

## İyon Değişim Kromatografisi İçin Polimerik Ligand İçeren Yeni Destek Materyali: Sentez, Karakterizasyon ve Kromatografik Performans

Berna Saraçoğlu Kaya<sup>1\*</sup> ve Ali Tuncel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 58140, SİVAS

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06532, ANKARA

\*Corresponding author: [berna@cumhuriyet.edu.tr](mailto:berna@cumhuriyet.edu.tr)

<https://orcid.org/0000-0003-4706-5146>

**Özet** – Çalışma kapsamında, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) için tasarlanan, yüzeyinde zayıf katyon değiştirici karboksil (-COOH) grubu taşıyan polimerik ligandlar oluşturulmuş, monodispers ve gözenekli poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(DHPM-co-EDM) partiküller, zayıf katyon değiştirici kolon dolgu materyali olarak protein karışımlarının kromatografik olarak ayrılması amacıyla İyon Değişim Kromatografisi (IEC) modunda denenmiştir. Üç aşamada gerçekleşen çalışmanın ilk aşaması olan kolon destek materyalinin tasarımı adına elde edilen partiküllerin sentezi dört etapta gerçekleştirilmektedir. Öncelikle iskelet yapısını oluşturacak monodispers polistiren mikrojeller “Dispersiyon Polimerizasyonu” ile sentezlenmiş sonrasında bu mikrojeller kullanılarak “Çok Basamaklı Polimerizasyon Yöntemi” ile epoksi gruplarına sahip monodispers-gözenekli poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(GMA-co-EDM) mikroküreler üretilmiştir. Partiküller asidik ortamda hidrolizlenerek yüzey “diol” formuna dönüştürülmüş ve kromatografik kullanım için uygun poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(DHPM-co-EDM) partiküller elde edilmiştir. Son etapta elde edilen partiküller, karboksil grubu içeren polimerik ligand üretimi için “Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu” (SRAP) yönteminde kullanılmıştır. Yüzeyinde -OH grupları bulunan poli(DHPM-co-EDM) partiküller 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM) ile silanlanmış ve metakrilik asit (MAA) ile türevlendirilerek iyon-değişim kromatografisi için yüzeyinde poli(MAA) ligand oluşturulmuş poli(DHPM-co-EDM) partiküller elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci ve üçüncü aşaması olan partiküllerin karakterizasyonu ve kromatografik performansları incelenmiş, SRAP ile sentezlenen partiküllerin ortalama boyu 5.9 µm, ortalama-gözenek boyutu 33 nm ve özgül-yüzey alanı 21 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Zayıf katyon değiştirici kolon ile 200-320 µm aralığında değişen teorik tabaka yüksekliği değerleri elde edilmiş, 15 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşen ayırma için kromatogramdaki pik çözünürlük değerlerinin 1.4’ün üstünde olduğu görülmüş, protein geri kazanım değerlerinin ise bütün proteinler için %90-100 arasında olduğu tespit edilmiştir. Üretilen poli(MAA)-aşılansız-poli(DHPM-co-EDM) kolon için analitlerin, analizden analize ve günden güne tekrarlanabilirlik deneyleri sonucu BSS değerleri %1’in altında bulunmuştur. Bu sonuçlar sentezlenen kolon dolgu materyallerinin başarılı bir şekilde iyon değişim kromatografisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu (SRAP), Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi (HPLC), İyon Değişim Kromatografisi (IEC), Monodispers ve Gözenekli Polimerik Partiküller

## Novel Support Material with Polymeric Ligand for Ion Exchange Chromatography: Synthesis, Characterization and Chromatographic Performance

**Abstract** – Within the scope of the study, polymeric ligands with weak cation exchange carboxyl (-COOH) groups formed on the surface, designed for High Performance Liquid Chromatography (HPLC), monodisperse and porous poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), poly(DHPM-co-EDM) particles were tested in Ion Exchange Chromatography (IEC) mode for chromatographic separation of protein mixtures as a weak cation exchange column-material. The synthesis of the particles obtained for the design of the column support material, which is the first step of the study carried out in three stages, takes place in four different sections. Firstly, monodisperse polystyrene microgels to form the skeletal structure were synthesized by “Dispersion Polymerization”, then monodispersed-porous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), poly(GMA-co-EDM) microspheres with epoxy groups were produced by using “multi-stage microsuspension polymerization”. The particles were hydrolyzed in acidic medium to form the surface in diol form and poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), poly(DHPM-co-EDM) particles were obtained which were suitable for chromatographic use. The particles obtained in the last step were used in the “Free Radical Grafting Polymerization” (FRGP) method for the production of polymeric ligand containing carboxyl group. Poly (DHPM-co-EDM) particles with -OH groups on the surface are silanated with 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMSPM) and derivatized with methacrylic acid (MAA) to form poly(MAA) ligand on the surface of poly(DHPM-co-EDM) particles were obtained for ion-exchange chromatography. The characterization and chromatographic performance of the particles were investigated in the second and third stages of the study. For particles synthesized by the FRGP method, the average particle size was 5.9 µm, the average-pore size was 33 nm and the specific-surface area was 21 m<sup>2</sup>/g. Theoretical plate height values between 200-320

µm were obtained for weak cation exchange column. The peak resolution values in the chromatogram were found to be above 1.4 for separation as short as 15 minutes. Protein recovery values were found to be between 90-100% for all proteins. For the produced poly(MAA)-grafted-poly(DHPM-co-EDM) column, the BSS values of the analytes from analysis to analysis and from day to day reproducibility tests were below 1%. These results showed that synthesized column packed materials can be successfully used in ion exchange chromatography.

*Key words: Free Radical Grafting Polymerization (FRGP), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ion Exchange Chromatography (IEC), Monodisperse and porous polymeric particles.*

## I. GİRİŞ

“Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)” kromatografik ayırma teknikleri arasında yer alır. HPLC kolonlarında, dolgu materyali olarak organik veya inorganik bazlı mikro-küreler ve bunların türevlendirilmiş formları kullanılmaktadır. HPLC kolon dolgu materyalleri üzerine yapılan araştırmalar, polimer bazlı partiküllerin küresel, gözenekli ve monodispers (eş boyutlu) formda sentezlenmesinin ve türevlendirilmesinin silikaya göre kolaylığı, çeşitliliği, pH kararlılığı, kromatografik uygulamalarda uygun yapıya sahip olmaları nedeniyle polimer yapıdaki partiküller üzerine yoğunlaşmıştır. çoğunlukla ticari HPLC kolonları farklı boy dağılımına sahip (polidispers) gözenekli yapıda olduğundan kolon içerisinde kanallaşma olmakta ve bu da kromatografik performansı azaltmaktadır. Monodispers gözenekli partiküller varlığında ise, kolonda oluşan düzenli akış profili nedeniyle yüksek kromatografik ayırma yeteneği elde edilebilmektedir. Bu partiküllerin üretim yöntemi genellikle “Çok Basamaklı Polimerizasyon” olarak adlandırılır [1]-[11].

HPLC uygulamalarının birçok modu için (İyon değişim kromatografisi, Hidrofobik etkileşim kromatografisi, Normal faz kromatografisi, Afinite kromatografisi, Ters faz kromatografisi) polar ya da farklı polaritelerde kolonlar kullanılmaktadır. Uygulamalarda, analitlerin kolondan kolay ve kısa bir sürede çıkışının sağlanması için polar yapıda mikro-küreler ihtiyacı duyulmaktadır [6]-[8], [12]-[19]. Günümüzde ticari olarak mevcut bu özellikteki partiküllerin çoğu silika bazlı ve polidispers yapıdadırlar.

Polar yapıdaki partiküllere ihtiyaç duyulan iyon değişim kromatografisi (Ion-Exchange Chromatography, IEC) kolonları, genellikle silika veya polimer bazlı bir destek üzerinde iyon değiştirici grupların oluşturulması ile üretilmektedir. Sabit fazlarda en çok tercih edilen iyonik gruplar, güçlü kation değiştirici sülfonik asit ( $-SO_3H$ ), zayıf kation değiştirici karboksilat ( $-COO^-$ ), güçlü anyon değiştirici kuaterner amonyum ve zayıf anyon değiştirici dietilamino ( $-N(C_2H_5)_2$ ) şeklinde sıralanabilir. Bu grupları içeren ligandlar ya direkt olarak, yada bir uzatma kolu (spacer-arm) ile bağlı şekilde silika veya polimer bazlı sabit faz üzerine yerleştirilmektedir. Özellikle yüksek molekül ağırlıklı analitler varlığında, sterik veya elektrostatik engeller nedeniyle oluşan kısıtlı analit-ligand etkileşimi ve bunun sonucu olarak ortaya çıkan yetersiz kromatografik ayırma, iyon değişim kromatografisinde karşılaşılan önemli sorunlardan biridir. Yapılan yeni çalışmalar, iyon-değişim kromatografisi için sabit faz olarak kullanılan partiküllere direkt takılan iyon değiştirici ligandlar yerine, uzun ve esnek yapıda, kolaylıkla analitler ile etkileşim yapabilen, *polimer yapıda* zincirlerin sentezi üzerinedir. Polimer zincir şeklinde olan ligandlar ile ligand ve analit etkileşiminde ortaya çıkan

problemler bu şekilde bertaraf edilmektedir. Bu yapılan çalışmalarda, polimerik ligand eldesi için “Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu” yanı sıra “Canlı/Kontrollü Polimerizasyon” olarak bilinen yeni yüzey türevlendirme yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle sentezlenen güçlü kation değiştirici “sülfonik asit” ve zayıf anyon değiştirici “dimetilamino” gruplarını içeren sabit fazlar iyon değişim kromatografisi ile protein ayırımında başarıyla kullanılmıştır [7], [8], [18], [19].

