



Proteinleri Ayırmak İçin Ters Faz Kromatografisi (RPC) Kolon Dolgu Materyali Tasarımı: Bölüm 1- Sentez ve Karakterizasyon

Berna SARAÇOĞLU KAYA, Ebru SAĞ*

Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 58140, Sivas / TÜRKİYE

Received: 07.04.2017; Accepted: 23.05.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/csj.349325>

Özet: İki bölümden oluşan çalışmanın ilk bölümünde Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC) için eş boyutlu ve gözenekli partikül formunda poli(vinil asetat-co-divinilbenzen) [poli(VAc-co-DVB)] ve poli(divinilbenzen) [poli(DVB)] kolon dolgu materyalleri “Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu” yöntemi ile sentezlenmiştir. Partiküller bazik ortamda hidrolizlenerek, partikül yüzeyi “hidroksil” formuna dönüştürülmüş ve kromatografik kullanım için uygun yüzey ve gözenek yapısına sahip poli(vinilalkol-co-divinilbenzen) [poli(VA-co-DVB)] partiküller elde edilmiştir. Partiküllerin karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM), yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm sistemi (Brunauer–Emmett–Teller, BET) ve Fourier Transfer Infrared Spektrofotometre (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ile yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eşboyutlu-Gözenekli Partikül, Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu, Kolon Dolgu Materyali.

Design of Reversed Phase Chromatography (RPC) Column Packing Material for Protein Separation: Part 1- Synthesis and Characterization

Abstract: In the first part of the two-part study, the column packed materials in the form of monodisperse and porous particles were synthesized with regard to test their column performances in Reverse Phase Chromatography (RPC). Particles in the form of poly(vinyl acetate-co-divinylbenzene) [poly(VAc-co-DVB)] and poly(divinylbenzene) [poly(DVB)] were produced by “multi-stage micro-suspension polymerization”. The surface of particles were converted to “hydroxyl” form by base hydrolysis that were used as poly(vinylalcohol-co-divinylbenzene) [poly(VA-co-DVB)] particles, having appropriate structural properties like surface and porosity for chromatographic applications. Particle characterization was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM), BET surface area and porosity measurement system and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Keywords: Monodisperse-Porous Particle, Multi-Stage Micro-Suspension Polymerization, Column Packed Material.

1. GİRİŞ

Günümüzde kullanılan en yaygın analitik tekniklerden olan kromatografinin ayırma teknolojisi olarak kullanımı 20.yy’da başlamıştır [1-9]. Kromatografinin temel prensi; örnek bileşenin, sabit ve hareketli

fazlarda farklı oranda bulunma eğilimidir. Kullanılan tekniğin çeşitlendirilebilir ve geliştirilebilir olması çeşitli ilkelerin keşfine, tekniğin hedef ve uygulama alanlarının genişlemesine neden olmuştur [10]. Kromatografi türleri Partisyon Kromatografisi, Kağıt Kromatografisi, İnce

Tabaka Kromatografisi, Gaz Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi olarak kategorize edilebilmektedir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) bu kromatografik yöntemler arasında en çok kullanılan analiz yöntemidir [11]. HPLC, prensip olarak sıvı fazda çözünebilen analitlerin kolon dolgu materyaline olan ilgilerine göre kolondan farklı sürelerde çıkışına dayanmaktadır.

Kimya, biyoloji, genetik, gıda, medikal, tıp vb. birçok alanda geniş uygulama alanlarına sahiptir [12]. Uygulama alanlarına göre farklı ayırma prosesleri etrafında geliştirilen HPLC temel olarak; Normal Faz Kromatografisi (NPC), Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC), İyon Değişim Kromatografisi (IEC), Ters Faz Kromatografisi (RPC) gibi alt başlıklara ayrılmaktadır. Bu ayırma prosesleri arasından Ters Faz Kromatografisi, biyomoleküllerin saflaştırılması, izolasyonu ya da ayrılması için etkin bir şekilde kullanılan analitik yöntemdir. Sistemin kararlılığı, seri ve kısa sürede yüksek verimli analizler gerçekleştirmesi ve mikro ölçekte analiz yapabileme imkânı sunması tercih edilmesinin önemli sebeplerindedir.

Ters fazda çalışan HPLC sistemleri için geliştirilen kolonlar çoğunlukla silika bazlı ticari kolonlardır. Bu kolonlarda kullanılan dolgu materyallerinin eş boyutlu olmayan (polidispers) yapısı düzensiz basınç rejimlerine, gözeneksiz yapıları ise verimsiz protein ayırımlarına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra tekrar kullanılabilirlikleri oldukça düşük olan bu kolonların kimyasal ve mekanik dayanımları da azdır [2-4].

