

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE PVI KAPLI KAPİLERDE  
İNORGANİK ANYONLARIN HASSAS ANALİZİ: KEMOMETRİK  
DENEYSEL TASARIM İLE METOD OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sirun ÖZÇELİK**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**MAYIS 2013**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE PVI KAPLI KAPİLERDE  
İNORGANİK ANYONLARIN HASSAS ANALİZİ: KEMOMETRİK  
DENEYSEL TASARIM İLE METOD OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sirun ÖZÇELİK  
(509111032)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN**

**MAYIS 2013**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509111032 numaralı Yüksek Lisans / Doktora Öğrencisi **Sirun ÖZÇELİK**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE PVI KAPLI KAPİLERDE İNORGANİK ANYONLARIN HASSAS ANALİZİ: KEMOMETRİK DENEYSEL TASARIM İLE METOD OPTİMİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Nevin Öztekin**      .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER**      .....

İstanbul Teknik Üniversitesi

**Prof. Dr. Ayşen YARAT**      .....

Marmara Üniversitesi

**Teslim Tarihi : 17 Mayıs 2013**

**Savunma Tarihi : 31 Mayıs 2013**



*Aileme,*



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince benden yardımını ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda akademik bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman desteğiyle yanımda olan dostlarıma, yürüdüğüm yolda güvenle adımlar atmamı sağlayan, beni bugünlere getiren aileme, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mayıs 2013

Sirun Özçelik  
(Kimyager)



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xix
1. GİRİŞ .....	1
2. KAPILER ELEKTROFOREZ.....	5
2.1 Kapiler Ayırma Prensipleri.....	5
2.2 Elektroosmotik Akış.....	6
2.2.1 Analitlerin geçişi ve göç hızları .....	8
2.2.2 Elektroosmotik akışı hızını etkileyen faktörler .....	11
2.2.2.1 Elektrik alanı .....	12
2.2.2.2 pH.....	12
2.2.2.3 İyonik şiddet.....	12
2.2.2.4 Sıcaklık.....	12
2.2.2.5 Organik modifiye edici madde ilavesi .....	12
2.2.2.6 Yüzey aktif madde ilavesi .....	13
2.2.2.7 Kapiler kolonlarının polimerik maddelerle kaplanması.....	13
2.3 Ayırma Etkinliği .....	13
2.4 Ayrımcılığı Etkileyen Faktörler .....	14
2.4.1 Difüzyon.....	14
2.4.2 Joule ısısı.....	14
2.4.3 Enjeksiyon boyu .....	15
2.4.4 Rezolüsyon .....	15
2.4.5 Duvar adsorpsiyonu. ....	15
2.4.6 Elektrodispersiyon .....	15
2.5 Kapiler Elektroforez Cihaz Bileşenleri .....	16
2.5.1 Kapiler kolon.....	17
2.5.2 Enjeksiyon yöntemleri .....	17
2.5.2.1 Hidrodinamik enjeksiyon.....	17
2.5.2.2 Elektrokinetik enjeksiyon .....	18
2.5.2.3 Örnek sıkıştırma.....	19
2.5.3 Elektrotlar.....	19
2.5.4 Voltaj kaynağı .....	19
2.5.5 Dedektör.....	20
2.5.5.1 UV dedektör.....	21
2.6 Kapiler Elektroforez Çeşitleri .....	21
2.6.1 Kapiler zon elektroforez (CZE) .....	21
2.6.2 Kapiler jel elektroforez (CGE).....	21

2.6.3 Kapiler izotakofrez (CITP).....	21
2.6.4 Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF).....	22
2.6.5 Kapiler elektrokromatografi (CEC).....	22
2.6.6 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC).....	22
<b>3. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON .....</b>	<b>23</b>
3.1 Yanıt Yüzey Metodu .....	24
3.1.1 Tarama tasarımları.....	24
3.1.2 Merkezi kompozit tasarım.....	27
3.2 Model Oluşturma.....	288
<b>4. DENEYSEL KISIM .....</b>	<b>31</b>
4.1 Cihazlar.....	31
4.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	31
4.3 PVI Sentezi.....	31
4.4 Kaplama Koşulları.....	32
4.5 EOA Mobilitesinin Ölçümü ve Hesaplanması .....	32
<b>5. SONUÇLAR .....</b>	<b>35</b>
5.1 PVI Konsantrasyonunun Optimizasyonu ve Kaplama İşlemi .....	35
5.2 EOA'a Tampon pH'nın Etkisi.....	36
5.3 EOA'a Çeşitli Tuzların Etkisi .....	37
5.4 PVI Kaplamanın Kararlılığı ve Tekrarlanabilirliği .....	37
5.5 Deneysel Tasarım Kullanılarak Anyonların Örnek Sıkıştırma Yöntemi ile Optimizasyonu.....	38
5.5.1 Fraksiyonel faktöriyel tasarım il etkili faktörlerin bulunması.....	38
5.5.2 Yanıt yüzey medtodu ile optimizasyon.....	39
5.6 Metod Validasyonu .....	43
5.6.1 Tekrarlanabilirlik değeri.....	43
5.6.2 Dedeksiyon limiti (LOD) .....	43
5.6.3 Kalibrasyon .....	44
<b>6. TARTIŞMA VE YORUM .....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>

## KISALTMALAR

<b>LOD</b>	: Tayin Sınırı ( Limit of Detection)
<b>GC-MS</b>	: Gaz kromatografi-Kütle Spektrometresi
<b>HPLC</b>	: Yüksek Bacınçlı Sıvı Kromatografisi ( High Performance Liquid Chromatography)
<b>UV-GB</b>	: Ultraviyole-Görünür Bölge
<b>CE</b>	: Kapiler Elektroforez
<b>EOA</b>	: Elektroosmotik Akış
<b>CZE</b>	: Kapiler Zon Elektroforez
<b>CGE</b>	: Kapiler Jel Elektroforez
<b>CITP</b>	: Kapiler İzotakoforez
<b>CIEF</b>	: Kapiler İzoelektrik Odaklama
<b>CEC</b>	: Kapiler Elektrokromatografi
<b>ECD</b>	: Elektrokimyasal Dedektör
<b>LIF</b>	: Lazer İndüklenmiş Florosans Dedektör
<b>CCD</b>	: Merkez Kompozit Dizaynı
<b>FFD</b>	: Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım
<b>BBD</b>	: Box-Behmken Dizayn
<b>PBD</b>	: Plackett-Burman Tasarımı
<b>PVI</b>	: Polivinil imidazol
<b>AIBN</b>	: Azobisisobütironitril
<b>NMP</b>	: N-metilprolidinon
<b>YYM</b>	: Yanıt Yüzey Metodu



## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : EOA kontrol seçenekleri .....	11
Çizelge 2.2 : CE’de kullanılan detektör türleri .....	20
Çizelge 3.1 : Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri .....	25
Çizelge 3.2 : Fraksiyonel faktöriyel tasarım tablosu .....	26
Çizelge 3.3 : Faktörlerin gerçek değerleri .....	26
Çizelge 3.4 : Optimizasyon deneyleri için tasarlanan deney ve faktörlerin değerleri ( $\alpha=1.414, -\alpha=-1.414$ ).....	28
Çizelge 5.1 : Farklı çözücülerle kaplamanın kararlılığı.....	37
Çizelge 5.2 : Kaplı kapilerin tekrarlanabilirliği .....	38
Çizelge 5.3 : Model için katsayılar ve faktörler için p değerleri .....	38
Çizelge 5.4 : MKT da kullanılan faktörlerin seviyeleri ve gerçek değerleri .....	39
Çizelge 5.5 : Faktörlerin seviyeleri ve yanıtlar .....	39
Çizelge 5.6 : Pik yüksekliği için tahmin edilen regresyon katsayıları (Nitrat için)...	40
Çizelge 5.7: Kalibrasyon değerleri .....	44



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Elektroosmotik akış oluşumu .....	7
Şekil 2.2 : a) Elektroosmotik akış dedektör cevabı b) Parabolik akış dedektör cevabı. ....	8
Şekil 2.3 : Elektroosmotik akış varlığında analitlerin geçişi .....	10
Şekil 2.4 : Analitlerin geliş sıraları. ....	10
Şekil 2.5 : Elektrodispersiyon sonucu piklerde gözlenen değişimler. ....	16
Şekil 2.6 : Kapiler Elektroforez cihazı şematik gösterimi. ....	16
Şekil 4.1 : NVI polimerizasyonu .....	32
Şekil 5.1 : Elektroosmotik akışa PVI konsantrasyonu etkisi .....	35
Şekil 5.2 : Elektroosmotik akışa tampon pH'nın etkisi .....	36
Şekil 5.3 : Elektroosmotik akışa tuz etkisi .....	37
Şekil 5.4 : Yüzey grafiği .....	41
Şekil 5.5 : Kontur grafiği .....	41
Şekil 5.6 : Normal enjeksiyon .....	42
Şekil 5.7 : Optimum koşullar .....	43



# KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE PVI KAPLI KAPİLERDE İNORGANİK ANYONLARIN HASSAS ANALİZİ: KEMOMETRİK DENEYSEL TASARIM İLE METOD OPTİMİZASYONU

## ÖZET

Kapiler elektroforez (CE) hızı, yüksek çözünürlüğü, yüksek verimliliği, otomasyon, düşük elektrolit ve örnek tüketimi gibi özellikleri ile büyük biyolojik moleküllerden küçük inorganik iyonlara kadar birçok bileşiği ayırabilen güçlü bir analitik tekniktir. Elektroosmotik akış (EOA) elektroforetik ayrımlarda büyük önem taşımaktadır. EOA'nın kontrolü ayrımların optimizasyonunda oldukça önemlidir.

Küçük inorganik anyonlar EOA'tan daha hızlı ve ters yönlü elektroforetik mobilitelere sahiptirler ve bu durum aşırı göç sürelerine neden olur. Sonuç olarak bu anyonlar normal moda (dedektör katot ucunda iken) dedekte edilemez. Anyon analizleri için daha iyi bir seçenek olarak elektroosmotik akış genellikle bastırılır veya ters çevrilir. Bu durumda daha hızlı bir ayırım sağlarken bütün anyonların dedeksiyonu da gerçekleşir.

Bu çalışmanın ilk bölümünde, bir kapiler kaplama işlemi tanımlanmıştır. Kaplama malzemesi olarak polivinil imidazol (PVI) kullanılmıştır. PVI ile kaplanmış kapilerde EOA büyüklüğü ve stabilitesi, farklı tampon çözeltileri, tampon konsantrasyonları ve pH'larda, iyonik şiddet ve organik çözücü eklemeleri gibi şartlar altında incelenmiştir. Geliştirilen kaplama işlemi daha sonra inorganik anyonların analizinde uygulanmıştır.

Düşük duyarlılık ve dedeksiyon limitleri eser miktardaki analitlerin CE'deki analizlerinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu sebeple, duyarlılık arttırmak için örnek sıkıştırma yöntemleri geliştirilmiştir. Örnek sıkıştırma yöntemleri CE'de düşük dedeksiyon limitlerinin aşılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise çeşitli inorganik anyonların ayırımı ve tayini için örnek sıkıştırma metodu geliştirilmiştir. Duyarlılık numunelerin elektrokinetik enjeksiyonu ile geliştirilmiştir. Çalışmada, CE koşullarının optimizasyonu için kemometrik deneysel tasarım (fraksiyonel faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit dizaynı) kullanılmıştır. Fraksiyonel faktöriyel tasarım (FFD) deneysel faktörleri taramak ve önemli olan faktörleri belirlemek için kullanılmıştır. Ardından merkezi kompozit tasarım (CCD) önemli faktörler arasındaki ilişkiyi hesaplamak ve optimum örnek sıkıştırma koşullarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Örnek sıkıştırma yönteminin optimizasyonu için yanıt fonksiyonu olarak pik yükseklikleri kullanılmıştır. Optimum koşullar 20 mM Tris tamponu pH 7,5, 89 mM NaCl ve enjeksiyon süresi 2 dakika olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon eğrileri çalışma aralığı (50-300 ng / mL) içinde doğrusaldır. Dedeksiyon limitleri (LOD) 5,42 ng/mL'ye kadar belirlenmiştir.



# **HIGH SENSITIVITY ANALYSIS OF INORGANIC ANIONS IN PVI COATED CAPILLARY BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH SAMPLE STACKING: METHOD OPTIMIZATION USING CHEMOMETRIC EXPERIMENTAL DESIGN**

## **SUMMARY**

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful analytical technique capable of separating compounds ranging from large biological molecules to small inorganic ions due to its beneficial features including fast, high resolution, high efficiency, automation, low electrolyte and sample consumption.

Capillary electrophoresis allows simultaneous separation of cations and anions by utilizing a large EOF in a narrow diameter (50-75  $\mu\text{m}$  id) capillary. In capillary electrophoresis, fused-silica is most commonly used capillary material due to its good thermal conductivity, ultraviolet (UV) transparency and uniform inner diameter. The chemical properties of the capillary surface play an important role in the separation process. The electroosmotic flow (EOF) alter with charge of capillary wall. Above pH 2 the silanol groups dissociates; this results in a negative charge of the capillary wall. The higher the pH, the stronger the EOF. EOF also plays a important role in electrophoretic separations. Control of the EOF is of major importance for the optimization of separations.

Small inorganic anions having high mobilities migrate faster than the EOF and in the opposite direction, resulting in excessive migration times. As a consequence they would not be detected in the normal mode (detector at cathode). A better alternative for anion analyses by CE is to suppress or even reverse the direction of the electroosmotic flow. This allows for more rapid separations and ensures that all anions are detected.