Sunulan çalışma kapsamında sentezlenen İyon Değişim Kromatografisi (IEC) zayıf kation değiştirici kolon destek materyali polar poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) poli(DHPM-co-EDM) formuna dönüştürülebilir reaktif “epoksi” grubuna sahip fonksiyonel yapıdaki poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) poli(GMA-co-EDM) partiküller kullanılarak sentezlenmiştir. “Epoksi” grupları “diol” formuna dönüştürülmüş ve böylece polar yüzey yapısına sahip, proteinlerin iyon değişim kromatografik analizlerine uygun yüzey ve gözenek yapısına sahip monodispers, gözenekli poli(DHPM-co-EDM) partiküller uygun ortalama boyuta, ortalama gözenek çapına, özgül yüzey alanı değerine sahip olacak şekilde elde edilmiştir.

Çalışmada karboksil grubu içeren polimerik ligand üretimi için “Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu” (SRAP) yöntemi kullanılmıştır. Yüzeyinde  $-OH$  grupları bulunan poli(DHPM-co-EDM) partiküller, 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM) ile silanlanmış ve metakrilik asit (MAA) kullanılarak analitler ile kolayca etkileşebilecek moleküler uzunlukta poli(MAA) ligandlar oluşturulmuştur. Elde edilen poli(MAA)-aşılansız-poli(DHPM-co-EDM) kolon dolgu materyalleri karakterize edilerek IEC sabit fazı olarak proteinlerin ayrılması amacıyla denenmiştir.

## II. MATERYAL VE METOD

Yapılan çalışmalar üç ana başlık altında toplanmaktadır: İlk olarak IEC kolon materyallerinin sentezi ikinci olarak elde edilen materyallerin karakterizasyonu ve son olarak IEC kolon dolgu materyallerinin kromatografik performansının test edilmesi.

### A. IEC Kolon Dolgu Materyallerinin Üretimi

IEC kolon materyallerinin sentezi ise dört etapta gerçekleşmektedir: monodispers polistiren mikrojellerin dispersiyon polimerizasyonu ile eldesi, polistiren mikrojeller kullanılarak “Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu” ile monodispers gözenekli formda ve reaktif “epoksi” grubuna sahip poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(GMA-co-EDM) partiküllerin sentezi, sentezlenen partiküllerin asidik hidrolizi ile polar yüzeye sahip, poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) poli(DHPM-co-EDM) partiküller elde edilmesi ardından son olarak “Serbest Radikal Aşılama

Polimerizasyonu” yöntemi ile poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin 3-(trimetoksisisilil)propil metakrilat (TMSPM) ve metakrilik asit (MAA) kullanılarak türevlendirilmesi sonucu poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) kolon dolgu materyallerinin elde edilmesi.

#### A1. Monodispers polistiren (PS) mikrojellerin üretimi ve karakterizasyonu

Monodispers makrogözenekli partiküllerin üretiminin ilk basamağında monodispers yapıda polistiren mikrojeller elde edilmiştir.

PS mikrojellerin sentezinde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (72 ml, Et-OH, Merck A.G., Almanya) ve 2-metoksietanol (48 ml, HPLC grade, Met-OH, Aldrich Chemical Co., ABD), başlatıcı olarak 2-2'-azobisizobüronitril (0.44 g, AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere), stabilizör olarak polivinilprolidon K-30 (2.1 g, Mr:40000, PVP K-30, Sigma Chemical Co., ABD), monomer olarak stiren (20 ml, S, Yarpet, Kocaeli, Türkiye) (vakumda distile edilip saflaştırılmış ve +4 °C de depolanmış) kullanılmıştır.

Polistiren mikrojellerin dispersiyon polimerizasyonu sızdırmaz cam kaplarda gerçekleştirilmiş, dağıtma ortamı olarak hacimce %60 etanol %40 2-metoksietanol içeren toplam 120 ml çözelti hazırlanmıştır. PVP K-30 dağıtma ortamında çözülmüş ve stiren monomeri ile AIBN dağıtma ortamına eklenmiştir. AIBN'nin çözünmesi için oda sıcaklığında 5 dakika süreyle 200 W gücünde bir sonikatör (Branson 200, İngiltere) kullanılmıştır. Sızdırmaz 250 ml hacimdeki kırılmaz cam reaktörde, 70°C'de çalkalamalı su banyosunda (Gallenkamp, ABD) 120 cpm çalkalama hızında 24 saat boyunca dispersiyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir.

PS mikrojeller 6000 rpm'de santrifüjlenmiş sonrası çöken partiküller distile su ile santrifüjleme-dekantasyon işlemi 3 kez tekrarlanarak yıkanmıştır. Partiküller yaklaşık 100 ml su içerisinde dağıtılarak monodispers polistiren mikrojeller polimerizasyonda kullanılmak üzere hazır duruma getirilmiştir [9]-[11].

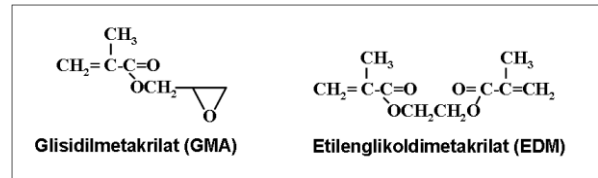
PS mikrojellerin ortalama boylarının ve boy dağılımının belirlenmesi için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, JEOL JEM 1200 EX, Tokyo Japonya) kullanılmıştır. Mikrojellerin ortalama molekül ağırlığı HPLC'de izokratik modda Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (GPC) yöntemiyle çalışılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla Shimpack 804 kolon ve mobil faz olarak THF kullanılmış ve polistiren standart enjeksiyonu ile sayıca ortalama molekül ağırlığı tayin edilmiştir. Mikrojellerin dispersiyonunun polimerik partikül içeriği ise gravimetrik analiz yöntemiyle tayin edilmiştir [9], [11], [20].

#### A2. Monodispers-gözenekli poli(GMA-co-EDM) mikrokürelerin üretimi

Monodispers-gözenekli poli(GMA-co-EDM) mikro-küreler “çok basamaklı polimerizasyon yöntemi” ile elde edilmiştir. Yöntem, farklı mikrokürelerin hazırlanması amacıyla geliştirilmiş bir polimerizasyon yöntemidir [9]. Yöntemde monomer olarak glisidil metakrilat (GMA), çapraz bağlayıcı olarak ise etilenglikol dimetakrilat (EDM) kullanılmaktadır (Şekil 1). Yöntemin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmektedir. Yöntemde monodispers polistiren (PS) mikrojeller partiküller kullanılmaktadır [11]. Şekil 2'de görüleceği üzere, monodispers PS partiküller ilk basamakta,

hem su bazlı emülsiyon ortamı içerisinde monomer, hemde solvent/solvent karışımı içeren bir organik faz ile şişirilmektedir. İkinci basamakta ise monomer fazı şişmiş partiküller içerisinde polimerize edilerek, monodispers ve gözenekli formda poli(glisidil metakrilat-co-etilenglikol dimetakrilat), poli(GMA-co-EDM) partiküllerin eldesi sağlanmaktadır [18], [19].

Partiküllerin bu yöntemle sentezi için diluent olarak toluen (HPLC grade, Aldrich Chem. Corp., ABD) ve izoamillalkol (IAA, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, ABD) kullanılmıştır. Polimerizasyonlarda monomer olarak glisidilmetakrilat (GMA, Aldrich Chem. Corp, ABD); çapraz bağlayıcı monomer olarak ise etilenglikol dimetakrilat (EDM, Aldrich Chem. Corp., ABD) kullanılmıştır (Şekil 1). Başlatıcı olarak seçilen benzoil peroksit (BPO, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve stabilizör olarak polivinilalkol (PVA, Mr: 87000-146000, %87 hidrolize, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır [9].

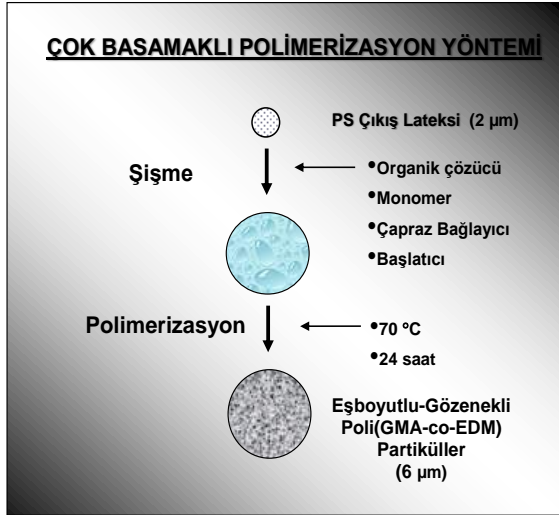


Şekil 1. Poli(GMA-co-EDM) bazlı mikrokürelerin sentezinde kullanılan monomer ve çapraz bağlayıcı.