Bu çalışma kapsamında literatürdeki eksiklikler göz önüne alınarak protein saflaştırılması için ters faz kromatografisinde kullanılmak üzere kimyasal ve mekanik dayanımı oldukça yüksek, kısa sürede protein karışımlarını ayırabilecek nitelikte, yüksek

akış hızlarında oldukça verimli çalışan, gerektiğinde yüzey modifikasyonuna elverişli, değiştirilebilir monomer oranları ile farklı boyut ve gözenekliliğe sahip eş boyutlu (monodispers) polimerik partiküller içeren kolonların tasarlanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasallar ve aparatlar

Poli(vinil asetat-co-divinilbenzen) [poli(VAc-co-DVB)] ve poli(divinilbenzen) [poli(DVB)] kolon dolgu materyallerinin sentezinde çıkış lateksi olarak kullanılan polistiren (PS) partiküllerin “*dispersiyon polimerizasyonu*” ile üretiminde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (Et-OH, Merck A.G., Almanya) ve 2-metoksietanol (HPLC grade, Met-OH, Aldrich Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak 2-2'-azobisizobütironitril (AIBN, Acros Organics, ABD) kullanılmıştır. AIBN kullanılmadan önce etanol ile kristalize edilmiştir. Sterik stabilizör olarak da polivinilprolidon K-30 (Mr:40000, PVP K-30, Sigma Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Monomer olarak kullanılan stiren (Sigma Chemical Co., ABD) vakumda distile edilip saflaştırılmış ve polimerizasyonda kullanılmaya kadar +4 °C de muhafaza edilmiştir.

Eş boyutlu ve gözenekli [poli(VAc-co-DVB)] ve [poli(DVB)] partiküllerin “*Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu*” yöntemi ile sentezi için diluent olarak toluen (HPLC grade, Aldrich Chem. Corp., ABD) ile dibütıl ftalat (DBP, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, ABD) kullanılmıştır. Polimerizasyonlarda monomer olarak vinil asetat (VAc, Aldrich Chem. Corp., ABD); çapraz bağlayıcı monomer olarak ise divinilbenzen (DVB, %55 para ve meta-DVB izomerleri Aldrich Chem. Corp., ABD) (%5 NaOH çözeltisi ile ekstrakte

edilerek) kullanılmıştır. Başlatıcı olarak yağda çözünebilen başlatıcılardan seçilen benzoil peroksit (BPO, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmadan önce kurutulmuştur. Polimerizasyonlarda stabilizör olarak polivinilalkol (PVA, MA: 87000-146000, %87-89 hidrolize, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır.

2.2. Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi

Bu çalışma kapsamında iki farklı partikül sentezi gerçekleştirilmiş ve bu amaçla ilk olarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle polistiren (PS) çıkış lateksi üretilmiştir. Daha sonra PS lateks, eşboyut ve gözenekli yapı elde etmek amacıyla tek basamaklı şişme işlemine tabi tutulmuştur. Şişme basamağında düşük molekül ağırlığına sahip ikili organik ajan karışımı ile monomer, çapraz bağlayıcıyı ve başlatıcıyı içeren monomer fazı çıkış lateksi üzerine eklenmiş ve lateksin organik faz ile şişmesi sağlanmıştır. Şişme basamağından sonra monomer fazının partikül içerisinde polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen partiküller tetrahidrofur (THF) ile ekstrakte edilerek sonrasında hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Hidroliz sayesinde sonuç partiküller -OH fonksiyonel gruplu PVA yapısına dönüştürülmüştür.

2.2.1. PS Çıkış Lateksinin Sentezi

Polistiren çıkış lateksleri stirenin dispersiyon polimerizasyonu ile üretilmiş, dağıtma ortamı olarak mutlak etanol (100ml) kullanılmıştır. Sterik stabilizör olarak kullanılan PVP K-30 (1g) dağıtma ortamında çözülmüştür. Uygun hacimdeki stiren (10ml) monomeri ve başlatıcı olarak kullanılan AIBN (0.14g) de dağıtma ortamına eklenmiştir. AIBN'in çözünmesi için 5 dakika süreyle 200 W gücünde bir sonikatörde (Bransonic 200, İngiltere) oda sıcaklığında ultrasonikasyon işlemi yapılmıştır. Sızdırmaz 410ml hacme sahip bir silindirik cam reaktörde bulunan

polimerizasyon ortamı, oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosuna (Memmert WB 14, Almanya) konulmuştur. Polimerizasyon sıcaklığı olan 70°C'ye ayarlanan su banyosu içinde 120 cpm çalkalama hızında 24 saat boyunca dispersiyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimerizasyon sonrasında ürünler oda sıcaklığına soğutulmuştur. Elde edilen PS çıkış lateksi 6000 rpm'te yaklaşık 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. (Hettich UNIVERSAL 320R, Almanya) Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım atılarak 10mL'lik santrifüj tüplerinin içinde çöken partiküllerin üzerine distile su eklenerek sulu ortamda dispers edilmiştir. Elde edilen yeni dispersiyonla santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. Son santrifüj basamağında çöken partiküller yaklaşık 100mL su içerisinde dağıtılarak eşboyutlu polistiren çıkış lateks partikülleri polimerizasyonda kullanılmak üzere hazır duruma getirilmiştir [13].