To avoid these problems most approaches for controlling EOF focus on altering the charge at the capillary surface. The charge of wall can be changed by modification of capillary by coating. Modification of capillary is performed by modification of the capillary wall by noncovalent and covalent bonding. Modification by noncovalent bonding, such as physical adsorption, has shown some advantages including good reproducible ability, homogeneous chemical derivatization reactions on the capillary inner wall, as well as simplicity and speed of the coating process. Therefore, investigation of good coating reagents and different coating procedures are of great importance for applications in CE.

The first part of this study, we described a capillary coating process. Poly vinyl imidazole (PVI) as coating material was be used. The magnitude and stability of EOF in capillaries coated with PVI were investigated under different buffers, buffer

concentration and pH, ionic strength and organic solvent additives. The developed coating process was then applied to analysis of inorganic anions.

Due to the tertiary amine groups, PVI is a weak cationic polyelectrolyte and its positive charge density depends on pH and also on the concentration and the electrolyte type. The average pK for the protonation of the amino group is 5. The chemical structure of PVI is shown in Fig. 1.

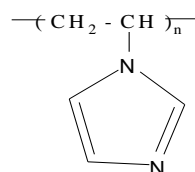


Fig. 1 The chemical structure of PVI

A very simple coating procedure was used by flushing with PVI solution for more than 5 min and the PVI solution left in the capillary for 10 min. Finally, the capillary was rinsed with water for 5 min, then with running buffer for 5 min.

Conventional EOF mobility is mainly measured using a neutral marker: A small amount of the marker is injected into the capillary and its migration time on voltage application is measured. The magnitude of the EOF mobility is calculated according to equation (1).

$$\mu_{eo} = \pm \frac{L_d L_t}{V \cdot t} \quad (1)$$

where  $\mu_{EOF}$  is the EOF mobility,  $L_d$  is the length of the capillary to the detector,  $L_t$  is the total capillary length,  $t$  is the migration time, and  $V$  is the applied voltage.

However, in the case of low mobilities this method is unsuitable (enormously high run times, background electrolyte depletion, overheating, peak dispersion, etc.). A more useful method for determination of low EOF mobility has been introduced by Williams and Vigh [1]. This method based on the formation of three bands of a neutral marker in set order in the capillary, and measurement of migration times: The first zone of a marker is injected and forced by pressure for a certain time into the capillary; then the second zone is injected and pushed to an equal extent. After that a voltage is applied to move both zones by EOF. In the last step, the third zone of the marker is injected and it acts as a reference for EOF mobility calculation (Eq. 2).

$$\mu_{eo} = \frac{\left[ t_3 - 2t_2 + t_1 \right] \frac{L_d}{t_1 + \frac{t_{inj}}{2}} L_t}{V \cdot \left( t_{mig} - \frac{t_{rampup}}{2} - \frac{t_{rampdown}}{2} \right)} \quad (2)$$

where  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  are the migration times of zones 1, 2, and 3,  $t_{inj}$  is the time of zone injection,  $L_d$  is the length to the detector,  $L_t$  is the total length of the capillary,  $V$  is the applied voltage,  $t_{mig}$  is the time of voltage application; and  $t_{rampup}$  and  $t_{rampdown}$  are the times required for a linear change of voltage from 0 to  $V$ .

Coating solution was obtained by dissolving 0.5 % in 0.1 M NaCl. It is expected that the magnitude of EOF is dependent on the concentration of PVI in a coating solution. The EOF decreased significantly with an increase in the concentration of PVI. The mobility of the EOF was almost constant at a concentration exceeding 0.02%. The EOF mobility was suppressed to ~10-fold smaller than that in the bare capillary. The result showed that PVI suppresses the EOF effectively by dynamic coating.

The effect of pH on the EOF was investigated at different pH values in different background electrolytes (acetate, citrate, phosphate and tris). No significant increase in the EOF was observed in the pH range of 3.0–9.0.

Influence of different electrolytes (NaCl, NaNO<sub>3</sub>, NaClO<sub>4</sub> and NaSO<sub>4</sub>) in running buffer was investigated. Any change of EOF with the increase of running buffer concentration was not observed.

The PVI-coated capillary showed a long term stability up the 40 runs. Coating had good tolerance to 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH and some organic solvents. The run-to-run and day-to-day RSDs were between 0.5- 1.02%. The PVI-coated capillary

The second part of this work, an on-line stacking CE method for detection of inorganic anions was developed. The PVI-coated capillary was successfully applied to analysis inorganic anions.

The poor sensitivity and detection limits in terms of concentration are among the most serious drawbacks of CE methods for the analysis of trace analytes. In last decade, significant advances have been accomplished for solving this weakness. Thereby, stacking methods have been developed to fulfill the sensitivity requirements. Stacking methods are very important in overcoming the poor detection limits in capillary electrophoresis (CE). In this study, the separation and determination of several inorganic anions by a stacking method was described. The possibility of sensitivity enhancement by using electrokinetic injection of the sample was also evaluated.

Chemometric experimental design (fractional factorial design and central composite design) was used for optimisation of stacking conditions. Experimental design methods were utilized to make the developing process more efficient and cost-effective due to the many factors involved in the optimization of this analytical method. Fractional factorial design (FFD) was used to screen the experimental factors and for identifying the most significant factors. Then the central composite design (CCD) is used to estimate the relationship between all factors and find the optimal stacking conditions.

The response function used the peak heights for the optimization of the stacking conditions. The optimum conditions were achieved using 89 mM NaCl at 20 mM TRIS buffer pH 7.5, and injection time of 2 min. Under these conditions the analysis time of inorganic anions is 6.5 min.

The repeatability for the inorganic anions with PVI-coated capillary was investigated under the optimal conditions. The RSD values (n=7) for migration times of inorganic anions was below 1 %.

The calibration curves were linear between 70–300 ng/mL of inorganic anions. Correlation coefficients were all 0,980 or better. The limits of detection (LODs) were 7.81 nM for  $\text{NO}_2^-$  and 5.42 nM  $\text{NO}_3^-$ .

## 1.GİRİŞ

Elektroforez, bir elektrik alandaki iyonların mobilitesine dayanan bir ayırma tekniğidir. Bir komponentin hızı (mobilitesi), büyüklüğüne ve yüküne bağlıdır.

Kapiler elektroforez (CE), yüklü taneciklerin (iyonlar, koloidal tanecikler gibi) elektrik alanda farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılmasına yarayan bir metottur. İlk kapiler elektroforez cihazı Tiselius tarafından geliştirilmiş ve bu çalışmanın karşılığı olarak da kendisine Nobel ödülü verilmiştir [2].

Elektroforez birçok zor analitik ayırma problemlerine uygulanmaktadır; inorganik anyon ve katyonlar, amino asitler, kateşolaminler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, polinükleotidler ve çeşitli başka türler [3].

Kapiler elektroforez diğer ayırma yöntemlerine göre birçok üstünlüğü bulunan bir tekniktir. Kapiler elektroforez, yüksek ayırma etkinliği, yüksek ayrımcılığı, kısa ayırma süresi, otomasyon kolaylığı ve düşük çözücü ve örnek gereksinimi ile, küçük iyonlardan büyük biyolojik moleküllere kadar ayırım yeteneği olan güçlü analitik bir yöntemdir [4].

