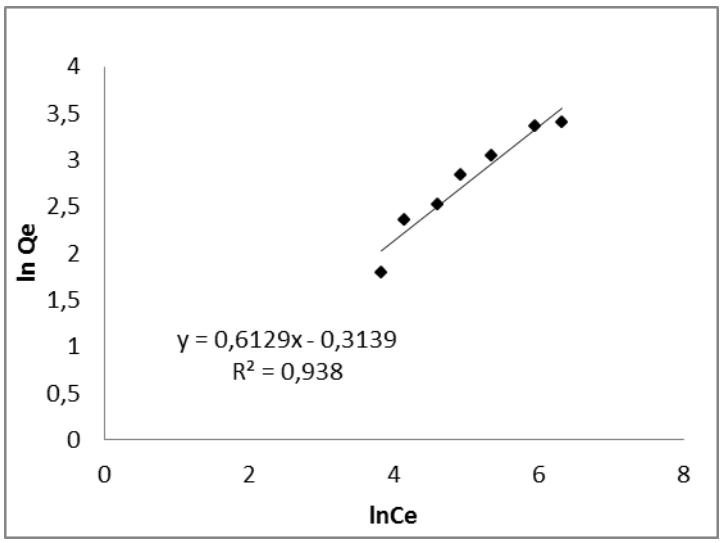
Freundlich, Langmuir eşitliğinden yola çıkarak aşağıdaki eşitlik 4.3'ü türetmiştir.

$$Q_e=K_F\,(C_e)^{1/n} \qquad (4.3)$$

Burada;Q_e,adsorplanmış 17β-Estradiol miktarı (mg/g), C_e , dengedeki 17β-Estradiol derişimi (mg/mL), K_F ve n ise sırasıyla adsorbanın bağıl adsorpsiyon kapasitesi(mg/g) ve adsorpsiyon yoğunluğu olup Freundlich sabitleridir ve n birden büyüktür. Eşitlik 4.3'ün doğal loğaritması alındığında eşitlik 4.4 elde edilir.

$$\ln Q_e=\ln K_F + (1/n)\ln C_e \qquad (4.4)$$

$\ln C_e$ x ekseni olarak, $\ln Q_e$ de y ekseni olarak grafiğe geçildiğinde grafiğin y eksenini kestiği nokta $\ln K_F$ değerini ve grafiğin eğimi de 1/n değerini vermektedir (Şekil 4.9). 1/n değeri yüzey heterojenitesini göstermekte ve 0-1 aralığında değer alır.Yüzey ne kadar heterojense 1/n değeri sıfıra o kadar yakın olur.Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinin 1/n değeri 0.61 olarak bulunmuş ve poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri üzerine adsorpsiyon işlemi çok katmanlı adsorpsiyon şeklinde olmamıştır.



Şekil 4.9. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller için Freundlich adsorpsiyon İzotermi

17β-Estradiol adsorpsiyon izotermleri grafiklerden görüldüğü gibi doğrusala yakın çıkmış ve korelasyon katsayısı yüksek bulunmuştur.Langmuir adsorpsiyon modeli, korelasyon katsayıları ve diğer katsayılar ele alındığında bu sistem için daha uygun olduğu görülmektedir. Çizelge 4.1 Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm sabitlerini ve korelasyon katsayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.1. 17β-Estradiol adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri ve korelasyon katsayıları.

	Langmuir Sabitleri			**Freundlich sabitleri**		
	Q_{max}(mg/g)	**b(mL/mg)**	**R^2**	**K_F**	**n**	**R^2**
Poli(HEMA-MAPA)	196,08	370,41	0,94	140,85	1,63	0,93

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

- 17β-Estradiol adsorpsiyon çalışmaları kesikli sistemde yapılmıştır.

- Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküller mikroemülsiyon polimerizasyonu ile elde edildi. Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerin spesifik yüzey alanı 1890 m^2/g bulunmuştur.
- MAPA monomerinin yapıya girip girmediğinin belirlenmesi amacıyla poli(HEMA-MAPA) ve MAPA'nın FTIR spektrumları alınmış. Her iki spektrumda da ortak olan bandlar MAPA monomerinden kaynaklanan; C=C gerilmesi (1500-1600 cm^{-1}), C-N gerilmesi (1180-1360 cm^{-1}), CH gerilmesi (aromatik, 3010-3100 cm^{-1}), karboksilik asitteki OH gerilmesi (3500-3650 cm^{-1}), asitin ve amidin CO gerilmesi (1690-1760 cm^{-1}), NH gerilmesi (3300-3500 cm^{-1}) amidin CO gerilmesi (1657 cm^{-1}) ve CH gerilmesi (alkil, 2850-2970 cm^{-1}) dir. Bu da MAPA' nın nanopartikülün yapısına girdiğini göstermektedir.

- Taramalı elektron mikroskobundan (SEM) anlaşıldığı üzere poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri küresel ve eş boyutludur. Çapları 120-200 nm aralığında bulunmuştur.

- 17β-Estradiolün poli(HEMA-MAPA) üzerine adsorpsiyonu, 17β-Estradiol derişimi artıkça hızlı bir şekilde artmakta ve belli bir derişimden sonra (100-150 mg/mL arasında) gram başına adsorplanan 17β-Estradiolün miktarı fazla değişmemektedir. Bununda sebebi nanopartiküllerin yüzeylerinin aktif bölgesi 17β-Estradiol tarafından doyurulmasından kaynaklanmaktadır.

- Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerine 17β-Estradiol denge adsorpsiyonu sıcaklık arttıkça artmaktadır.

- 17β-Estradiolün adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi incelenmiş ve iyonik şiddet NaCl ile ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak tuz derişimi arttıkça 17β-Estradiol adsorpsiyon kapasitesi artmıştır.

- Poli(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinden 17β-Estradiolün desorpsiyonu kesikli sistemde yürütülmüştür. Nanopartiküllere desorpsiyon ajanı olarak asetonitril:metanol ile 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü uygulandı ve 17β-Estradiolün 10. adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde geri kazanım % 92,7 olarak elde edildi. Bu da adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde 17β-Estradiolün poli(HEMA-MAPA) üzerine adsorpsiyon kapasitesinde kaydadeğer bir azalma olmadığını gösterir.

- 17β-Estradiol adsorpsiyonu için deneysel maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) ve Langmuir (Q_{max}) değeri birbiriyle uyumludur. Korelasyon katsayısı (R^2) Langmuir izotermi için 0,94 Freundlich izotermi için 0,93'dir. Langmuir adsorpsiyon modeli bu afinite adsorbent sistemine uygulanabilir.

6. KAYNAKLAR

Akgönüllü, S. 2013. L-fenilalanin'in tanınmasına yönelik afinite kartuşlarının hazırlanması. Yüksek lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.Ankara,11.

Allen, E., Doısy, E.1 923. An ovarıan hormoneprelımınary report on ıts localızatıon, extractıon and partıal purıfıcatıon, and actıon ın test anımals.The Journal of the American Medical Association,81(10):819-821.

Alkan, M. H. 2009. Romatoid artrit tedavisine yönelik protein A-takılı poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 35-42.

Arakawa T., Narhi, L.O., 1991. Solvent modulation in Hydrophobic Interaction Chromatography. Biotechnol. Appl. Biochem., 13, 151–172.

Arıca, M. Y., Denizli, A., Salih, B., Pişkin, E., Hasırcı, V. (1997). Catalase adsorption onto Cibacron Blue F3GA and Fe(III) derivatized P(HEMA) membranes and application to a continuous system. Journal of Membrane Science, 129, 65–76.

Atik, S.S, Thomas, J.K., J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 4279.

Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharıde carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.

Bagchi, M.K., Tsai, M.J., O'Malley BW., Tsai S.Y., 1992. Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free systems. Endoc. Rev., 13, 525–35.