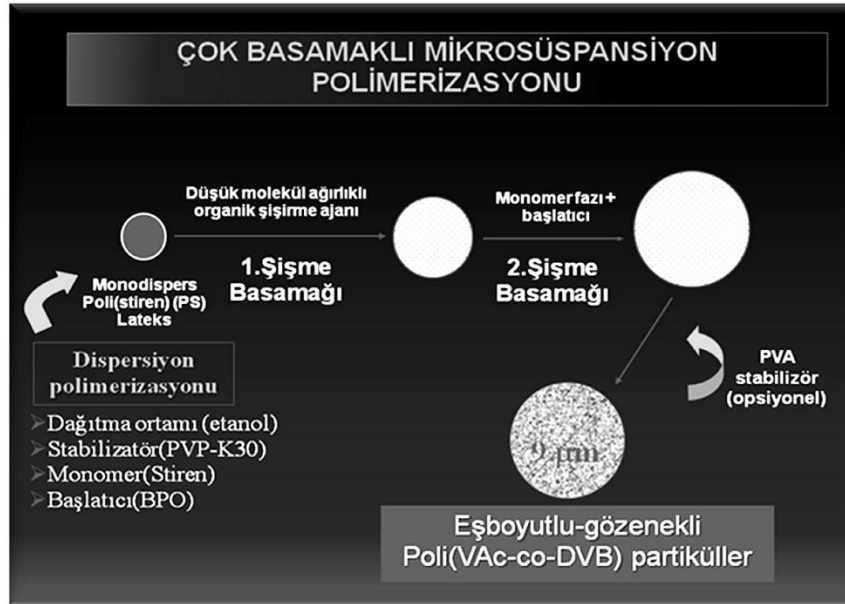
2.2.2. Eşboyutlu-Gözenekli Poli(Vac-Co-DVB) ve Poli(DVB) Mikrokürelerin Sentezi

Destek materyali olarak kullanılacak eşboyutlu-gözenekli mikrokürelerin sentezi "Çok Basamaklı Mikrosüspanسیون Polimerizasyonu" yöntemi ile yapılmıştır. Yöntem, daha önceki çalışmalarda, farklı kimyasal yapıya sahip mikrokürelerin hazırlanması amacıyla geliştirilmiş bir polimerizasyon yöntemidir [14-16]. Yöntemde monomer olarak vinil asetat (VAc), çapraz bağlayıcı olarak ise divinilbenzen (DVB) kullanılmaktadır. Yöntemde çıkış materyali olarak, eşboyutlu PS lateks partiküller kullanılmaktadır [17]. Şekil 1'de görüleceği üzere, eşboyutlu PS lateks partiküller ilk basamakta, su bazlı emülsiyon ortamı içerisinde gerek monomer, gerekse solvent/solvent karışımı içeren bir organik faz ile şişirilmektedir. İkinci basamakta ise

monomer fazı şişmiş partiküller içerisinde polimerize edilerek, eşboyutlu ve gözenekli formda DVB bazlı partiküllerin eldesi sağlanmaktadır.

Poli(VAc-co-DVB) partiküller hacimce iki farklı VAc/DVB oranında (sırasıyla 50:50 ve 0:100) sentezlenmiş ve sırasıyla DVB2 ve DVB3 olarak kodlanmıştır. Partiküllerin sentezinde kullanılan yöntemde sulu emülsiyon için, sürekli faz SDS (0.16 g) ve PVA'nın (0.35 g) sulu ortam (65 mL) içerisinde çözünmesiyle elde edilmektedir. Sulu emülsiyon ortamına, toluen (1.5 mL) ve DBP (1.5 mL), VAc (DVB2 için: 1.6 mL DVB3 için: 0 mL), DVB (DVB2 için: 1.6 mL DVB3 için: 3.2 mL), ve BPO (0.12 g) eklenmektedir. Birinci basamakta elde edilen çıkış lateksini takiben ikinci basamakta (0.08 g) SDS ve (30 mL) distile su, çözelti berrak hale gelene kadar ultrasonikasyonla soniklendikten sonra içine (1.5 mL) Toluene, (1.5mL) DBP eklenen bu karışım, 12 dakika boyunca probsonikasyona (BANDELIN, Almanya) tabi tutularak dispers edilmiştir. Elde edilen emülsiyona eşboyutlu polistiren lateks partiküller (0.15 g) eklenmiştir. Diluent içeren organik fazın lateks partiküllere