Elektroosmatik akış (EOA) özellikle kapiler elektroforez (CE) ve elektroforetik ayırmalarda önemli bir rol oynar. Kapiler zon elektroforez (CZE) dar bir kapilerde büyük EOA kullanarak katyon ve anyon aynı anda ayrılmasını sağlar.

Küçük inorganik anyonların elektroforetik mobiliteleri, elektroosmotik akış ile ters yönlüdür. Bu durum anyon analizlerinde aşırı uzun sürelerle neden olur ve bu anyonlar dedeksiyonun katodik uçta olduğu durumlarda dedekte edilemezler. Kapiler elektroforez ile küçük anyonların analizi için daha iyi bir seçenek, kapiler duvarını modifiye ederek, elektroosmotik akışı bastırmak veya ters çevirmektir. Bu durum daha hızlı bir ayırmaya olanak sağlar ve böylece tüm küçük anyonlar dedekte edilebilir.

Anyonik türlerin analizinde elektroosmatik akışın yönünün ve hızının kontrolü gereklidir. Normal bir silika kapiler kullanıldığı zaman anyonların elektroforetik göç yönü EOA'nın tersinededir. İnorganik anyonlar gibi büyük elektroforetik mobiliteye sahip analitlerin elektroforetik mobilitesi EOF dan daha büyük veya hemen hemen alkali çözeltidekine eşdeğerdir. Ters elektrik alan kullanılsa bile ayrılmaları uzun sürer. Bu nedenle, EOF hızı anyonik türlerin analizi için genellikle bastırılır veya tersine çevrilir. Bunun için asidik tampon veya kapiler duvarının dinamik veya kovalent bağlanma ile kalıcı olarak kaplanması gibi çeşitli yöntemler kullanılır. Katyonik yüzey aktif maddeler, katyonik veya nötral polimerler, kaplama malzemesi olarak, EOF bastırmak veya tersine çevirmek için kullanılırlar [5-7].

Fiziksel olarak adsorbe olan kaplama malzemelerinden en çok kullanılan nötral polimerler; polivinilprolidon [8] polivinil alkol [9] polietilen oksit [10] katyonik polimerler ise; polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC) [11] chitosan [12] polyethyleneimine (PEI) [13] polibren [14] polyarginine (PA), [15]'dir.

Bu çalışmanın birinci kısmında, kaplama malzemesi olarak PVI kullanılarak bir kapiler kaplama işlemi tanımlanmıştır. PVI ile kaplanmış kapilerde EOA büyüklüğü ve stabilitesi, farklı tamponlar, tampon konsantrasyonları ve pH'larda, iyonik şiddet ve organik çözücü eklemeleri gibi şartlar altında incelenmiştir. Geliştirilen kaplama işlemi daha sonra inorganik anyonların analizinde uygulanmıştır.

İnorganik anyonlar çokça yaygın olmakla birlikte bu maddelerin, çevre, gıda, endüstriyel ve adli örnekleri de içeren örnek matrisleri içindeki seviyelerinin ölçülmesi oldukça önemlidir. Bu iyonların CE yöntemi ile analizi üzerine literatürde bir çok çalışma bazı derleme makalelerde toplanmıştır [16].

CE metodunda, çok kullanılan spektrofotometrik dedeksiyondaki kapilerdeki kısa optik pencere ve küçük enjeksiyon hacimleri, nedeniyle konsantrasyon duyarlılığı eser miktardaki örnekler için yeterli değildir. CE' de duyarlılığı arttırmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri örnek sıkıştırma olarak adlandırılan yöntemdir. CE' de bu amaçla kullanılan ve farklı isimlerle anılan örnek sıkıştırma yöntemleri mevcuttur ve literatürde bu çalışmaları toplayan çeşitli derleme makaleler mevcuttur [17]. Farklı örnek sıkıştırma yöntemlerinin temeli, injekte edilen analit örnek bölgesi ile ayırma tamponu arasında konduktivite farkı yaratmaktır. Örnek sıkıştırma yöntemleri CE'de düşük dedeksiyon limitlerinin aşılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir.

Metot optimizasyonunda, kemometrik deneysel tasarım yöntemlerinin kullanılması, bir çok değişkenin, çalışmanın daha verimli ve düşük maliyetli olmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır [18-20].

Çalışmanın ikinci bölümünde; PVI kaplı kapilerde çeşitli inorganik anyonların ayırımı ve tayini için örnek sıkıştırma metodu kemometrik deneysel tasarım (fraksiyonel faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit dizaynı) kullanılarak optimize edilmiştir.



## 2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektroforetik ayırma oldukça farklı iki formatta gerçekleştirilir: birincisi tabaka (slab) elektroforez ve ikincisi kapiler elektroforez. Birincisi klasik olup, yıllarca karmaşık, yüksek molekül ağırlıklı biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin ayrılmasında kullanılmıştır.

Elektroforezin enstrümantal versiyonu olan kapiler elektroforez 1980'lerden bu yana gelişmekte olup, önemli bir ayırma yöntemi olarak kimyacılar ve hayat bilimcileri tarafından kullanılmaktadır [3].

HPLC ve gaz kromatografisinde ayırıcı güç, numune bileşenlerinin stasyonere karşı olan affiniteleri arasındaki fark ya da kaynama noktaları arasındaki farktır. Her iki teknikte de en önemli faktör numune bileşeninin polaritesidir. Kapiler elektroforezde ise ayırıcı güç, iyonların büyüklüğüne karşı yüklerin oranıdır. Kolon boyunca olan bir akış değil, elektrik alan ayırmayı sağlar. Elektroforezin küçük çaplı kapilerlerde yapılması, yüksek elektrik alanlarının kullanımına olanak sağlar. Çünkü küçük çaplı kapiler üretilen ısıyı etkili bir şekilde dağıtır. Elektrik alanının artması etkin bir ayırma ve ayırma süresinin kısalmasını sağlar [2].

### 2.1 Elektroforetik Ayırma Prensipleri

Bir iyonun saniyede cm olarak bir elektriksel alandaki göç hızı, alan şiddeti  $E(\text{Vcm}^{-1})$  ile elektroforetik hareketlilik,  $\mu_e (\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1})$ 'in çarpımına eşittir. Yani,

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2.1)$$

$$v = \text{İyonun hızı}$$

$$\mu_e = \text{Elektroforetik mobilite}$$

$$E = \text{Elektrik Alan}$$

Elektrik alan, uygulanan voltaj ve kapiler uzunluğunun bir fonksiyonudur (volt/cm). Mobilite, verilen iyon ve ortama göre her bir iyon için karakteristiktir [21].