Baronti, C., Curini, R., G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili and R. Samperi, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water, 2000. Environ. Sci. Technol., 24, 5059–5066.

Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z. W., Razak, C. N. A., & Salleh, A. B. (1994a). Immobilization of hydrophobic lipase derivatives onto organic polymer beads. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 59, 37–44.

Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z. W., Razak, C. N. A., & Salleh, A. B. (1994b). Stability of hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer

beads. Applied Biochemistry and Biotechnology, 48, 173–183.

Bayraktar M., 1996. Endokrin over hastalıkları, "Endokrinoloji Temel ve Klinik". (Ed. S. Koloğlu)'de, Medical Network & Nobel, Ankara, 669-684, 1996.

Bayramoğlu, G., Denizli, A., Arıca, M.Y., 2002. Membrane with incorporated hydrophobic ligand for hydrophobic interaction with proteins: application to lipase adsorption. Polymer int., 51, 966-972.

Baxter, J.D., Funder, J.W., 1979. Hormone receptors, N. Engl. J. Med., 301, 1149- 1161.

Birkett, J.W.a.L., J.N., 2003. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process. Lewis publishers, London.

Brincat, M.P., Baron, Y.M., Galea, R., 2005. Estrogens and the skin, Climacteric, 8,110-123.

Burçak, C.G., 2002. Hormonlar, 'İnsan Biyokimyası' (Ed. T. Onat, K. Emerk., E.Y. Sözmen)'nda,Palme Yayıncılık, Ankara, 437-464.

Caka, M. Türkcan, C., Aktaş Uygun, D., Uygun, M., Akgöl, S., Denizli, A., 2016. Controlled release of curcumin from poly(HEMA-MAPA) membrane. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016 Mar 22:1-6, DOI:10.3109/21691401.2016.1160913

Candau, F., Encyc. Polym. Sci. Eng., John Wiley, 1987, 9, 718-724.

Candau, F., Polym. Organ. Media, Gordon&Breach: Paris, 1992, Ch. 4.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N.,Skakkebaek, N.E., 1992: Evidence for decreasing quality of semen during post 50 years. BMJ Sept 12, 305 (6854), 609-613.

COM, 2001. Commission of the European Communities. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of human and wildlife (COM (1999) 706). Brussels, 14.06.2001 COM (2001) 262 final.

Colborn, T., Dumanowski, D. and Meyers, J.P., 1997. Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? New York, NY: Plume. Available at: www.ourstolenfuture.org.

D' Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Mancini, R.; Mastropasqua, R.; Nazzari, M.; Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Sci. Total Environ., 302, 199-209.

Denizli A., Küfrevioğlu İ.Ö.,2008. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Ankara

Denizli, A. 2011. Biyoayırma ve Polimerik Taşıyıcılar. Hacettepe Üniversitesi, Tükiye Bilimler Akademisi, 2011. Ankara.

Enmarrk, E., Gustafsson, J.A., 1999. Oestrogen receptors-an overview. J. Int. Med., 246, 133-138.

Feng, L., Ng, Y.K., Macromol., 1990, 23, 1048.

Fenton, S.E..2006. Endocrine-Disrupting compounds and mammary gland development:Early exposure and later life consequences.Endocrinology.147(6),18-24.

Finlay-Moore, O., Hartel, P. G. ve Cabrera, M. L., 2000. 17β-Estradiol and Testosterone in Soil and Runoff from Grasslands Amended with Broiler Litter, 29(5), 1604-1611.

Full, A.P., Puig, J.E., Gron, L.U., Kaler, E.W., Minter, J.R., Mourey, T.H., Texter, J., Macromol., 1992, 25, 5157.

Gan, L., Chew, C.H., Lye, I., Macromol. Chem., 1992, 193, 1249.

Gan, L., Chew, C.H., Lee, K.C., Ng, S.C., Langmuir, 1996, 12, 319.

Guo, J.S., El-Aasser, M.S., Vanderhoff, J.W., J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 1989, 27, 691.