transferi ve onları şişirmesi amacıyla elde edilen karışım oda sıcaklığında, 24 saat süreyle, manyetik olarak 400 rpm hızda karıştırılmıştır. Üçüncü basamakta ayrı ortamlarda hazırlanan (0.08 g) SDS ve (30 mL) distile su ve monomer, (0.12 g) BPO karışımları çözeltiler berrak hale gelene kadar ultrasonikasyonla soniklenmiştir. Daha sonra monomer ve başlatıcı içeren karışım, SDS bulunan ortama eklenerek 12 dakika boyunca probsonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyondan çıkan bu karışım ikinci basamak çözeltisine eklenmiştir. Sonuç olarak başlatıcı, monomer ve diluent içeren organik fazın lateks partiküllere transferi ve onları şişirmesi amacıyla elde edilen karışım bir kez daha oda sıcaklığında, 24 saat süreyle, manyetik olarak 400 rpm hızda karıştırılmıştır. Bu süre bitiminde (5 mL) distile su içinde çözülmüş olan (0.35 g) PVA son karışıma eklenerek ortam sıcaklığı, çalkalamalı su banyosunda 70°C'a yükseltilmiş ve şişmiş partiküller 24 saat süreyle, 120 cpm çalkalama hızında polimerleştirilmiştir.



Şekil 1. Eşboyutlu gözenekli poli(VAc-co-DVB) ve poli(DVB) partiküllerin sentezi için kullanılan “Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu” yöntemi.

Elde edilen eşboyutlu-gözenekli formda DVB bazlı partiküllerin sentezi için kullanılan polimerizasyon yöntemi şematik olarak Şekil 1'de verilmektedir. Sentezlenen eşboyutlu gözenekli partiküllerin (DVB2 ve DVB3) ekstraksiyon ve hidroliz aşamaları literatürde verildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir [17].

Polimerizasyon sonucunda ana ürün olarak elde edilen eşboyutlu ve gözenekli partiküllerin dağıtma ortamından ve polimerizasyon yan ürünlerinden ayrılması gerekmektedir. Partiküllerin ortamda bulunan ve sürekli fazda oluşan 1µm civarındaki yan üründen ayrılması amacıyla bir seri santrifüjleme dekantasyon işlemi uygulanmıştır. Santrifüjleme işlemi önce distile su ardından da etanol ile yapılmıştır. Polimerizasyon sonrasında erlenlerden alınan partiküller, 10 mL hacmindeki santrifüj tüplerine konulmuş 1500 rpm'te 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda eşboyutlu makrogözenekli partiküller çökmüş ve yaklaşık 1 µm boyutundaki yan ürünler süpernatantın dekantasyonu ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüjleme-dekantasyon işlemine optik mikroskop ile yapılan gözlemlerle küçük partikül fraksiyonları ortamdan tamamen uzaklaşana kadar devam edilmiştir. Daha sonra elde edilen eşboyutlu makrogözenekli partiküller etanol ortamında dağıtılmış ve 2000 rpm hızında 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Partiküller içinde kalan organik ajanın ve lineer polistirenin ortamdan uzaklaştırılması için partiküller THF ile ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla partiküller 10 mL'lik santrifüj tüplerinde önce THF içine dispers edilmiş, 2000 rpm'te 3 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant

ortamdan uzaklaştırılmıştır. 2 kez yinelenen santrifüj işleminin ardından partiküller yaklaşık 150 mL THF içine alınmıştır. Partiküller, THF ile çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Almanya) 50°C'te 4 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon bitiminde partiküller oda sıcaklığında soğutulmuştur. Polimerizasyon sırasında oluşan mikroküreler içinde sentez aşamasında belirli boşluklar kalmaktadır. Bu boşluklar makrogözenekli yapının temelini oluşturmaktadır. Polimerizasyon sonrasında yapılan su ve etanol yıkamaları sırasında küreler arasında azda olsa bulunan çözünmemiş SDS, THF ekstraksiyonu sayesinde yine küreler içinde bulunan dönüşmemiş monomer ve çıkış lateksinden kaynaklanan lineer polistiren zincirler, çapraz bağlı polimerik matristen sökülüp atılmaktadır. Bu sayede mikroküreler temizlenerek gözenek yapısının tam olarak oluşturulması sağlanmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında partiküller tekrar etanol ve daha sonra distile su ile yıkanarak yaklaşık % 10'luk sulu süspansiyon halinde oda sıcaklığında saklanmaktadır.