Elektrik alan kuvveti aşağıdaki eşitlikle verilebilir:

$$F_E = q \cdot E \quad (2.2)$$

Sürtünme kuvveti ise;

$$F_s = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.3)$$

$\eta$  = çözeltinin viskozitesi

$r$  = iyon yarı çapı

Sabit elektrik alan uygulandığında sürtünme ve elektrik alan kuvveti eşitlik (2.4)'deki gibi dengeye ulaşır. Böylece yüklü tanecikler sabit hızla hareket ederler.

$$F_E = F_s \quad (2.4)$$

2.3'teki  $v$  yerine  $\mu_e E$  yazılıp, elektrik alan kuvveti ve sürtünme kuvveti eşitlik 2.4'teki gibi eşitlenir ve düzenlenirse aşağıdaki eşitlik ortaya çıkar:

$$\mu_e = q / 6\pi\eta r \quad (2.5)$$

Elektroforetik hareketlilik analitin iyon yükü ile doğru, ve sürtünmeli geciktirme katsayısı ile ters orantılıdır. Elektrik alan sadece iyonlar üzerinde etkilidir. Eğer iki farklı tür hem farklı iyon yüküne ve hem de tampondan geçerken farklı sürtünme kuvvetine sahipse, bu iki madde birbirinden ayrılabilir. Nötral türler ayrılmazlar. Analit iyonun sürtünmeli geciktirme kuvveti, o iyonun boyutuna, şekline ve içinde göç ettiği ortamın viskozitesine bağlıdır.

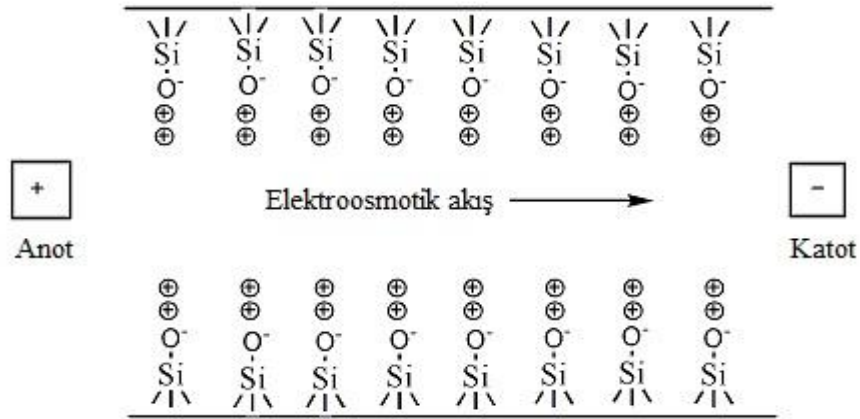
Aynı boyuttaki iyonlar için yük ne kadar büyükse, yürütücü kuvvet ve göç hızı o kadar büyük olur. Aynı yükteki iyonlar için ise, iyon küçüldükçe sürtünme kuvveti küçülür ve göç hızı artar. İyonun iyon/yük oranı bu iki etkiyi birleştirmektedir [3,21].

## 2.2 Elektroosmotik Akış

Elektroosmotik akış ilk olarak 1800'lerin sonunda Helmholtz içinde sulu bir tuz çözeltisi bulunan camdan yatay bir tübe elektrik alan uygulaması sonucu ortaya çıkmıştır. İç duvarın iyonik karakteri ve iyonların hareketi hakkında meraklanan Helmholtz, tübün iç duvarında silikanın negatif bir katman barındırdığını ve elektrik alan altında çözeltinin katoda doğru hareket etmesini sağladığını ortaya çıkarmıştır.

Bundan bir asır sonra, bu fenomen kapiler elektroforez analizlerinde temel rolü oynamaktadır [22].

Elektroosmotik akışın sebebi, silika/çözelti ara yüzeyinde meydana gelen elektrik çift tabakasıdır. pH 2'nin üzerinde silika kapillerinin iç yüzeyi, yüzeydeki silanol grubunun iyonlaşması ( $\text{SiOH} (k) \leftrightarrow \text{SiO}^-_{(k)} + \text{H}^+_{(aq)}$ ) nedeniyle negatif yüklüdür. Tamponun katyonları, yük dengesini sağlamak amacıyla elektriksel çift silika kapillerinin negatif yüzeyine bitişik olan tabakada birikir ve burada bir potansiyel farkı oluştururlar. Bu potansiyel farkı zeta potansiyeli olarak bilinir. Çift tabakanın dış bölümündeki katyonlar, katot veya negatif elektrot tarafından çekilirler katyonlar solvatize oldukları için çözücüyü de beraberinde sürüklerler [3,21]. Şekil 2.1'de elektroosmotik akışın oluşumu gösterilmektedir.



**Şekil 2.1 :** Elektroosmotik akış oluşumu

EOA negatif elektrot doğrultusundadır. pH ne kadar yüksek ise, daha çok negatif yük kapiler duvarında birikir ve daha çok pozitif yük de tampon sıvıda yer alır. Bu, daha güçlü bir EOA meydana getirir [2].

EOA hızı olan  $u$  en basit haliyle Helmholtz eşitliğindeki gibi açıklanabilir:

$$u = \varepsilon E \zeta / 4 \pi \eta \quad (2.6)$$

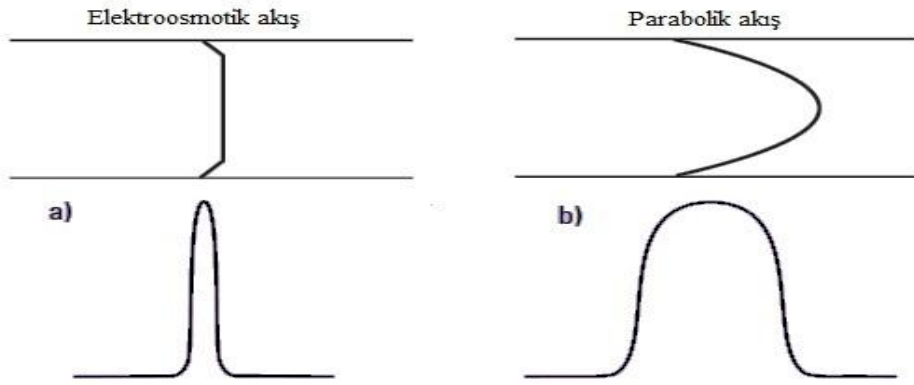
$$\mu_{\text{coa}} = \varepsilon \zeta / 4 \pi \eta \quad (2.7)$$

$\varepsilon$  = dielektrik sabiti

$\zeta$  = zeta potansiyeli

2.6 eşitliğinde de görüldüğü gibi, EOA elektrolit viskozitesi ile ters orantılı, dielektrik sabiti, uygulanan elektrik alan ve zeta-potansiyeli ile doğru orantılıdır. Kuvars kapiler için EOA, artan elektrolit konsantrasyonu, organik bileşenlerin eklenmesi ile azalırken, pH değeri ile artan yüzey silanol gruplarının iyonlaşma derecesi ile de yükselir [21,23].

Elektroosmoz, tüp içinde parabolik olmayan düz kesitli bir yığın çözelti akışına yol açar. Halbuki, sıvı kromatografide basıncın etkisi ile oluşan akış parabolik kesitlidir. Akış profilinin düz olması nedeniyle, elektroosmotik akış sıvı kromatografisinde olduğu gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez [3]. Şekil 2.2’de elektroosmotik akış ve parabolik akış ile bunların dedektör cevapları görülmektedir.