Gyllenborg, J, Rasmussen, S.L, Borch-Johnsen, K, Heitmann, B.R., Skakkebaek, N.E., Juul A., 2001 Cardiovascular risk factors in men: The role of gonadal steroids and sex hormone-binding globulin, Metabolism, 50, 882-888.

Hakk, H., Millner, P. and Larsen, G., 2005. Decrease in Water-Soluble 17{beta}- Estradiol and Testosterone in Composted Poultry Manure with Time. J Environ Qual., 34(3), 943-950.

Halperin, G., Breitenbach, M., Tauber-Finkelstein, M., Shaltiel, S., 1981. Hydrophobic chromatography on homologous series of alkyl agaroses. A comparison of charged and electrically neutral column materials. J. Chromatog., 215, 211–228.

Han, J. Qiu, W., Cao, Z., Hu, J., Gao, W., 2013. Adsorption of ethinylestradiol (EE2) on polyamide 612: molecular modeling and effects of water chemistry. Water Res, 47(7):2273-84.

Hillier S.G., 2005. 100 years of hormones: pathway biology as the fifth force in endocrinology, J. Endocrinol., 184, 3-4.

Hjertén, S., 1973. Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. J. Chromatog., 87, 325–331.

Hjertén, S., 1976. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents, in: Methods of protein separation. Catsimpoolas, N., Ed., Plenum Publishing Corporatin, 2.

Hjertén, S., Yao, K., Eriksson, K.-O., Johansson, B., 1986. Gradient and isocratic High Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of proteins on agarose columns. J. Chromatog., 359, 99–109.

Hofstee, B.H.J., 1973. Hydrophobic affinity chromatography of proteins. Anal. Biochem. 52 430–448.

Hofstee, B.H.J, Otillio, N.F. 1978. Non-ionic adsorption chromatography of proteins. J. Chromatog. 159, 57–69.

Holderoff, S., Guillet, J.E., J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 1990, 28, 1823.

Horak, D., J. Polymer Sci.: Part A: Polymer Chem.,1999, 37, 3785-3792

Hortwitz K.B., Mc Guire W.L., 1980. Nuclear estrogen receptors, J. Biol. Chem., 255, 9699-9705.

Jan Koolman, Klaus-Heinrich Röhm, Hormonlar, 2003. 'Color Atlas of Biochemistry',

Jennissen, H.P., Heilmeyer, I.M.G., 1975. General aspects of hydrophobic chromatography: Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes. Biochemistry, 14, 754–760.

Jennissen, H.P., 1978. Multivalent interaction chromatography as exemplified by the adsorption and desorption of skeletal muscle enzymes on hydrophobic alkyl-ligands. J. Chromatog., 159, 71–83.

Jennissen, H.P., 2002. Hydrophobic Interaction Chromatography. Nature Encyclopedia of Life Sciences, 9, 353-361.Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 336.

Kaufman, R.H., Adam, E., Hatch, E.E., Noller, K., Herbst, A.L., Palmer, J.R. and Hoover, R.N., 2000. Continued follow-up of pregnancy outcomes in diethylstilbestrol-exposed offspring. Obstetrics and Gynecology, 96(4), 483-489.

Kawaguchi, H., H. Prog. Polym. Sci., 2001, 25, 1171.

Kawato, S., 2004. Endocrine disrupters as disrupters of brain function: a neurosteroid viewpoint. Environ Sci., 11 (1), 1-14.

Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S., Leeuwen J.V., 2006. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. Environmental Science & Technology, 40(21), 6537-6546.

Kitler, M.E., 1994. Coronary disease are the gender differences? Eur. Heart. J., 15, 409-417.

Köse, K. 2011. lizozim saflaştırılmasına yönelik hidrofobik manyetik nanopartiküller. Yüksek lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Ankara,38-46.

Lahnsteiner, F., Mansour, N., McNiven, M. A. ve Richardson, G. F. 2009. fatty acids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen: Composition and effects on sperm functionality. *Aquaculture* 298: 118-124.

Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N., 2000. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. Environ. Sci. Technol., 34(18), 3890-3894.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N., 2002b. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. Sci. Total Environ., 289(1-3), 159-168.

Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. and Forlin, L., 1999. Ethinyloestradiol -- an undesired fish contraceptive? Aquat. Toxicol., 45(2-3),91-97.

Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W. ve G.S. Sayler, 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. Environmental Science and Technology 34: 3925-3931.

Lee M.M., 2007. Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology, 109-18.

Leif Kronberg, 2007. Science of the Total Environment, 378, 343-351.

Li, X., Ling, W.T., Liu, J.X., Sun, M.X., Gao, Y.Z., Liu, J., 2015.Immobilization of Estrogen-degrading Bacteria to Remove the 17β-estradiol and Diethylstilbestrol from Polluted Water and Cow Dung. Huan Jing Ke Xue, 36(7):2581-90.

Li, Z. Dvorak, B., Li, X., 2012. Removing 17β-estradiol from drinking water in a biologically active carbon (BAC) reactor modified from a granular activated carbon (GAC) reactor. Water Res, 46(9):2828-36.

Mainwaring, W.I.P., 1980. Steroid receptors, " Cellular Receptors" (Ed. D. Schulster ve Levitzki), John Wiley & Sons, Chichester, 91-125.

Marshall, J.C., 2001. Regulation of gonadotropin synthesis and secretion, Endocrinolgy" (Ed. L.J. DeGroot ve J.L. Jameson)'de, IV. Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1916-1926.

Maisano, F., Belew, M., Porath, J., 1985. Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkyl sulphide agarose derivatives. J. Chromatog., 321, 305–317.

Melander, W., Horvath, C., 1977. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. Arch. Biochem. Biophys., 183, 200–215.

Menteş, G., 2002. Gonadlar ve steroid hormonları, "İnsan Biyokimyası" (Ed. T. Onat,K. Emerk., E.Y. Sözmen)'nda, Palme Yayıncılık, Ankara, 491-500.

Murray, A. Ormeci, B., Lai, E.P., 2011. Removal of 17β-estradiol (E2) and its chlorination by-products from water and wastewater using non-imprinted polymer (NIP) particles. Water Science & Technology, 64(6):1291-7.

Narhi, L.O., Kita, Y., Arakawa, T., 1989. Hydrophobic Interaction Chromatography in alkaline pH. Anal. Biochem., 182, 266–270.

Nghiem, L.D., McCutcheon, J., Schafer, A.L., 2004. The role of endocrine disrupters in water recycling: risk or mania? Water Sci. Technol., 50 (2), 215-220.

Ocarra, P., Barry S., 1974. Griffin T spacer arms in affinity chromatography - use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. Febs Letters, 43, 169-175.

Odian, G., Princ. Polym., 3rd Ed., Wiley Intersci. Publ., 1981.

Okuba, M., Iwasaki, Y., Yamamato, Y., Colloid. & Polym.Sci., 1992, 270, 733.

Okuba, M., Takahashi, M., Colloid. & Polym.Sci., 1994, 272, 422.

Ogata, F., Tominaga, H., Yabutani, H., Kawasaki, N., 2011. Removal of estrogens from water using activated carbon and ozone. J Oleo Sci,60(12):609-11.

Öncel, Ş., 2004. Fenilalanin İçeren Hidrofobik Etkileşim Kromatografi Sorbentlerinin Sentezlenmesi ve Lizozim Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

Özgür, E. 2011. Östradiol tayini için moleküler baskılanmış sensörlerin hazırlanması. Yüksek lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,1-12.

Palani, R. W.R, Sasthaw, M., Cheung, H.M., J. Appl. Polym. Sci., 1993, 47, 499.

Paleos, C.M., Stassinopoulou, C.I., Mallaris, A., J. Phys. Chem., 1983, 87, 251.

Parsegian, V.A., Ninham, B.W., 1970. Temperature-dependent van der Waals forces. Biophys. J., 10, 664–674.