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

Partiküllerin çok basamaklı polimerizasyon yönteminde (Şekil 2) sulu emülsiyon için, SDS (0.30 g) ve PVA'nın (0.35 g) sulu ortam (120 mL) içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Sulu emülsiyon ortamına, toluen (6.40 mL, Aldrich), GMA (3.80 mL), EDM (2.60 mL), IAA, (0.50 mL) ve BPO (0.16 g) eklenmiştir. Bu karışım, 30 dakika boyunca ultrasonikasyonda dağıtılmış ve içine monodispers polistiren mikrojeller partiküller (0.40 g) eklenmiş sonrasında oda sıcaklığında, 24 saat süreyle, manyetik olarak 400 rpm hızda karıştırılmıştır. Son olarak ortam sıcaklığı, 70°C'a yükseltilmiş ve şişmiş partiküller içerisinde polimerizasyon, çalkalamalı su banyosunda, 24 saat süreyle 120 cpm çalkalama hızında yapılmıştır.

Sentezlenen monodispers poli(GMA-co-EDM) partiküllerin ekstraksiyon ve hidroliz aşamaları literatürde verildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir [9], [11], [18], [19].



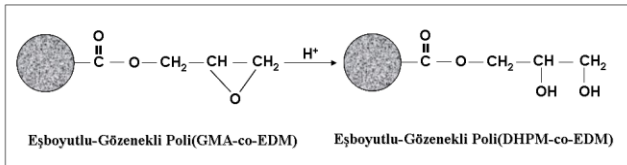
Şekil 2. Monodispers gözenekli poli(GMA-co-EDM) partiküllerinin sentezi için kullanılan "çok basamaklı polimerizasyon yöntemi".

Polimerizasyon sonrasında partiküllerin yıkanması ve atık ürünlerden temizlemesi amacıyla santrifüjleme işlemi önce distile su ardından da etanol ile yapılmıştır. Daha sonra elde edilen partiküller etanol ortamında dağıtılmış ve 150 ml THF içine alınmıştır. Partiküller, THF ile çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Almanya) 50°C'de 4 saat süreyle ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

Bu işlem sonrasında yapıda bulunan polistiren zincirler, çözünerek uzaklaştırılmış ve yerine gözenek halinde boşluklar bırakmıştır. Zaten monodispers olan poli(GMA-co-EDM) mikroküreler içinde bu şekilde gözenekler elde edilmiştir. Partiküller etanol ve distile su ile yıkanarak hidroliz işlemine hazır hale getirilmiştir [6]-[9].

### A3. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerinin elde edilmesi

Poli(GMA-co-EDM) kopolimeri yüzeyinde -OH gruplarının oluşturulması amacıyla sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck A.G., Almanya) ile hidroliz edilmiştir. Bu işlem partiküller ve 50 ml 0.5 M %95'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile 500 ml'lik pyrex bir erlende 60°C'de 12 saat süreyle çalkalayıcı bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Böylece GMA birimlerindeki epoksi halkası açılarak -OH fonksiyonel grubu içeren dihidroksipropilmetakrilat (DHPM) birimleri oluşmaktadır. Bu dönüşümün şematik gösterimi Şekil 3.'de verilmiştir [6]-[9].



Şekil 3. Monodispers-gözenekli poli(GMA-co-EDM) partiküllerinin asidik hidrolizi ile poli(DHPM-co-EDM) partiküllerinin eldesi.

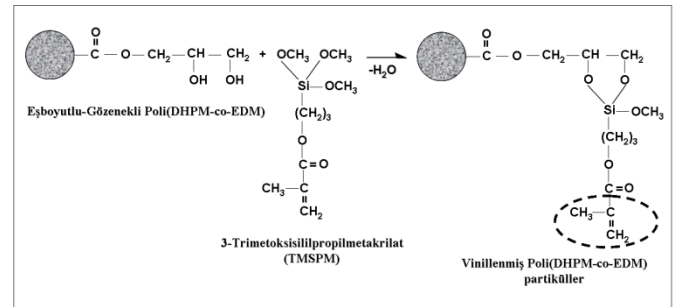
### A4. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemiyle monodispers ve gözenekli HPLC kolon dolgu materyalinin üretimi

Polimerik liganda sahip, eş boyutlu gözenekli iyon değişim kromatografisi kolon materyallerinin yüzeyinin Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile türevlendirilmesini ve kromatografik performanslarının test edilmesini içermektedir. Çalışmaların ilk bölümünde monodispers ve gözenekli

formda poli(GMA-co-EDM) partiküller sentezlenmiş ve bu partiküllerin asidik ortamda hidrolizi sonucunda poli(DHPM-co-EDM) partiküller elde edilmiş ve partiküllerin üzerinde 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM) ile vinil grupları oluşturulmuş ardından Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile metakrilik asit (MAA)'in çözeltilen partikül yüzeyine aşılansak anyonik yapıda polimerik ligand taşıyan IEC kolon dolgu materyalleri elde edilmiştir. IEC kolona doldurulan partiküller, kromatografik performanslarının belirlenmesi amacıyla, İyon Değişim Kromatografisinde (Ion Exchange Chromatography, IEC) kolon dolgu materyali olarak test edilmiştir.

Partiküllerin vinillenmesi için 3-(trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM, Aldrich Chem. Co., A.B.D.) ve toluen (HPLC grade, Aldrich Chemical Co., ABD) kullanılmıştır. Üzerinde vinil gruplarını taşıyan partiküllerde polimerik ligand oluşturmak amacıyla dimetilformamid (DMF, Riedel de Haen, Almanya), monomer olarak metakrilik asit (MAA, Aldrich Chem. Co. A.B.D.) ve başlatıcı olarak 2-2'-azobisisobütironitril (AIBN, BDH Chemicals LTD., İngiltere) kullanılmıştır.

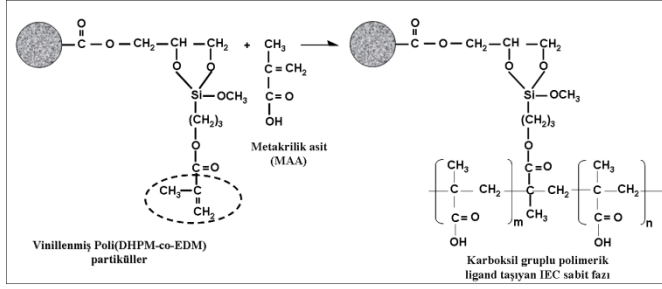
Poli(DHPM-co-EDM) partiküller vinilleme işlemi için vakum etüvünde 70°C kurutulmuştur. Poli(DHPM-co-EDM) partiküller (2.50 gr) sızdırmaz özellikteki silindirik reaktöre (reaktör hacmi, 60 ml) alınarak toluen (40 ml) ve TMSPM (2.50 ml) karışımında dağıtılmıştır. Reaktör oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Almanya) yerleştirilerek çalkalama hızı 120 cpm'de ısıtma işlemi başlatılmıştır. Vinilleme işlemi bu sıcaklıkta 24 saat süre devam etmiş ve bu sürenin sonunda oda sıcaklığına soğutulmuştur. Partiküller sonrasında mutlak etanol ile 3 kez santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak yıkanmış ve vakum etüvünde 24 saat süreyle 80°C'da kurutulmuştur. Poli(DHPM-co-EDM) mikrokürelerin vinillenme reaksiyonu şematik olarak Şekil 4'de verilmektedir [19].



Şekil 4. Monodispers-gözenekli poli(DHPM-co-EDM) partiküllerinin 3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat (TMSPM) ile vinillenmesi.

Üzerinde vinil grubu taşıyan poli(DHPM-co-EDM) partiküller (2.50 g), sızdırmaz özellikteki silindirik pyrex reaktöre (reaktör hacmi, 60 ml) alınmakta ve etanol (EtOH, 50 ml) ve monomer olarak kullanılan MAA (2.00 mL) ile başlatıcı olarak kullanılan AIBN (0.06 g) karışımı içinde dağıtılmıştır. Daha sonra reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Almanya) yerleştirilmiş ve çalkalama hızı 120 cpm değerine ayarlanarak polimerizasyon, 75°C sıcaklıkta 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda partiküller 2 defa alkol ve 2 defa su ile yıkandıktan sonra kolona doldurulmaya hazır hale getirilmiştir. Vinil grupları taşıyan Poli(DHPM-co-EDM) mikrokürelerin MAA monomeri ile etkileşimi sonucunda elde edilen zayıf anyonik polimerik

ligand taşıyan iyon eğişim kromatografisi dolgu materyalinin şematik reaksiyonu Şekil 5’de verilmektedir.



Şekil 5. Vinil grubu taşıyan monodispers-gözenekli poli(DHPM-co-EDM) partiküllerinin MAA ile "Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu" sonucu elde edilmiş poli(anionik) ligand taşıyan kromatografik kolon dolgu materyali.

## B. Monodispers ve Gözenekli HPLC Kolon Dolgu Materyallerinin Karakterizasyonu

### B1. FTIR ile karakterizasyon

Çok Basamaklı Süspansiyon Polimerizasyonu tekniği ile elde edilen poli(gilidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) (poli(GMA-co-EDM)) partiküller, asidik ortamda hidrolizlenerek, poli(2,3-dihidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) poli(DHPM-co-EDM) yapıda monodispers gözenekli partiküller elde edilmiştir. Bu oluşum, hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen yapının FTIR spektrumunda kanıtlanmaktadır.