**Şekil. 2.2 :** a) Elektroosmotik akış dedektör cevabı

b) Parabolik akış dedektör cevabı

### 2.2.1 Analitlerin geçişi ve göç hızları

Elektroosmotik akış hızı elektrik alan kuvveti ile orantılıdır ve eşitlik 2.1 dekine benzer şekilde aşağıdaki gibi verilir:

$$V_0 = \mu_{eo} \cdot E \quad (2.8)$$

$V_0$  = Elektroomotik akış hızı

$\mu_{eo}$  = Elektroosmotik mobilite

$E$  = Elektriksel alan kuvveti

Elektroosmotik akış durumunda, bir iyonun hızı, onun elektroforetik hızı ve elektroosmotik akış hızının toplamıdır. Böylece;

$$\text{Pozitif iyonlar için} \quad : \quad v_i = (\mu_{eo} + \mu_i) \cdot E$$

$$\text{Negatif İyonlar için} \quad : \quad v_i = (\mu_{eo} - \mu_i) \cdot E \quad (2.9)$$

$$\text{Nötral Partiküller için} \quad : \quad v_i = \mu_{eo} \cdot E$$

olur [3].

İyonik türlerin tümüyle iyonik halde ve sonsuz seyreltilikte sahip oldukları büyüklüğe elektroforetik mobilite denir. Gerçek koşullarda, bu değer etkin elektroforetik mobilite ( $\mu_e$ ), olarak isimlendirilir.  $\mu_e$  ortam pH' ına ve tampon bileşimine bağlıdır.

Görünen mobilite, bir iyonun kapiler kolondaki geliş süresini belirler ve türlerin etkin elektroforetik mobiliteleri ile kapiler içindeki elektroosmotik mobilite hesaba katılarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır [21,24,25].

$$\mu_g = \mu_o \pm \mu_e \quad (2.10)$$

Analitlerin dedekte edilebilmeleri için geçen süre yani göç zamanı ve diğer deneysel parametreler analitin görünen mobilitelerini hesaplamak için kullanılabilir:

$$\mu_g = L \cdot l / t \cdot V \quad (2.11)$$

V= uygulanan voltaj

t = göç zamanı

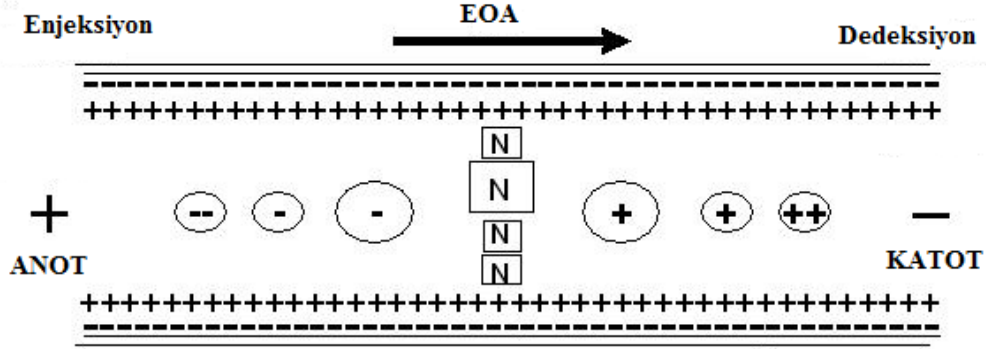
L = toplam kapiler uzunluğu

l = kapiler etkin uzunluğu (dedektöre kadar olan)

Etkin mobilite ise, EOA hızına eşit olarak hareket eden bir nötral marker ile EOA hızının hesaplanıp eşitlik 2.10'da yerine koyulmasıyla hesaplanabilir [21].

Elektroosmotik akış neredeyse tüm türlerin, yüklerine bakılmaksızın, aynı yöne doğru göç etmelerini sağlar. Normal koşullar altında ( negatif yüklü kapiler yüzeyi) akış anottan katoda doğrudur. Elektroosmotik akışın büyüklüğü, anyonlarınkinden fazla olduğu durumlarda da anyonlar katoda doğru hareket ederler. Böylece kanyonlar, nötraller ve anyonlar aynı yöne doğru gittiklerinde tek bir analizde birbirlerinden

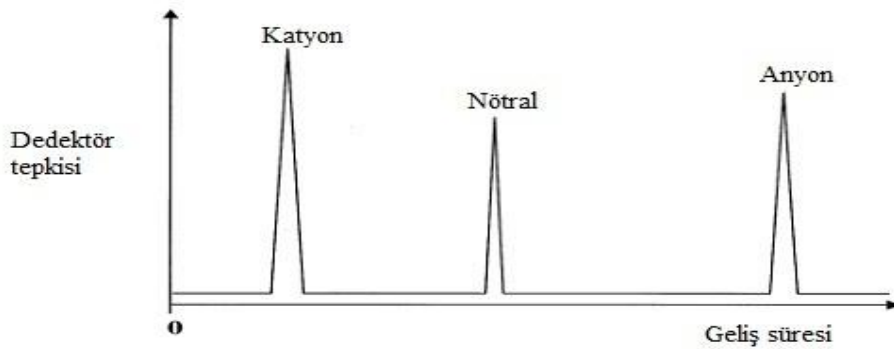
ayrılabilirler. Şekil 2.3'te elektroosmotik akış varlığında analitlerin geçişi görülmektedir.



Şekil. 2.3 : Elektroosmotik akış varlığında analitlerin geçişi

Burada katyonlar, elektroosmotik akışla aynı yönde olduklarından katyonlar katoda doğru en hızlı hareket eden türlerdir. Nötraller ise sadece EOA hızı ile hareket ederler ve birbirlerinde ayrılmazlar. Anyonların hareketi ise anoda doğru olmasına rağmen EOA hızı onların hareketinden büyük olduğu için en yavaş olarak katoda doğru hareket ederler [21].

Elektoroosmozun sonucu olarak, tipik bir elektroforetik ayırmada kolondan, ilk önce hızlı katyonlar, takiben yavaş katyonlar, sonra nötral tanecikler, daha sonra da yavaş anyonlar ve nihayet hızlı anyonlar çıkarlar[2]. Dedektör cevabı ise şekil 2.4 'teki gibi olur:



Şekil 2.4: Analitlerin geliş sıraları

## 2.2.2. Elektroosmotik akışı etkileyen faktörler

Elektroosmotik akışa sistemde yapılan birçok değişiklik etki edebilir. Çizelge 2.1’de sistemde yapılan değişiklikler ve bu değişikliklerin EOA üzerindeki etkileri belirtilmektedir.