Pombo, M., Castro-Feijóo L, 2005. Endocrine disruptors. J. Ped. Endocrinal. Metab., 18, 1145-1155.

Pocar, P., Brevini, T.A., Fischer, B. and Gandolfi, F., 2003. The impact of endocrine disrupters on oocyte competence. Reproduction, 125(3), 313-325.

Pombo, M., Castro-Feijóo L, 2005. Endocrine disruptors. J. Ped. Endocrinal. Metab., 18, 1145-1155.

Porath, J., Sundberg, L., Fornstedt, N., Olson, I., 1973. Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption.Nature,245,465–466.

Puig, J.E., Perez-Luna, V.H., Perez-Gonzales, M., Macias, E.R., Rodriquez, B.E.,Kaler, E.W., Coll. Polym. Sci., 1993, 271, 114.

Purdom, C. E.; Hardiman, P. A.; Bye, V. J.; Eno, N. C.; Tyler, C.R.; Sumpter, J. P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Ecol., 8, 275-285.

Queiroz J.A., Tomaz, C.T., Cabral J.M.S., 2001, Hydrophobic interaction chromatography of proteins, Journal of Biotechnology 87 (2001) 143–159

Raibaud O., Hoegberg-Raibaud A. and Goldberg M.E., 1975. Purification of E. coli enzymes by chromatography on amphiphilic gels. FEBS Letters, 50, 130– 134.

Rhoades, P.G., 1995. Endocrine control mechanism, “Medical Physiology” (Ed. R.A. Rhoades ve G.A. Tanner), Little Brown and Company, Boston, 633-653.

Rodriguez-Guaddarama, L.A., Mendizabal, E., Puig, J.E., Kaler, E.W., J.Appl. Polym. Sci., 1993, 8, 77.

Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B., Keller, P.J., Dubey, R.K., 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental estrogens influence reproductive function. Human Rep Update 6, 332-50.

Rosengren, J., Påhlman, S., Glad, M., Hjertén, S., 1975. Hydrophobic interaction chromatography on non-charged Sepharose derivatives: Binding of a model protein, related to ionic strength, hydrophobicity of the substituent, and degree of substitution (determined by NMR). Biochim. Biophys. Acta, 412, 51–61.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. and Sumpter, J.P., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. Environ. Sci. Technol., 32(11), 1559-1565.

Saçak, M., Pol. Kim. Gazi Kitap Evi, 2002, 495s.

Saçak, M., Polimer Kimyası, 2002, Gazi Kitapevi, s. 525, Ankara.

Saçak,M.2012.Polimer Teknolojisi. Gazi Kitabevi,s.143-144,153-157,Ankara.

Saha, B., Karounou, E., Streat, M., 2010. Removal of 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinyl oestradiol from water by activated carbons and hypercrosslinked polymeric phases. Reactive & Functional Polymers,70(8):531-544.

Saunders, K. J., Org. Polym. Chem., Second Edn., Chapman& Hall, 1988.

Shaltiel, S.,Er-el, Z.,1973.Hydrophobic chromatography:Use for purification of glycogen synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci., 778–781.

Sherwood, L., 1991. Fundamentals of Physiology, West Publishing Company.

Shons, A., Dorman, F., Najarian, J., 1972. The piezoelectric quartz immunosensor. J. Biomed. Mater. Res., 6, 565–570.

Shirama, H., Suzawa, T., J. Coll. Interface Sci., 1988, 126, 269

Skakebek, N.E., Rajpet-deMeyts, E., Main K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with enviromental aspects. Hum Reprod., 16 (5), 972 – 978.

Solomon GM, Schettler T. Environment and health, 2000. 6.Endocrine disruption and potential human health implications. CMAJ CMAJ Canadian Medical Association Journal Canadian Medicel Asoociation Journal, 1116, 1467-74.