### B2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile karakterizasyon

Monodispers ve gözenekli 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 kurutulmuş ve vakum altında yaklaşık 150 Angstrom kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Görüntüler 1500-4000X büyüme ile SEM cihazında fotoğraflanmıştır [18], [19]. Yaklaşık 50 partikül içeren SEM fotoğraflarının değerlendirilmesi ile, sayıca ortalama partikül boyu ve boy dağılımı için eğişim katsayısı (CV, %) değeri belirlenmiştir.

### B3. BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile karakterizasyon

Yüzey alanı ve ortalama gözenek boyutu ve dağılımını veren Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) ile yapılan ölçümlerde örnek hücrelerine yerleştirilen partiküller (0.1 g), ölçüm cihazında (90°C ve 3 saat) vakumlama ile kurutulmuştur. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gaz basıncından hesaplanması temeline göredir. Yüzey alanı ölçümlerinde BET adsorpsiyon izoterm yöntemi, ortalama gözenek çapı ve dağılımının bulunmasında BHJ metodu kullanılmıştır [9].

## C. Kromatografik Çalışmalar

### C1. IEC kolonun doldurulması

Çalışmada 4.6 mm iç çapına ve 50/100 mm uzunluğa sahip çelik kolon (Schimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Kolon

mobil faz olarak sadece su kullanımı ile yaklaşık 200 atm basınç altında doldurulmuştur. Dolum işlemi sonrasında kolon yaklaşık 1’er saatlik süreler ile dolum basıncında analizlerde kullanılacak mobil faz türü ile yıkanmıştır.

### C2. Kromatografik performans testleri

Bu kısımda yapılan kromatografik performans testlerinde analit olarak 4 farklı protein (Sigma) içeren örnek karışımı kullanılmıştır. Bu proteinlerin seçiminde izoelektrik nokta (pI) değerleri göz önüne alınmıştır. Hazırlanan kolonun mümkün olduğunca geniş bir pI aralığında kromatografik ayırma yapabilmeleri hedeflenmiştir. Katyon eğişim kromatografisi modunda gerçekleştirilen deneylerde mobil faz olarak farklı pH’larda farklı tamponlar kullanılmıştır.

HPLC sisteminde iyon-eğişim kromatografisi ile protein ayırma yönelik deneyler gradyent koşullarda gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlar bir UV-dedektör ile 280 nm’de kaydedilmiştir. Protein ayırma amacıyla yapılan kromatografik testlerde, miyoglobin (pI:7.2), ribonükleaz A (pI: 9.5), sitokrom C (pI:10.2) ve lizozim (pI:10.5) içeren protein karışımı kullanılmıştır. Bu karışım, literatürde iyon eğişirici kolonların kromatografik performanslarının tayininde yaygın olarak kullanılan, standard bir karışımdır [10], [12], [13], [19]. Gradyent koşullarda yapılan kromatografik deneylerde mobil faz pH değeri 6.0-8.0 aralığında eğiştirilmiştir. 4-morfolinoetansülfonik asit (MES, Sigma), sodyum fosfat, N-(2-hidroksietil)piperazin-N’-(2-etansülfonik asit) (HEPES, Sigma)’in 20 mM’lık tampon çözeltileri sırasıyla, pH 6, 7 ve 8 değerine sahip mobil fazların eldesi amacıyla kullanılmıştır. Bu tampon çözeltilerden biri ile hazırlanan belirli bir pH değerine sahip mobil faz gradyent koşullarda gerçekleştirilen kromatografik deneylerde mobil faz A olarak kullanılmıştır. Her bir pH değeri için mobil faz B ise mobil faz A + 0.5 ya da 1 M NaCl şeklinde oluşturulmuştur. Gradyent, besleme % 100 mobil faz A iken, % 100 B’ye çalışılan kolon türüne bağlı olarak seçilen bir gradyent süresinde lineer olarak geçilmesi ile uygulanmıştır.

### C3. Kromatografik Parametrelerin Tayin Edilmesi

Belirtilen koşullarda elde edilen kromatogramlardan kolon performanslarını belirleyici parametreler hesaplanmıştır. Her analizde sisteme enjekte edilen örnek karışımındaki tüm bileşenler için taban genişliği ve pik yarı yüksekindeki taban genişliği gibi eğişkenler ölçülüp sırasıyla teorik tabaka sayısı ve çözünürlük gibi kolon performansını belirleyici parametreler hesaplanmıştır. Tüm bileşenler için taban genişliği ve pik yarı yüksekindeki taban genişliği gibi eğişkenler ölçülüp sırasıyla teorik tabaka sayısı ve çözünürlük gibi kolon performansını belirleyici parametreler hesaplanmıştır.

### Pik çözünürlüğü (R)

Elde edilen kromatogramlarda belirli bir protein için pik çözünürlüğü,  $R(n+1/n)$ , eşitlik (1)’e göre hesaplanmıştır. Burada  $R(n+1/n)$ , seçilen pik (n+1) ile bir önceki pik (n) arasındaki çözünürlüğü ifade etmektedir.  $t_{n+1}$  ve  $t_n$  ise enjeksiyon noktasından itibaren, sırasıyla pik n+1 ve pik n için alıkonma sürelerini göstermektedir.  $W_{n+1}$  ve  $W_n$  ise sırasıyla pik n+1 ve pik n için taban genişliğini ifade etmektedir.

$$R(n+1) / (n) = 2 [(t_{n+1} - t_n) / (W_n + W_{n+1})] \quad (1)$$

*Teorik tabaka sayısı (N) ve Teorik tabaka yüksekliği (h)*

Teorik tabaka sayısı ve yüksekliği değerleri, izokratik modda yapılmış, sitokrom C'nin analit olarak kullanıldığı kromatografik deneyler sonucu hesaplanmıştır.

*Protein geri kazanımı*

İyon değişim kromatografisi analizlerinde kullanılan tüm protein türleri için bu değerler poli(MAA) ligand içeren partiküllerin kullanıldığı kolon ile optimum analiz koşulları kullanılarak hesaplanmıştır. Deneylerde 1 mg/mL protein içeren çözelti kolona enjekte edilmiştir. Kolonlu ve kolonsuz elde edilen pik alanlarından geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

*Tekrarlanabilirlik*

Genelde Bağlı Standart Sapma (BSS) ile ifade edilir ve aşağıdaki ifade ile hesaplanabilir.

$$RT_n = \sum N_i RT_i / \sum N_i \quad (2)$$

$$SS = \sqrt{\sum N_i (RT_i - RT_n)^2 / (\sum N_i - 1)} \quad (3)$$

$$\% BSS = SS / RT_n \quad (4)$$

Burada;

$RT_n$ ; sayıca ortalama alıkonma süresini, SS; standart sapma, BSS; bağlı standart sapmayı,  $N_i$ ; analiz sayısını,  $RT_i$ ; i no'lu alıkonma süresini ifade etmektedir.

### III. SONUÇLAR

Çalışmada öncelikle monodispers gözenekli yapıda polimerik partiküller sentezlenmiş ve partiküller, poli(MAA) anyonik ligandına sahip iyon değişim kromatografisi kolon materyaline dönüştürülmüştür. Sentezlenen partiküller FTIR, Taramalı Elektron Mikroskopu, BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı ile karakterize edilmiştir. Kromatografik analizlerde, gradyent koşulları ve akış hızı değiştirilerek bu değişimlerin kolon ayırma yeteneğine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla direkt olarak anyonik grup bağlanan kolon referans olarak kullanılmıştır.

#### A. Poli(GMA-co-EDM) ve poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin karakterizasyonu

Poli(GMA-co-EDM) bazlı partiküllerin sentezinin ilk basamağında kullanılan mikrojeller dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Mikrojel önceki çalışmaları tanımlanmış olup, özellikleri Tablo 1'de verilmektedir [20].