Son basamak olarak polimerizasyon sonucunda ekstrakte edilen partiküller sodyum hidroksit (NaOH, Merck A.G., Almanya) ile hidroliz edilmektedir. 0.25 g partikül önce, 0.8 g NaOH içeren 20 mL metanol ile 250 mL'lik pyrex reaktör içinde dağıtılmaktadır. Hidroliz işlemi, 70°C'te 8 saat süreyle çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmektedir. Hidroliz işlemi sayesinde partiküllerdeki poli(VAc) birimleri hidroksil (-OH) fonksiyonel grubu içeren PVA'e dönüşmektedir.

2.3. Kolon Dolgu Materyallerinin Karakterizasyonu

2.3.1. PS Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

PS çıkış lateksinin ortalama boy ve boy dağılımının hesaplanması amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, JEOL JEM 1200 EX, Tokyo Japonya) ile elde edilen mikrograflar kullanılmıştır. Çıkış lateksinin boyutu Dinamik Işık Saçılması (DLS-MALVERN Zetasizer Nano ZS, İngiltere) yöntemiyle saptanmıştır. Bu amaçla lateks partiküller saf su ortamında dağıtılarak polimetil metakrilat (PMMA) küvetlerde analiz edilmiştir. Çıkış lateksinin dispersiyonunun polimerik partikül içeriği ise gravimetrik analiz yöntemiyle bulunmuştur. Bu amaçla sulu ortamda bulunan polistiren partiküller, vakum etüvünde 70°C sıcaklıkta 24 saat süreyle kurutulmuş ve alınan belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği gravimetrik olarak belirlenmiştir.

2.3.2. Eşboyutlu-Gözenekli Poli (Vac-Co-DVB) Mikrokürelerin Karakterizasyonu

“Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu” tekniği ile elde edilen poli(VAc-co-DVB) partiküller, bazik ortamda hidrolizlenerek, -OH grupları içeren poli(vinil alkol-co-divinilbenzen) [poli(VA-co-DVB)] partiküllere dönüştürülmüştür. Bu formun oluşumu, hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen yapının FTIR spektrumunda, vinil alkol (VA) birimlerine ait hidroksil (-OH) bandı ile kanıtlanmaktadır.

Sentezlenen partiküllerin ortalama partikül boyu ve boy dağılımı taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (JEOL, JEM 1200EX, Japan) ile tayin edilmiştir. Bu amaçla 0.1 mL partikül dispersiyonu, örnek diski üzerine konularak, vakum ortamında

50°C’ta kurutulmuştur. Partiküller vakum altında yaklaşık 150 Angstrom kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Görüntüler 1500-4000-15000X büyütme ile SEM cihazında fotoğraflanmıştır.

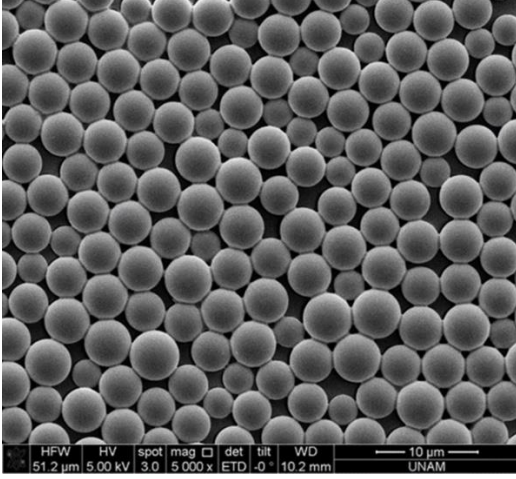
Yüzey alanı ve ortalama gözenek boyutu ve dağılımını veren Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) ile yapılan ölçümlerde: öncelikle partiküller 90°C’da 10 saat süre ile klasik etüvde vakum altında kurutulmuştur. Ardından örnek hücrelerine yerleştirilen partiküllerden, ölçüm cihazında 90°C’da 3 saat süre ile vakumlama ile kalan nem tamamen uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık her bir örnekten 0.1 g alınarak analizler yapılmıştır. Ölçümler sıvı azot içerisine yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmektedir. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gaz basıncından hesaplanması temeline göreler. Yüzey alanı ölçümlerinde BET adsorpsiyon izoterm yöntemi, ortalama gözenek çapı ve dağılımının bulunmasında BHJ metodu kullanılmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. PS Çıkış Lateksinin Karakterizasyonu

Poli(VAc-co-DVB) bazlı partiküllerin sentezinin ilk basamağında iskelet yapı oluşturmak için kullanılan PS çıkış lateksi (Şekil 2) dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş polimerizasyon verimi % 85.6 olarak hesaplanmıştır. Şekil 2’de yer alan SEM görüntüsü partikülün eşboyutlu olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu SEM görüntüsü kullanılarak partiküllerin ortalama çapı 3.10 µm ve partikül dağılımı için değişim katsayısı (CV) değeri % 3,0 olarak hesaplanmıştır.