**Çizelge 2.1:** EOA kontrol seçenekleri[25]

<i>Sistemde yapılan değişiklik</i>	<i>EOA üzerindeki etkisi</i>	<i>Diğer sonuçlar</i>
Tamponun pH değeri	pH arttırıldığında EOA da artar	Analitlerin yükünü etkileyebilir
Tampon konsantrasyonu	Tampon konsantrasyonu azaltılırsa EOA artar	Yüksek konsantrasyon yüksek akıma neden olur. Düşük konsantrasyon duvar adsorpsiyonuna neden olur.
Sıcaklık	Viskoziteyi değiştirir Viskozite arttıkça EOA azalır	Seçiciliği etkileyebilir.
Organik çözücüler	EOA ve tampon viskozitesini değiştirir	Ayrırma sisteminde kompleks değişiklikler olabilir.
Tampon ilavesi olarak yüzey aktif maddeler	Kapiler duvarına adsorbe olur, EOA’da keskin değişimler gözlenir	Anyonik yüzey aktif maddeler EOA’ı arttırır. Katyonik olanlar ise EOA’ı düşürür veya ters çevirir.
Nötral hidrofobik polimerler	Kapiler duvarına adsorbe olur Kısmen güçlü çekim	Duvar adsorpsiyonunu azaltır.
İyonik polimerler	Kapiler duvarına adsorbe olur Kısmen güçlü çekim	Pozitif yüklü polimerler ile akış yön değiştirir.
Kovalent kaplama	EOA etkilenir Duvar adsorpsiyonu önlenir	Dayanıklılık problemleri.
İşinsan elektrik alan	EOA da değişiklikler gözlenir	Sınırlı uygulama alanı.

### **2.2.2.1 Elektrik alanı**

EOA en basit şekilde, eşitlik 2.6'dan da görüleceği gibi elektrik alanın azaltılmasıyla düşürülebilir. Fakat bu etkinin, analiz süresi, çözünürlük ve verimlilik üzerinde dezavantajları olabilir [21].

### **2.2.2.2 pH**

pH 8'in üzerinde, kapsız bir kapilerin iç yüzeyindeki silanol gruplarının tamamı iyonlaştığı için EOA hızı pH' bağılı değildir. pH 4'ün altında ise silanol gruplarının bir çoğu iyonlaşmadığı için pH'ın EOA hızı üzerinde etkisi yoktur. Bu nedenle EOA hızı pH 4 ve 8 arasında değişir. Ancak pH değerinin ayarlanması, çözücü yükünü ve mobilitesini de etkileyebilir. Kullanılacak çözücünün pI'sını bilmek uygun tampon seçimi için oldukça önemlidir [21,22].

### **2.2.2.3 İyonik şiddet**

EOA, tampon çözeltisinin konsantrasyonu ve iyonik şiddetinin ayarlanması ile de değişebilir. Yüksek tampon konsantrasyonları, yüzeydeki etkili yükleri azalttığından, çözücü ile duvar arasında Coulomb etkileşimlerini engelleyebilir. Bunun yanında, kapiler içindeki Joule ısınması, yüksek konsantrasyonlu tampon kullanımını sınırlamaktadır [21].

### **2.2.2.4 Sıcaklık**

Sıcaklığın artırılması ile her 1 °C'de %2-3 oranında viskozitenin azalmasına neden olur ve bunun sonucunda EOA artırır. Sıcaklıktaki değişimler seçicilikte değişimlere neden olabilmektedir.

### **2.2.2.5 Organik modifiye edici madde ilavesi**

Organik çözücülerin de EOA hızına önemli ölçüde etki ettikleri bilinmektedir. Asetonitril, metanol, tetrahidrofuran (THF) ve isopropanol gibi ilaveler viskozite ve zeta potansiyelinde değişikliğe neden olurlar. Genellikle bu etki EOA hızını yavaşlatacak şekilde olur.

### 2.2.2.6 Yüzey aktif madde ilavesi

Kapiler yüzeyinde adsorplanan yüzey aktif maddeler EOA'da keskin değişimler meydana getirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler EOF'ı artırırken, katyonik yüzey aktif maddeler EOA'ı azaltır veya EOA'nın yönünü tamamen değiştirebilir [26].

### 2.2.2.7 Kapiler kolonlarının polimerik maddelerle kaplanması

Kapiler kolonunun içi polimerik bir madde ile (polietilenimin, polietilenglikol, poliakrilamid vb.) kaplanmasıyla, kaplanan maddenin hidrofilik ve hidrofobik olma durumuna göre elektroosmatik akış hızı yavaşlayabilir, yok olabilir veya tersine çevrilebilir.

Polimerik maddeler kapiler duvarına iki şekilde bağlanabilir. Kovalent bağlama ve dinamik bağlama. Kovalent bağlama kaplama maddesinin kapilerin yüzeyine direkt bağlanması ve sonrasında çapraz bağlama yöntemi uygulanması ile gerçekleştirilir. Kovalent olmayan bağlama türünde, kaplama, yüklü veya hidrofilik karaktere sahip bir polielektrolitin, kapiler duvarına kuvvetle adsorpsiyonu ile oluşturulur. Bu kaplama türü, kovalent kaplamadan daha hızlı ve daha kolay bir yöntemdir.

## 2.3 Ayırma Etkinliği

Kromatografide olduğu gibi, plaka yüksekliği H ve teorik plaka sayısı N, kapiler elektroforezde de kullanılır. Ayırma etkinliği sıvı kromatografi de olduğu gibi teorik plaka sayısı ile ifade edilir.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.12)$$

N = teorik plaka sayısı

l = kapilerin etkin uzunluğu

$\sigma$  = pikin standard sapması

Burada plaka sayısı, elektroferogramdan yararlanılarak pik genişliği ve göç zamanları ile de hesaplanır. CE'de asimetric pikler sık sık oluşabildiğinden, plaka sayısı eşitlik 2.13'te olduğu gibi pikin yarı yüksekliği ve göç zamanı kullanarak hesaplanmaktadır [3,26].

$$N = 5,54.(t / w_{1/2})^2 \quad (2.13)$$

t = göç süresi

$w_{1/2}$  = yarı yükseklikteki pik genişliği

## 2.4 Ayrımcılığı Etkileyen Faktörler

### 2.4.1 Difüzyon

İdeal koşullar altında (diğer etkilerin yok sayıldığı şartlarda) pik genişlemesindeki önemli tek etken boyuna difüzyon olarak belirlenebilir. Radyal difüzyon ise önemsenmemektedir. Benzer şekilde, kapileri anti-konvektif (ısı iletimi olmayan) özelliği nedeniyle konvektif genişleme de yok sayılabilir. Sonuç olarak:

$$\sigma^2 = 2.D.t = 2D l L/\mu_e V \quad (2.14)$$

D = analitin difüzyon katsayısı

Eşitlik 2.14, eşitlik 2.12'ye yerleştirilirse temel plaka sayısının elektroforetik gösterimi ortaya çıkar:

$$N = \mu_e VI/ 2DL = \mu_e EI/2D \quad (2.15)$$

Eşitlik 2.14, analizlerdeki yüksek alan uygulamaları için bir kanıttır. Çünkü, yüksek alan altında çözelti kapilerde daha az zaman geçirir ve difüze olmak için daha az süresi olur. Buna ek olarak, eşitlik protein ve DNA gibi düşük difüzyon katsayısı olan büyük moleküllerin, küçük moleküllerden daha az dağılım gösterdiğini açıklamaktadır [21].