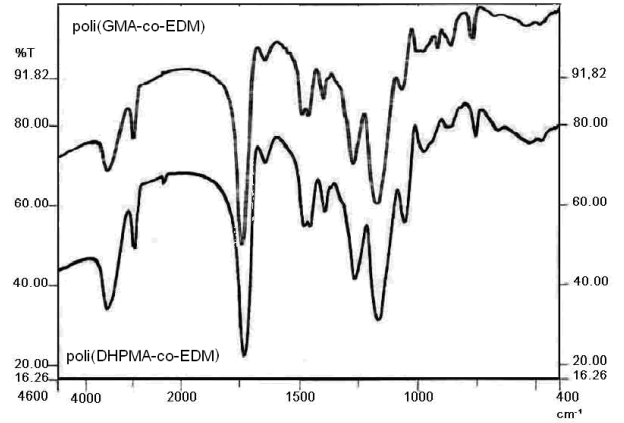
Tablo 1. Polistiren(PS) mikrojellerin özellikleri

Polimerizasyon verimi (% w/w)	81
Ortalama Partikül Çapı ( $D_n$ , $\mu\text{m}$ )	2.1
CV (Değişim katsayısı) (%)	2.2
Sayıca Ortalama Mol. Ağırlığı ( $M_n$ )	$6.0 \times 10^4$

#### A1. FTIR ile tanımlama

Poli(GMA-co-EDM) partiküller, asidik ortamda hidrolizlenerek, poli(DHPM-co-EDM) formuna dönüştürülmüştür. Bu formun oluşumu hidrolize partiküllerin FTIR spektrumunda, DHPM birimlerine ait ve  $3500 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda gözlenen güçlü hidroksil (–OH) bandı ile kanıtlanmıştır. Hidroliz öncesi ve sonrası elde edilen yapının FTIR analizi Şekil 6'da verilmiştir. Poli(GMA-co-EDM)

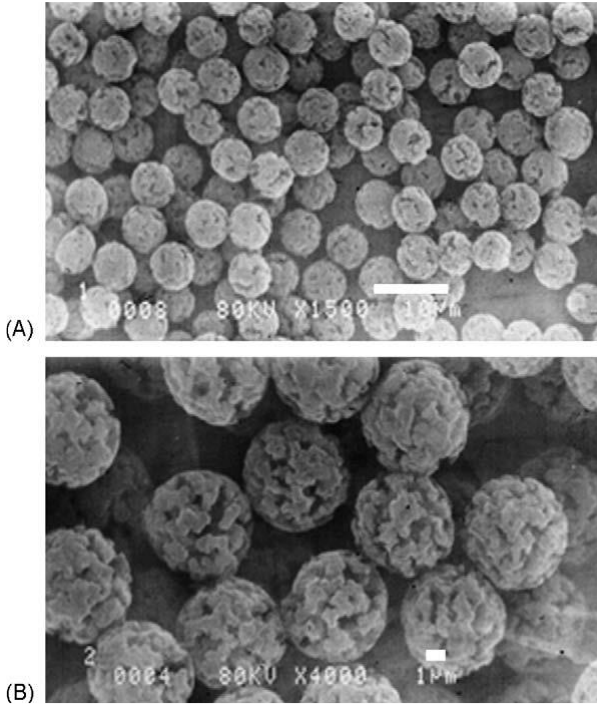
spektrumundaki –OH bandının varlığı, polimerizasyon sırasında glisidil metakrilat (GMA) yapısında bulunan epoksi halkasının kısmen hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Hidroliz işleminde ise polimerik yapıda kalan epoksi halkaları, asit katalizöründe açılarak yine –OH fonksiyonel gruplu formu oluşturmaktadır. Poli(DHPM-co-EDM) spektrumunda –OH bandının bağlı şiddetinde artış olduğu net olarak görülmektedir. Hidroliz işlemi koşulları seçilirken mevcut literatür bilgisi kullanılmış ve partikül yapısındaki epoksi gruplarının tamamını hidroksil formuna dönüştürecek sıcaklık ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  derişimi tercih edilmiştir [9], [21].



Şekil 6. Poli(GMA-co-EDM) ve poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin FTIR spektrumu.

#### A2. Taramalı Elektron Mikroskopu ile tanımlama

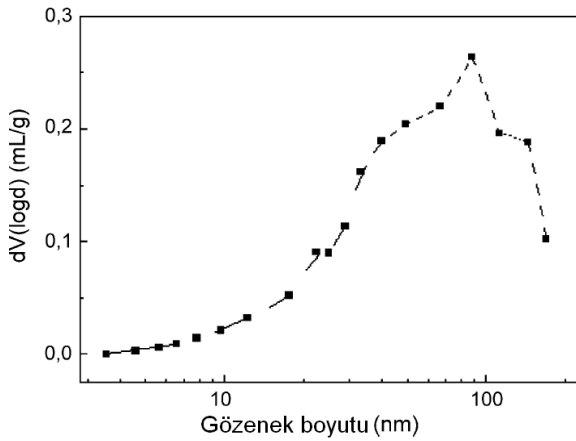
Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin boyut ve yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskopu, (scanning electron microscope, SEM) ile incelenmiştir. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin boy dağılımı ile yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 7A ve 7B'de verilmektedir. Şekil 7A ve 7B'de verilen SEM fotoğrafları kullanılarak, ortalama partikül boyu  $5.9 \mu\text{m}$  ve boy dağılımı için değişim katsayısı (CV) %3.9 hesaplanmıştır. Şekil 7A ve 7B'deki SEM fotoğraflarında ise partikül yüzeyi detaylı olarak görüntülenmekte, yüzeyin gözenekli bir yapıya sahip olduğu açık olarak görülmektedir.



Şekil 7. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları, Büyütmeye: (A) 1500X, (B) 4000X.

#### A3. BET Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı ile karakterizasyon

BET cihazı kullanılarak poli(DHPM-co-EDM) partiküller için gözenek hacmi 0.18 ml/g ve özgül yüzey alanı 21 m<sup>2</sup>/g olarak ölçülmüştür. Bu değerlerin tayininde kullanılan ve BET cihazı ile elde edilen gözenek dağılım eğrisi ise Şekil 8’de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi partiküller için, gözeneklerin önemli bir bölümü, 30-150 nm ve boyut aralığında toplanmıştır. Ortalama gözenek boyutu değerleri ise 33 nm olarak hesaplanmıştır.



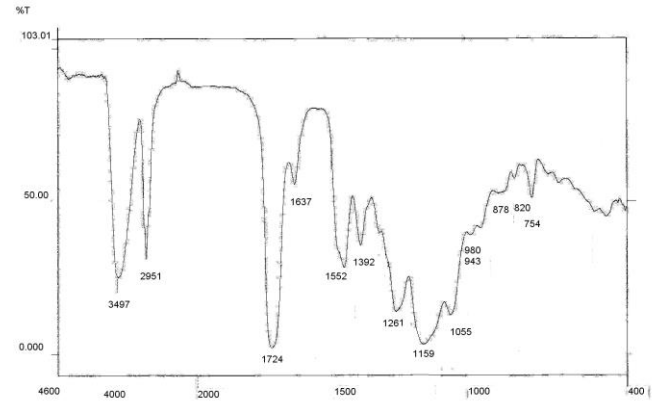
Şekil 8. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin BET yöntemi ile elde edilen gözenek dağılım eğrisi.

#### A4. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin TMSPM ile vinillenmesi

Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile sentezlenen kolon dolgu materyali için hazırlanan poli(DHPM-co-EDM) partiküller kullanılmıştır. Şekil 4’de yer alan reaksiyon şeması temelinde partikül yüzeyinde bulunan -OH grupları, vinilleme ajanı olarak kullanılan TMSPM ile etkileştirilerek

yüzeyde poli(MAA) bağlanması için gerekli vinil grupları oluşturulmuştur. Bu reaksiyonda TMSPM için partikül üzerine bağlanan iyonik monomer miktarı kuru partikül başına 0.26 mmol/g olarak tayin edilmiştir.

Poli(DHPM-co-EDM) partiküllere TMSPM bağlanması FTIR ile incelenmiştir. Vinil grubu taşıyan partiküllere ait FTIR spektrumu Şekil 9’da verilmiştir. Bu spektrumda 1637 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda yer alan ve vinil grubuna ait olan bant, partiküllere TMSPM bağlandığının göstergesidir.



Şekil 9. Poli(DHPM-co-EDM) partiküllerin TMSPM ile vinillenmesi sonrasında ait FTIR spektrumu.

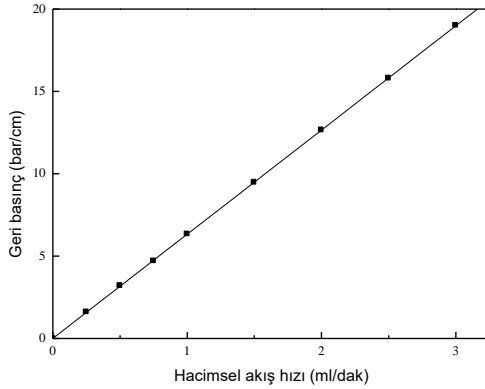
#### A5. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemiyle vinillenmiş partiküller üzerine Poli(MAA) polimerik ligand sentezi

Çalışmanın bu bölümünde zayıf iyon değiştirici yapıda polimerik ligand taşıyan iyon değiştirici destek materyalinin sentezinde yüzeye aşılama tekniği kullanılmıştır. ortalama partikül boyu 5.9 µm olan monodispers-gözenekli poli(DHPM-co-EDM) partiküller yüzeyindeki hidroksil gruplarının TMSPM ile etkileştirilmesi sonrasında MAA ile polimerizasyona sokularak, yüzeyde partiküle kovalent olarak bağlı poli(MAA) ligand oluşumu sağlanmıştır. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile yapılan çalışmalarda akrilamidometilpropan sülfonik asit (AMPS), dimetilaminoetilmetakilat (DMAEM) ve dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPM) monomeleri kullanılarak zayıf ve kuvvetli iyon değiştirici kolon dolgu materyalleri sentezlenmiş ve iyon-değiştirici sabit fazı olarak kullanılmıştır [19].