Çıkış lateksi için yapılan DLS analizi sonucu PS lateksin ortalama partikül çapı $3.08 \mu\text{m}$ ve PDI değeri 0.072 olarak belirlenmiştir. Bu PDI değerinin 0.1 değerinin altında çıkması elde edilen PS latekslerin tekdüze bir dağılım sergilediğini kısaca eşboyutlu yapının iyi olduğunu göstermektedir.



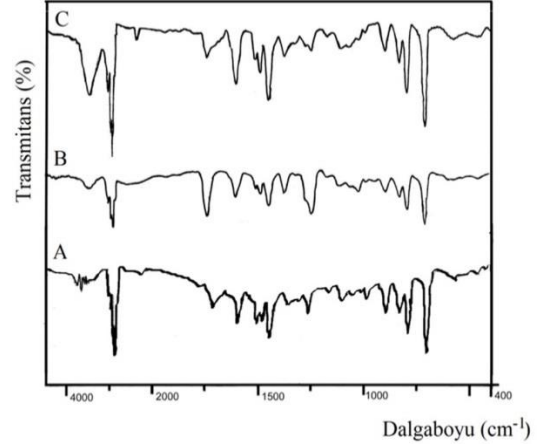
Şekil 2. PS çıkış lateksi SEM görüntüsü (Büyütme:X5000).

3.2. Eşboyutlu-Gözenekli Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.2.1. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Tanımlama

“Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu” tekniği ile elde edilen poli(VAc-co-DVB) partiküller, bazik ortamda hidrolizlenerek, poli(VA-co-DVB) formuna dönüştürülmüştür. Bu formun oluşumu hidrolize partiküllerin FTIR spektrumunda, VA birimlerine ait ve 3500 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen güçlü hidroksil ($-\text{OH}$) bandı ile kanıtlanmıştır. Hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen yapının FTIR analizi Şekil 3’te verilmiştir. Poli(VAc-co-DVB) spektrumundaki $-\text{OH}$ bandının varlığı, polimerizasyon sırasında vinil asetatın kısmen hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Poli(VA-co-DVB) spektrumunda $-\text{OH}$ bandının bağlı şiddetinde artış olduğu net olarak görülmektedir.

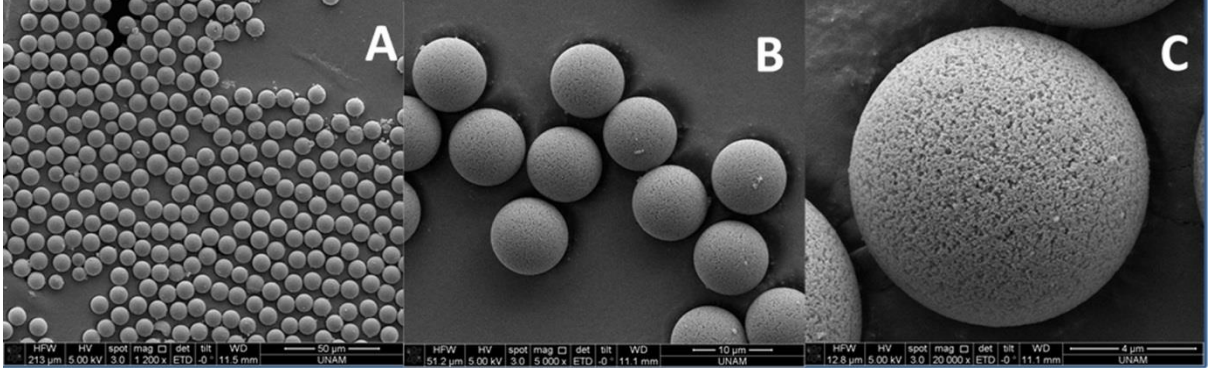
Bunun yanı sıra Şekil 3’te yer alan poli(DVB) ve poli(VAc-co-DVB) spektrumlarına bakıldığında VAc’in yapıdaki varlığını göstermekte olan 1750 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen $\text{C}=\text{O}$ ve 1280 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen $\text{C}-\text{O}$ gerilme pikleri net bir şekilde görülebilmektedir.