Stachenfeld, N.S., DiPietro L., Palter S.F., Nadel E.R., 1998. Estrogen influences osmotic secretion of AVP and body water balance in postmenopausal women, Am. J. Physiol., 274, 187-195.

Stoffer, J.O., Bone, J., J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 1980, 18, 2641.

Tamai, H., Hasegawa, M., Suzawa, T., J. Appl. Polym. Sci., 1989, 38, 403.

Ternes, T.A., Kreckel, P. and Mueller, J., 1999a. Behaviour and occurrence of

estrogens in municipal sewage treatment plants -- II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci. Total Environ., 225(1-2), 91-99.

Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D. and Servos, M., 1999b. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Sci. Total Environ., 225(1-2), 81- 90.

Tolbert, T., Oparil, S., 2001. Cardiovascular effects of estrogen, Am. J. Hypertens., 14, 186-193.

Tseng, C. M., Lu, N. Y., El-Aesser, M. S., Vanderhoff, J. W., J. Polym. Sci. A, 1986, 24, 2995.

Tuncel, A, Kahraman, R., Pişkin, E., J. Appl. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 1994, 51, 1485.

Tuncel, A., Çiçek, H., Uniform Latex Particles, Hand. Eng. Polym. Mat., Marcel-Dekker, 1997, 189.

Türkmen, D., Denizli, A., Oztürk, N., Akgöl, S., Elkak, A., 2008. Phenylalanine containing hydrophobic nanospheres for antibody purification. Biotechnol Prog, 24(6):1297-303.

Türkoğlu, E. 2014. Östradiol tanıma bölgelerine sahip yüzey plazmon rezonans sensörlerin hazırlanması. Doktora, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara

Tyler, C. R., Spary, C., Gibson, R. Santos, E. M.; Shears, J.; Hill, E. M., 2005. Accounting for differences in estrogenic responses in rainbow trout and rouch exposed to effluents from wastewater treatment works. Environ. Sci. Technol., 39, 2599-2607.

Ugelstad, J., Mork, P.C., Kaggerud, K.H., Ellingsen, T., Berge, A., Adv. Coll. Interface Sci., 1980, 13, 101.

Ugelstad, J., Mork, P.C., Berge, A., Ellingsen, T., Khan, A.A., Emul. Polym., Acad. Pres, 1982, Ch. 11.

Üzek, R. 2011. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile plazmid DNA saflaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara,14-19.

Waring, R.H., Haris, R.M., 2005. Endocrine disrupters: A human risk?, Mol Cell Endocrinol., 244, 2-9.

Water 21 (April, 2004). Disruptive Influences. Magazine of the International Water Association, 20-22.

Weigel, N.L., Rowan, B.G., 2001. Estrogen and progesteron action, "Endocrinolgy" (Ed. L. J. DeGroot ve J.L. Jameson)'de, 4.Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2053-2061.

Wiliams, J.K., Adams, M.R., Herrington, D.M., Clarkson, T.B., 1992. Short-term administration of estrogen and vascular responses of the atherosclerotic coranary arteries, J. Am. Coll. Cardiol., 20, 452-457.

Yılmaz B., 1999. Dişi Üreme Hormonları, "Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi" (Ed. B. Yılmaz)'de, Feryal Matbaacılık, Ankara, 407-430.

Yokosuka, M., Ohtani-Kaneko, R., Yamashita, K. ve ark. Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. Toxicol In Vitro 2007, jul 21.

Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S.A., 2005. Adsorption of 3H-Labeled 17-β Estradiol on Powdered Activated Carbon. Water, Air, and Soil Pollution, 166(1):343–351.

Zava, D.T., Duwe G.,1997. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. Nutr. Cancer. 27 (1), 31- 40.

Zhu, B.T., Conney, A.H.,1998. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. Carcinogenesis 19, 1–27.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı Soyadı : Osman KİREÇ
Doğum Yeri : Siirt
Doğum Tarihi : 01.03.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

Lise : Gazi Lisesi \ Siirt- 2003

Lisans : Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü-2010

Yüksek lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bülümü 2013-