Sıvı kromatografisinde sabit faz ve bağlı ligandın büyük molekülleri içeren analitler ile etkileşimi önemlidir. Ligand ve analitler arasındaki etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla destek materyaline ligandın bağlanması için uzatma kolu kullanımına gerek duyulmaktadır. Bu sayede sterik engelleme (steric hindrance) ve elektrostatik itme (electrostatic repulsion) kaynaklı zorluklar ortadan kaldırılabilir. Çalışmada polimerik ligand kullanımı sayesinde kolon dolgu materyali ile analitler arasında uygun etkileşimin sağlanması ve protein karışımının iyon değişimi ile verimli bir şekilde ayrılması amaçlanmıştır. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile elde edilen partiküller için partiküllerin poli(MAA) ligand içeriği 0.49 mmol MAA/g partikül olarak bulunmuştur.

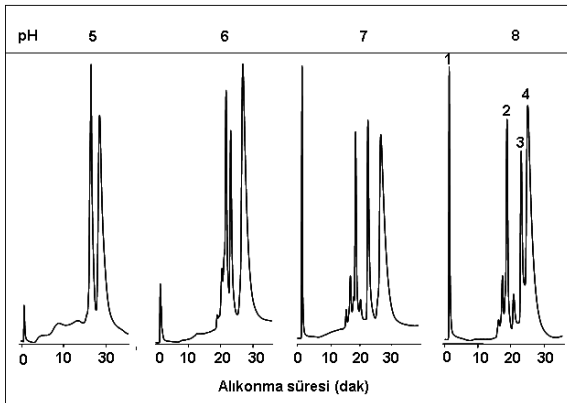
**B. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile Üzerinde Poli(MAA) İyonik Ligandı Sentezlenmiş Poli(DHPM-co-EDM) Partiküllerin İyon Değişim Kromatografisi ile Protein Ayrımı**

Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile sentezlenen partiküller, yüksek basınç altında (200 bar) paslanmaz çelik HPLC kolonuna doldurulmuştur. İlk aşamada bu kolonun geri-basınç akış hızı davranışına bakılarak, HPLC sistemi için uygunluğu denenmiştir. Hazırlanan poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren kolonun geri basınç-akış hızı davranışı Şekil 10'da gösterilmektedir.



Şekil 10. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile elde edilen poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren HPLC kolonunun geri basınç-akış hızı davranışı. Mobil faz: 20 mM fosfat tamponu, pH 7. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d.

Buradan görüleceği üzere, kolon geri basınç değeri, 3 ml/dk gibi yüksek sayılabilecek bir akış hızında 10 cm uzunluğunda kolon için yaklaşık 180 bar'dır. Bu beklenen bir sonuçtur. Çünkü iyonlaşma yeteneği olmayan sabit bir matrisle bağlı poli(MAA) zincirlerinden oluşan yapı, matrisin kendisinin iyonlaştığı, asidik hidroliz ile elde edilen yapıya kıyasla daha düşük geri-basınç değeri oluşturmaktadır. Şekil 10'da dikkati çeken bir başka özellik, geri basınç-akış hızı ilişkisinin doğrusal olmasıdır. Bu da kolon içerisinde yüksek basınçtan ötürü herhangi bir partikül deformasyonunun meydana gelmediğini gösterir. Elde edilen sonuç kolon materyalinin IEC'de kullanım için uygun akış davranışına sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 11. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren kolon kullanılarak, iyon değişim kromatografisi ile gradyent koşullarda protein ayrımını gösteren örnek kromatogramlar, Akış hızı (mL/dak): 0.75, Gradyent süresi (dak): 30, Mobil faz: A: 20 mM asetat tamponu (pH 5), 4-morfolinoetansülfonik asit (MES) tamponu (pH 6), fosfat tamponu (pH 7), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansülfonik asit) (HEPES) tamponu

(pH8), B: (A) + 0.5 M NaCl, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.

Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile elde edilen poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren IEC kolonunun kromatografik performansı, iyon değişim kromatografisi ile en iyi koşullarda protein ayrımı yapılarak incelenmiştir. Bu amaçla, Miyogloblin, Ribonükleaz A, Sitokrom C ve Lizozim içeren protein karışımı kullanılmıştır. Kromatografik çalışmaların ilk bölümünde mobil faz pH'nın kromatografik ayırma etkisi incelenmiş ve pH 7, kullanılan protein karışımı için en iyi kromatografik ayırımın gözlendiği pH değeri olarak seçilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 11'de verilmiştir.

Farklı mobil faz pH değerlerinde yapılan analizlere ait kromatogramlar incelendiğinde pH 5 de Miyogloblin ve Ribonükleaz A ve pH 6 da ise sadece Miyogloblin kolona tutunduğu görülmektedir. Bu durum literatürde ve ticari olarak üretilen güçlü kation değiştiriciler için de görülmektedir. Ribonükleaz A'nın izoelektrik noktası 9.5, Miyogloblinin izoelektrik noktası ise 7.2'dir. Bu noktanın altında (pH 5 ve 6) protein üzerindeki net yük pozitif olmaktadır. Bu durumda protein ile kolon içerisinde yer alan poli(MAA) grupları arasındaki iyonik etkileşimi kırmak için uygulanan tuz gradyenti protein ile poli(MAA) arasındaki etkileşimi yenememektedir [7], [8], [10], [18], [22].

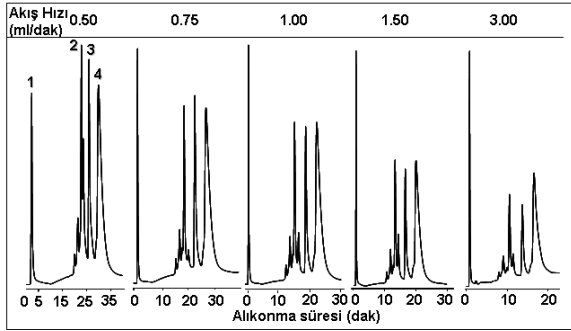
Tablo 2. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile üretilen poli(MAA)-aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) kolonun kromatografik davranışına mobil faz pH'nın etkisi.

pH	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
5	17.4	-	1.2
6	15.7	1.0	1.5
7	16.7	3.1	1.6
8	19.4	3.6	0.9

Akış hızı (mL/dak): 0.75 Gradyent süresi (dak): 30, Mobil faz: A: 20 mM asetat tamponu (pH 5), 4-morfolinoetansülfonik asit (MES) tamponu (pH 6), fosfat tamponu (pH 7), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansülfonik asit) (HEPES) tamponu (pH8), B: (A) + 0.5 M NaCl, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm.

Farklı mobil faz pH'ı değerlerinde elde edilen kromatogramlar kullanılarak hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri ise Tablo 2'de verilmektedir. HPLC kromatogramında piklerin birbirinden tam olarak ayrıldığı ifade eden eşik çözünürlük değeri 1.5 olarak kabul edilmektedir. Tablo 2'de özellikle pH 7 ve 8'de elde edilen çözünürlük değerleri, bu değer çok üzerindedir. Bu değerler proteinlerin iyi kromatografik ayrımını net olarak göstermektedir. Mobil faz pH değerleri bazında bir kıyaslama yapıldığında en iyi çözünürlük değerlerinin pH 8'de elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle kromatografik çalışmaların sonraki bölümünde pH 8 değerine sahip mobil faz kullanımına karar verilmiştir [7], [8], [10], [18], [22].





Şekil 12. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen poli(MAA)-aşılanmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren kolon kullanılarak, iyon değişim kromatografisi ile gradyent koşullarda protein ayırımı gösteren örnek kromatogramlar, Akış hızı (mL/dak): 0.5, 0.75, 1.0, 1.50, 3.0, Mobil faz: A: 20 mM fosfat tamponu (pH 7), B: 20 mM fosfat tamponu (pH 7) + 1 M NaCl, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda 30 dakikada geçiş. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.

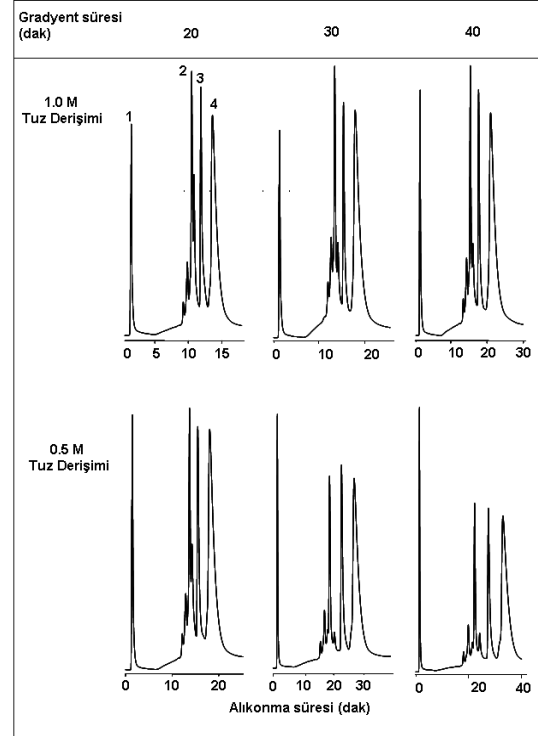
Kromatografik çalışmaların ikinci bölümünde, kolonun kromatografik davranışına mobil faz akış hızının etkisi incelenmiştir. Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile üretilen poli(MAA) aşılanmış partiküller için farklı akış hızları ile elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 12'de verilmiştir.