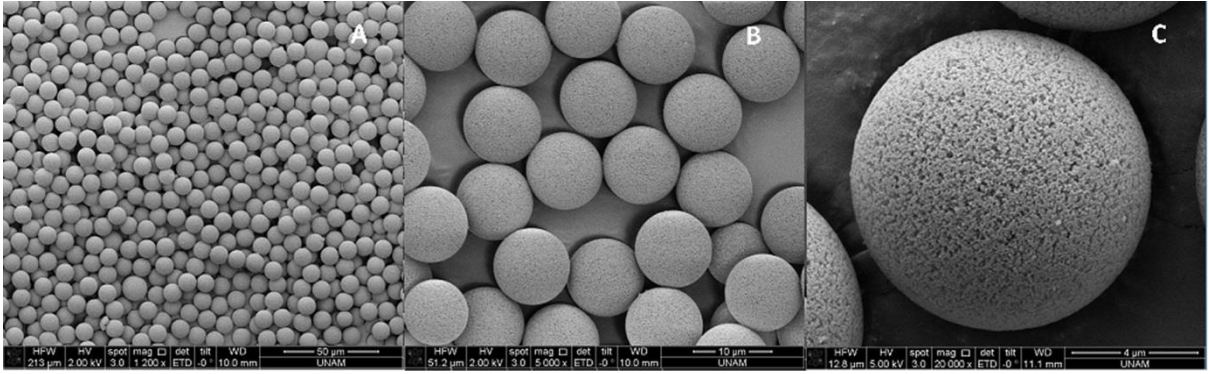
Şekil 3. (A) Poli(DVB), (B) Poli(VAc-co-DVB) ve (C) Poli(VA-co-DVB) partiküllerin FTIR spektrumları.

3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile tanımlama

DVB2 ve DVB3 partiküllerin boyut ve yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu, (scanning electron microscope, SEM) ile incelenmiştir. Her iki tip partikülün de boy ve boyut dağılımı ile yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4 ve 5’de yer almaktadır. Şekil 4A ve 5A’da verilen SEM fotoğrafları kullanılarak, ortalama partikül boyu ve boy dağılımı için değişim katsayısı (CV) hesaplanmıştır. DVB2 ve DVB3 partiküller için ortalama partikül boyu sırasıyla 9.5 ve $9.4 \mu\text{m}$ olarak, boy dağılımı için değişim katsayıları (CV) ise % 5.2 ve 5.8 olarak bulunmuştur. Şekil 4C ve 5C’teki SEM fotoğraflarında ise partikül yüzeyi detaylı olarak görüntülenmiştir. Bu fotoğraflardan yüzeyin gözenekli bir yapıya sahip olduğu açık olarak görülmektedir.



Şekil 4. Poli(VAc-co-DVB) partiküllerin (DVB2) boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: (A) 1200X, (B) 5000X, (C) 20000X.



Şekil 5. Poli(DVB) partiküllerin (DVB3) boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları, Büyütme: (A) 1200X, (B) 5000X, (C) 20000X.

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

BET cihazı kullanılarak poli(VAc-co-DVB) partiküller için elde edilen ortalama gözenek boyutu değerleri DVB2 ve DVB3 kodlu partiküller için sırası ile 40 ve 18 nm olarak hesaplanmıştır. Her iki kolon dolgu materyali için ortalama gözenek boyutu değerlerine bakıldığında bu değerlerin 2-50 nm aralığında değişmesi, gözenek yapısının mezopor yapıda diğer bir deyişle orta-gözeneklilikte olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca özgül yüzey alanları DVB2 ve DVB3 partiküller için sırasıyla 398 ve 344 m²/g olarak bulunmuştur. Bu değerler literatürdeki [16] değerlerden oldukça yüksektir. DVB2 kodlu partiküllerin ortalama gözenek boyutu ve yüzey alanı

değerleri DVB3 kodlu partiküller için elde edilen değerlerden daha büyüktür. DVB2 kodlu partiküllerin sentezinde kullanılan vinil asetatın partiküldeki gözeneklilik ve yüzey alanı değerlerinde artışa neden olduğu düşünülmektedir.

4. SONUÇLAR

- DVB bazlı partiküllerin sentezinde iskelet yapı oluşturmak için kullanılan PS çıkış lateksi dispersiyon polimerizasyonu ile eşboyutlu olarak sentezlenmiş polimerizasyon verimi % 86 olarak belirlenmiştir.
- PS lateks partiküllerin SEM analizi sonucu partiküllerin ortalama boyutu 3,1 µm ve partikül dağılımı için değişim katsayısı (CV) değeri % 3,0 olarak

bulunmuştur. SEM analizi sonuçları DLS analizi ile desteklenmiştir.

- Apolar yapıda kolon dolgu materyali yapımında kullanılan Poli(VAc-co-DVB) ve Poli(DVB) partiküller geliştirilen “Çok Basamaklı Mikro-Süspansiyon Polimerizasyonu” yöntemiyle sentezlenmiştir.
- Poli(VAc-co-DVB) partiküller sodyum hidroksit ile hidroliz edilerek yapısında “hidroksil” gruplarına dönüşmesi sağlanmış ve böylece daha polar yapıda Poli(VA-co-DVB) partiküller elde edilmiştir.
- Sentezlenen eşboyutlu ve gözenekli apolar DVB2 ve DVB3 partiküllerin SEM analizi sonucu ortalama boyutu sırasıyla 9.5 ve 9.4 µm ve değişim katsayısı (CV) değerleri sırasıyla % 5.2 ve 5.8 olarak bulunmuştur. BET analizi sonuçlarına göre mezopor yapıda gözenekliliğe sahip olan partiküllerin sırasıyla yaklaşık 400 ve 350 m²/g gibi oldukça yüksek yüzey alanı değerlerine sahip oldukları saptanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) birimi tarafından (M-571 numaralı proje kapsamında) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1]. Camlı S.T., Şenel S., Tuncel A., Cibacron Blue F3G-A Attached Uniform and Macroporous Poly(styrene-divinylbenzene) Particles For Specific Albumin Adsorption. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 1999, 8, 875-889.
- [2]. Ellingsten T., Aune O., Ugelstad J., Hagen S., Mono-sized Stationary Phases for Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1990, 535, 147-161.
- [3]. Galia M., Svec F., Fréchet J.M.J., Monodisperse Polymer Beads as Packing Material for High-performance Liquid