Kromatografik koşullar içerisinde kolon performansını etkileyen en önemli parametrelerden biri mobil faz akış hızıdır. Kolondan maksimum verim alabilmek için sistemin optimum akış hızındaki koşullarda çalıştırılması gerekir. Kromatogramlar (Şekil 12) incelendiğinde çalışılan bütün akış hızlarında kromatografik ayırımın yapılabildiği görülmektedir. Kolon tüm analitleri 3 ml/dk gibi yüksek bir akış hızında 20 dakika gibi kısa bir sürede başarılı şekilde ayırabilmektedir. Artan akış hızı ile piklerin birbirleriyle örtüşmeyip çözünürlüğün korunması kolonunun yüksek performansının bir göstergesidir. Bu kolon için farklı akış hızlarında elde edilen pik çözünürlüğü değerleri Tablo 3'de verilmektedir.

Tablo 3. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile üretilen poli(MAA)-aşılanmış-poli(DHPM-co-EDM) kolonun kromatografik davranışına mobil faz akış hızının etkisi.

Akış Hızı (mL/dak)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.50	13.0	1.5	1.3
0.75	16.7	3.1	1.6
1.00	16.9	3.4	1.8
1.50	18.8	3.5	2.0
3.00	19.1	4.0	2.3

Mobil faz: A: 20 mM fosfat tamponu (pH 7), B: 20 mM fosfat tamponu (pH 7) +0.5 M NaCl, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda 30 dakikada geçiş. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.



Şekil 13. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen poli(MAA)-aşılanmış-poli(DHPM-co-EDM) partikülleri içeren kolon kullanılarak, iyon değişim kromatografisi ile gradyent koşullarda protein ayırımı gösteren örnek kromatogramlar, Akış hızı (mL/dak): 0.75, Gradyent süresi (dak): 20, 30, 40 Mobil faz: A: 20 mM fosfat tamponu (pH7), B: 20 mM fosfat tamponu (pH 7) +0.5 ve 1 M NaCl, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda geçiş. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.

Pik çözünürlüğünün artan akış hızı ile korunduğu görülmektedir. Akış hızının 0.5 mL/dak'dan 1.5 mL/dak'ya yükseltilmesi ile kromatografik ayırma yeteneği korunurken analiz süresi yaklaşık üç kat kısaltılabilmektedir [7], [8], [10], [18], [22].

Takip eden bölümde Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile üretilen kolonun kromatografik davranışına gradyent süresinin ve mobil fazdaki tuz derişiminin etkisi incelenmiştir. Üretilen poli(MAA) aşılanmış partiküller için farklı gradyent süreleri ve tuz derişimleri ile elde edilen kromatogramlar Şekil 13'de verilmiş, gradyent süresinin 20 dak ve mobil fazdaki tuz derişiminin 1.0M olduğu koşulda analiz süresinin 15 dakika gibi kısa bir sürede tamamlandığı görülmüştür [7], [8], [10], [18], [22].

Farklı gradyent sürelerinde elde edilen kromatogramlara ait çözünürlük değerleri Tablo 4'da verilmiştir. Kromatogramlar ve Tablo 4 incelendiğinde tüm koşullarda ayırma performansının yeterli olduğu görülmektedir. Artan gradyent süresi ile çözünürlük değerleri artmakta ancak analiz süresinde uzamaktadır. Analiz süresinin 15 dakika olduğu durumda en uygun gradyent süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.

Kolon için farklı mobil faz pH değerleri bazında bir kıyaslama yapıldığında en iyi çözünürlük değerlerinin pH 7 değerinde elde edildiği görülmektedir. Bu pH değerinde yapılan bütün aramalarda seçilen proteinlerin kromatografik ayırımının çok iyi yapılabildiği görülmüştür. Bu kromatogramlarda, proteinler artan izoelektrik nokta değeri bazında oluşan sırayla ve keskin pikler halinde her bir

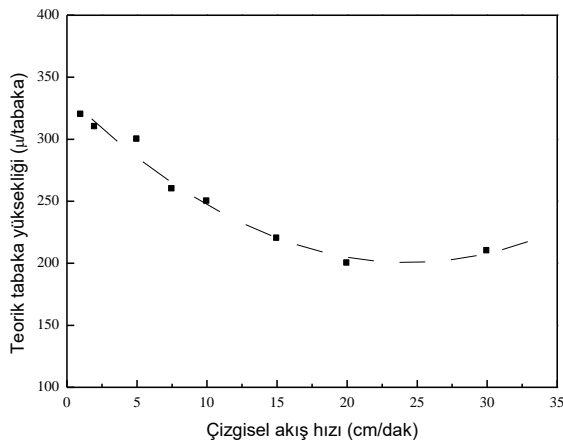
kolondan alınmıştır. Farklı pH, akış hızı ve gradyent sürelerinde elde edilen kromatogramlar ve bu kromatogramlara ait çözünürlük değerleri kolonun proteinleri iyi birer kromatografik performansla ayırdığını göstermiştir.

Tablo 4. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen poli(MAA)-aşılansız-poli(DHPM-co-EDM) kolonun kromatografik davranışına gradyent süresinin etkisi.

Tuz derişim 1.0 M			
Gradyent süresi (dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
20	14.5	1.4	1.4
30	14.1	1.9	1.6
40	14.0	1.9	1.9
Tuz derişim 0.5 M			
20	11.9	1.5	1.6
30	16.7	3.1	1.6
40	16.8	4.2	2.2

Mobil faz: A: 20 mM fosfat tamponu (pH 7), B: 20 mM fosfat tamponu (pH 7) +0.5, 1 M NaCl, Akış hızı (mL/dak): 0.75, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda geçiş. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.

HPLC kolonları için kromatografik performansın ve ayırma gücünün iki önemli kriteri, teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğidir. “van Deemter” diyagramı, kolon için tabaka yüksekliğinin lineer akış hızı ile değişimini gösteren, dolayısıyla kolon ayırma veriminin, kolonun çalışma koşullarındaki değişimini ifade eden diyagramdır. Tabaka yüksekliği değerinin düşük olması, kolonun ayırma veriminin yüksek olduğunu göstermektedir. Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile üretilen kolon için tabaka yüksekliğinin lineer akış hızı ile değişimi Şekil 14’de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi üretilen kolon için lineer akış hızı değeri 1-10 cm/dak aralığında değiştirildiğinde tabaka yüksekliği değeri 200-300 µm aralığında değişmektedir. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu ile sentezlenen ve poli(SPM) ligand taşıyan iyon değiştiriciler ile yürütülen diğer bir çalışmada bu değer 135-200 µm aralığında değişmektedir [7], [8], [10], [18], [22].



Şekil 14. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile elde edilen poli(MAA)-aşılansız-poli(DHPM-co-EDM) partiküller içeren kolon için tabaka yüksekliğinin lineer akış hızı ile değişimi. Analit: Sitokrom C (0.25 mg/mL), Kolon boyutları:100x4.6 mm i.d., UV dedektör, 280 nm. Mobil faz: 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7) + 0.5 M NaCl.

Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile üretilmiş partikülleri içeren kolon için tayin edilen protein geri kazanım oranları ve kromatografik koşullar Tablo 5’de

verilmektedir. Protein geri kazanım oranı, iyon değişim kromatografisinde kullanılan bir kolon için tekrarlı kullanım açısından önem taşımaktadır. Bu oranın düşük olması halinde, kolona verilen analit kolon materyali tarafından adsorbe edilmekte, kolonun koşullandırma yoluyla rejenerasyonu zorlaşmakta bu durum ise kolonun geri-basınç değerinin artan kullanım ile artış göstererek kolonun tıkanmasına neden olmaktadır. Ticari kolonların protein geri kazanım oranları genellikle % 90 değerinin üzerindedir. Tablo 5’den görüldüğü gibi poli(MAA) ligand içeren kolonda bütün proteinler için kantitatif’e yakın geri kazanım oranları elde edilmiştir [7], [8], [10], [18], [22].

Tablo 5. Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu ile üretilen poli(MAA)-aşılansız-poli(DHPM-co-EDM) partiküllerine ait protein geri kazanım değerleri.

Protein	Protein Geri Kazanımı (%)
Miyogloblin	100
Ribonükleaz A	96
Sitokrom C	90
Lizozim	95

pH 7, 20 mM fosfat tamponu + 0.5 M NaCl, Protein konsantrasyonu: 1 mg/mL, Akış hızı: 0.75 mL/dak.

Kromatografik çalışmaların son bölümünde, Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile üretilen kolon için analitlerin analizden analize ve günden güne tekrarlanabilirlik testleri yapılmıştır. Bunun için içerisindeki her bir protein derişimi 1 mg/mL olan örnek günde 10 kez bir hafta boyunca kolona enjekte edilmiş ve analitlerin alıkonma süreleri kaydedilmiştir. Gradyent koşullarında yapılan analizler sonucunda elde edilen “günden güne” ve “analizde analize” bağıl standart sapma değerleri (BSS) Tablo 6’de verilmiştir. Gün içerisindeki sapmaları gösteren “analizde analize” BSS değerleri hafta boyunca elde edilen değerlerin ortalaması olarak Tablo 6’de verilmiştir. “günden güne” BSS değerleri ise hafta boyunca kaydedilen ortalama alıkonma sürelerinin sapma değeridir. Tablo 6’den net bir şekilde görüldüğü üzere hiçbir analit için ne “analizden analize” ne de “günden güne” BSS değerleri %1 değerinin üzerine çıkmamıştır. Bu sonuçlar sentezlenen kolon dolgu materyalinin başarılı bir şekilde iyon değişim kromatografisinde kullanılabileceğini göstermiştir [7], [8], [10], [18], [22].

Tablo 6. Serbest Radikal Aşılama polimerizasyonu ile elde edilen poli(MAA) bağıl iyon değiştiricilere ait bağıl standart sapma (BSS) değerleri.

Analit	Tekrarlanabilirlik “Analizden analize BSS” (%)	Tekrarlanabilirlik “Günden güne BSS” (%)
Miyogloblin	0.25	0.82
Ribonükleaz A	0.20	0.73
Sitokrom C	0.52	0.67
Lizozim	0.23	0.56

Mobil faz: A: FosfatT tamponu (pH7), B: (A) + 0.5 M NaCl, Akış hızı (mL/dak): 0.75, Gradyent koşullar: 100 % A'dan, 100 % B'ye lineer formda 30 dakikada geçiş. Kolon boyutları: 100x4.6 mm i.d., UV-dedektör 280 nm. Pik sırası: (1) Miyogloblin, (2) Ribonükleaz A, (3) Sitokrom C, (4) Lizozim.

#### IV. TARTIŞMA

- Reaktif epoksi grubuna sahip poli(glisidilmetakrilat-etilenglikoldimetakrilat) poly(GMA-EDM) partiküller Çok Basamaklı Mikro-Süspansiyon Polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Poli(GMA-co-EDM) partiküller asit ile hidroliz edilerek yapısında yer alan epoksi gruplarının diol gruplarına dönüşmesi sağlanmış ve böylece polar yapıda poli(dihidroksipropil metakrilat-

etilenlikol dimetakrilat) poli(DHPMA-EDM) partiküller elde edilmiştir.

- Sentezlenen monodispers ve gözenekli polar poli(DHPM-co-EDM) partikülleri üzerinde poli(metakrilik asit) poli(MAA) karboksil (-COOH)<sub>n</sub> yapıda polimerik ligandlar Serbest Radikal Aşılama Polimerizasyonu (SRAP) yöntemi ile oluşturulmuştur.
- Tasarlanan iyon değiştirici kromatografik dolgu materyalleri, poli(MAA) aşılınmış-poli(DHPM-co-EDM) zayıf katyon değiştirici olarak üretilmiştir.
- İyon değişim kromatografisi çalışmalarında sentezlenen karboksil grubu taşıyan poli(MAA) ligandı aşılınmış-poli(DHPM) partiküller için optimum pH 7.0, gradient süresi 20 dak ve akış hızı 0.75 mL/dk olarak belirlenmiştir.
- SRAP ile elde edilen IEC kolon için teorik tabaka yüksekliğinin lineer akış hızı ile değişimini gösteren van Deemter diyagramı çizildiğinde zayıf katyon değiştirici kolon için literatürdeki değerlerden düşük ve kararlı değerler elde edilmiştir (200-320 µm).
- SRAP yöntemi ile üretilen iyon değiştiricilerin protein geri kazanım değerlerinin tamamı bütün proteinler için kantitatifte yakındır (%90-100).
- Üretilen IEC kolon için analitlerin, analizden analize ve günden güne tekrarlanabilirlik testleri yapılmış, hem “analizden analize “ hem de “günden güne” BSS değerleri %1’in altında bulunmuştur.

#### V. YORUM

Çalışma kapsamında sentezlenen kolon, gradyent koşullarda protein ayrımı için ticari olarak kullanılan kolonlara benzer bir kromatografik performans sergilemekle birlikte pH dayanımı ve sahip oldukları yüksek protein geri kazanımı ve düşük geri basınç, teorik tabaka yüksekliği ve tekrarlanabilirlik açısından ticari kolonlara üstünlük sağlamaktadırlar. Bu sonuçlar sentezlenen IEC kolon dolgu materyallerinin başarılı bir şekilde iyon değişim kromatografisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

#### KAYNAKLAR

- [1]. T. Ellingsten, O. Aune, J. Ugelstad, S. Hagen, “Monosized Stationary Phases For Chromatography”, *Journal of Chromatography*, vol. 535, pp. 147-161. 1990.
- [2]. Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Frechet, “Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodispers Macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 32, pp. 2577-2588. 1994.
- [3]. M. Galia, F. Svec, J.M.J. Frechet, “Monodisperse Polymer Beads As Packing Material For High Performance Chromatography: Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in the Presence of Linear Polystyrene as a Porogen”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 32, pp. 2169-2175. 1994.
- [4]. F. Svec, J.M.J. Frechet, “New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation to Biocatalysis”, *Science*, vol. 273, pp. 205-211. 1996.
- [5]. K. Hossoya, M. Teramachi, N. Tanaka, A. Kobayashi, T. Kanda, Y. Ohtsu, “Preparation Strategy for Uniformly Sized, Polymer-Beads HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency. 1. Copolymerization Technique”, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 5852-5857. 2001
- [6]. B. Saraçoğlu Kaya, A. Tuncel, “Chromatographic Performance of Weak Cation Exchanger Synthesized by a Simple Method”, 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, ISMSIT, 2017, Paper ID: 343, p. 318.
- [7]. B. Saraçoğlu Kaya, A. Tuncel, “Chromatographic Performance of Weak Cation Exchanger Carrying Molecular Brushes Synthesized by Atom Transfer Radical Polymerization”, 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, ISMSIT, 2017, Paper ID: 341, p. 310.
- [8]. B. Saraçoğlu Kaya, A. Tuncel, “Chromatographic Performance of Weak Cation Exchanger Carrying Molecular Brushes Synthesized by Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization”, 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, ISMSIT, 2017, Paper ID: 342, p. 314.
- [9]. B. Saraçoğlu Kaya, E. Sağ, “Design of Reversed Phase Chromatography (RPC) Column Packing Material for Protein Separation: Part 1-Synthesis and Characterization”, *Cumhuriyet Science Journal* vol. 38 (4), pp. 788-797. 2017.
- [10]. B. Saraçoğlu Kaya, E. Sağ, “Design of Reversed-Phase Chromatography Column Packing Material for Protein Separation: Part 2- Chromatographic Performance”, *Cumhuriyet Science Journal* vol. 40 (1), pp. 213-220. 2019.
- [11]. B. Caglayan, E. Unsal, T. Çamlı, M. Tuncel, A. Tuncel, “Monodisperse porous poly(vinyl acetate-co-divinylbenzene) particles by single-stage seeded polymerization: A packing material for reversed phase HPLC”, *Journal of Separation Science*, vol. 29, pp. 936-934. 2006.
- [12]. V. Smigol, F. Svec, J.M.J. Frechet, “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*, vol. 66 (23), pp. 4308-4315. 1994.
- [13]. V. Smigol, F. Svec, J.M.J. Frechet, “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*, vol. 66, pp. 2129-2138. 1994.
- [14]. K. Lewandowski, F. Svec, J.M.J. Frechet, “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.*, vol. 20, pp. 227-243. 1997.
- [15]. K. Lewandowski, F. Svec, J.M.J. Frechet, “Polar, Monodisperse, Reactive Beads from Functionalized Metacrylate Monomers by staged Templated Suspension Polymerization”, *Chem. Mater.*, vol. 10, pp. 385-391. 1998.
- [16]. S.T. Camlı, S. Şenel, A. Tuncel, “Cibacron Blue F3G-A Attached Uniform and Macroporous Poly(styrene-divinylbenzene) Particles For Specific Albumin Adsorption”, *J. Biomater. Sci. Polym.*, vol. 10, pp. 875-889. 1999.
- [17]. E. Unsal, S.T. Camlı, M. Tuncel, S. Senel, A. Tuncel, “Monodisperse-porous Particles With Different Polarities By Modified Seeded Polymerization and Their Use As Chromatographic Packing In HPLC”, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 61, pp. 353-368. 2004.
- [18]. E. Unsal, B. Elmas, B. Çağlayan, M. Tuncel, S. Patır, A. Tuncel, “Preparation of An Ion Exchange Chromatographic Support By A New Grafting From Strategy Based on Atom Transfer Radical Polymerization”, *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 1-8. 2006.
- [19]. E. Unsal, T. Irmak, E. Durusoy, M. Tuncel, A. Tuncel, “Monodisperse porous particles with polyionic ligands for ion exchange separation of proteins”, *Analytical Chimica Acta*, vol. 570, pp. 240-248. 2006.
- [20]. E. Ünsal, “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Farklı Polaritelere Sahip, Fonksiyonel Gruplu Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve Kromatografik Karakterizasyonu”, *Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2006.*
- [21]. M. Petro, F. Svec, J.M.J. Frechet, “Monodisperse Hydrolyzed Poly(glycidylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Beads as a Stationary Phase for Normal-Phase HPLC”, *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 3131-3139. 1997.
- [22]. E. Unsal, E. Uguzdogan, S. Patır, A. Tuncel, “Ion-exchanger synthesis using reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization”, *Journal of Separation Science*, vol. 32, pp. 1791-1800. 2009.