Chromatography. Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in Presence of Linear Polystyrene as a Porogen, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 1994, 32, 2169-2175

- [4]. Hossoya K., Teramachi M., Tanaka N., Kobayashi A., Kanda T., Ohtsu Y., Preparation Strategy for Uniformly Sized, Polymer-Beads HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency. 1. Copolymerization Technique, *Anal. Chem.*, 2001, 73(24), 5852-5857
- [5]. Lewandowski K., Svec F., Fréchet J.M.J., Polar, A Novel Polar Separation Medium For The Size Exclusion Chromatography of Small Molecules: Uniformly Sized, Porous Poly(vinylphenol-co-divinylbenzene) Beads, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 1997, 20, 227-243
- [6]. Smigol V., Svec F., Fréchet J.M.J., 2-Dimensional High-Performance Liquid-Chromatography Using Monodisperse Polymer Beads Containing Segregated Chemistries Prepared By Pore-Size Specific Functionalization-Single-Column Combinations of Size Exclusion Or Ion-Exchange With Reversed-Phase Chromatography, *Analytical Chemistry*, 1994, 66 (23), 4308-4315
- [7]. Smigol V., Svec F., Fréchet J.M.J., High-Performance Liquid Chromatography of Complex mixtures Using Monodisperse Dual-Chemistry Polymer Beads Prepared by a Pore-Size-Specific Functionalization Process. A Single Column Combination of Hydrophobic Interaction and Reversed-Phase Chromatography, *Analytical Chemistry*, 1994, 66(13), 2129-2138
- [8]. Unsal E., Durdu A., Elmas B., Tuncel M., Tuncel A., A New Affinity-HPLC Packing For Protein Separation: Cibacron Blue Attached Uniform-Porous Poly(HEMA-co-EDM) Beads, *Analytical*

- and Bioanalytical Chemistry, 2005, 383, 930-937
- [9]. Unsal E., Irmak T., Durusoy E., Tuncel M., Tuncel, A., Monodisperse porous particles with polyionic ligands for ion exchange separation of proteins, *Analytical Chimica Acta*, 2006, 570, 240-248
- [10]. Ettre L.S., *Chromatography: the Separation Technique of the 20th Century*. *Chromatographia*, 2000, 51 (1/2), 7-17
- [11]. Engelhardt H., One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations, *Journal of Chromatography B*, 2004, 800(1-2), 3-6
- [12]. Zhang Y.W., Yao S., Zeng H., Song H., Chiral Separation of Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography, *Current Pharmaceutical Analysis*, 2010, 6 (2), 114-130
- [13]. Unsal E., Elmas B., Camli S.T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., Monodisperse-Porous Poly(Styrene-co-Divinylbenzene) Beads Providing High Column Efficiency in Reversed Phase HPLC, *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 95: 1430-1438
- [14]. Unsal E., Camli S.T., Irmak T., Tuncel M., Tuncel A., Monodisperse poly(styrene-co-divinylbenzene) particles (3.2 μm) with relatively small pore size as HPLC packing material, *Chromatographia*, 2004, 60: 553-560
- [15]. Unsal E., Camli S.T., Senel S., Tuncel A., Chromatographic Performance of Monodisperse-Macroporous Particles Produced by "Modified Seeded Polymerization." I: Effect of Monomer/Seed Latex Ratio, *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 92: 607-618
- [16]. Unsal E., Elmas B., Camli S.T., Senel S., Tuncel A., A Uniform Particles For The Reversed Phase Separation of Proteins With High Resolution and High Column Efficiency, *Separation Science and Technology*, 2005, 40: 1425-1438
- [17]. Çağlayan B., Unsal E., Camli T., Tuncel M., Tuncel A., Monodisperse Porous Poly(Vinyl Acetate-Codivinylbenzene) Particles By Single-Stage Seeded Polymerization: A Packing Material For Reversed Phase HPLC. *J. Sep. Sci.*, 2006, 29: 936-944