### 2.4.2 Joule ısısı

Elektrik akımının geçişi ile üretilen ısıya Joule ısısı denir. Sıcaklık artışı üretilen güce (voltaj ve akım ürünü)bağlıdır ve tampon iletkenliği ile uygulanan voltaj ile belirlenir. Güç üretimi artması önemli ölçüde yükselen sıcaklıklara neden olur. Sıcaklık değişimi, akış profilini etkileyen bir viskozite eğimini ortaya çıkarır. Sonuç olarak, çözelti alanları yüksek viskozite alanlarında (kapiler duvarı), düşük viskozite alanlarında (kapiler merkezi)olduğundan daha yavaş göç edecektir. Kapilerin duvarı ve merkezinde bu viskozite farkı, göç farklılıklarına ve bu nedenle yüksek band genişlemesine ve çözünürlük kaybına yol açar. Termal etkilerden dolayı meydana gelen etkinlik kaybı, kapiler çapının ve elektrik alan gücünün düşürülmesiyle azalır [21,26].

### 2.4.3 Enjeksiyon boyu

Enjeksiyon sırasında örneğin en ince şekilde verilmesi önemlidir. Eğer enjeksiyon, difüzyon nedeniyle oluşan dağılmadan daha uzunsu verimlilik ve çözünürlük düşürülmüş olur [21]. Genelde kapiler boyunun  $\frac{1}{2}l-2$ sine enjeksiyon yapılmaktadır.

### 2.4.4 Rezolüsyon

Örnek bileşenlerinin rezolüsyonu, ayırma çalışmalarında nihai hedeftir [20]. İki pikin birbirinden ayrılması yani rezolüsyon şu eşitlik ile formüle edilir;

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) = (t_2 - t_1) / 4 \sigma \quad (2.16)$$

t = göç süresi

w = süre olarak pikin taban genişliği

$\sigma$  = zamana ait standart sapma

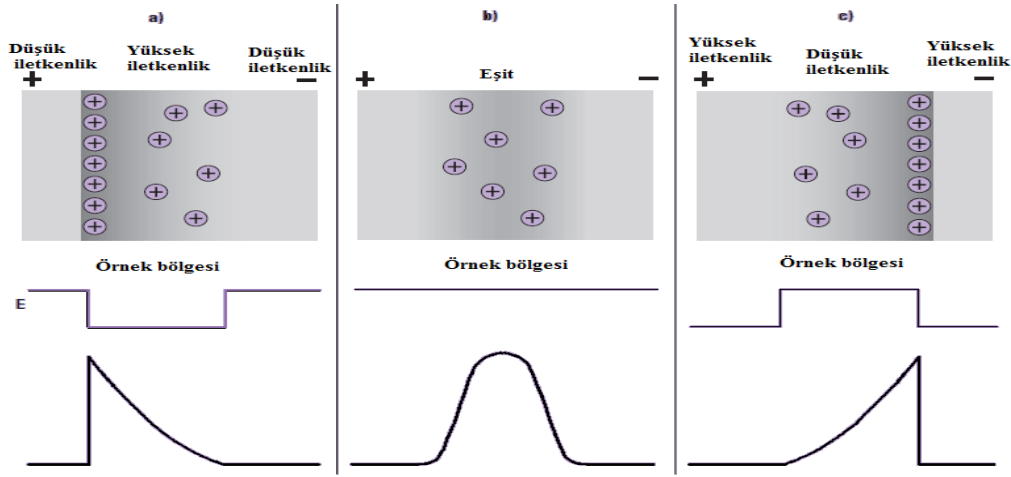
### 2.4.5 Duvar adsorpsiyonu

Çözelti moleküllerinin kapiler yüzeyi tarafından adsorpsiyonu pik bozulmalarına neden olur. Belirli durumlarda, adsorbe edilen türlerin göçünü engelleyen ters adsorpsiyon meydana gelebilir. Kapiler yüzeyinin analit moleküllerini adsorbe etme eğilimi, özellikle proteinler gibi makromoleküller için CE'de gerilim sorunlarına yol açabilir. Silika kapiler yüzeyinin negatif yüklü silanol grupları nedeniyle özellikle pozitif yüklü örnek molekülleri adsorpsiyona eğilimli olurlar [23,26].

### 2.4.6 Elektrodispersiyon

Çözelti iyonları, tampon iyonları ile aynı mobiliteye sahip olmadığında, göç eden çözelti onu çevreleyen tampon ile aynı elektriksel iletkenliğe sahip olamayabilir [23].

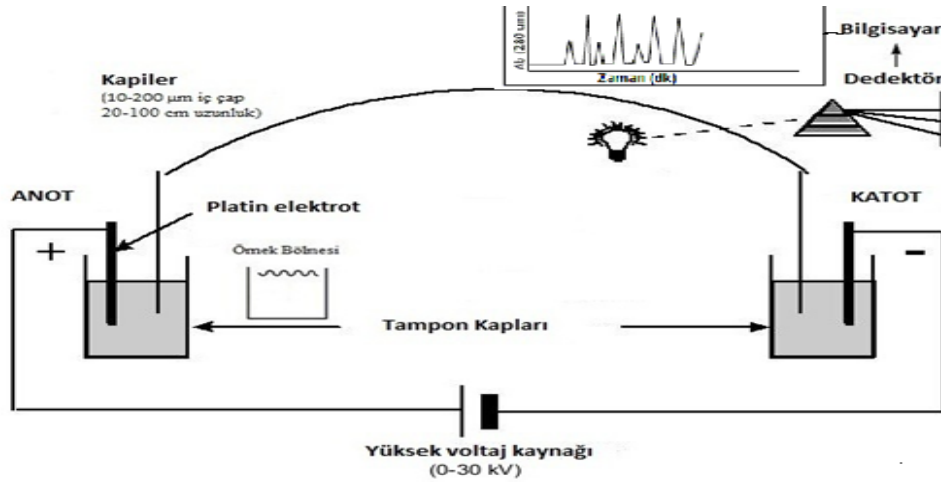
Şekil 2.5'te de görüldüğü gibi, eğer çözelti iletkenliği tamponunkinden büyükse, örneğin önde giden kısmı difüze olur ve pik önden kuyruklanır. Bunun tersine örnek çözelti iletkenliği tampon iletkenliğinden küçükse, örneğin önde giden bölgesi keskinleşir ve pik arkadan kuyuklanır. Eğer iletkenlikler eşitse pikte kuyruklanma meydana gelmez [21].



Şekil 2.5 : Elektrodispersiyon sonucu piklerde gözlenen değişimler

## 2.5 Kapiler Elektroforez Cihaz Bileşenleri

Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi Şekil 2.6'daki gibidir.



Şekil 2.6 : Kapiler elektroforez cihazı şematik gösterimi

10-1000  $\mu\text{m}$  iç çapı ve 40-100 cm uzunluğunda, tamponla doldurulmuş erimiş silika kapiler, içinde platin elektrotlar bulunan iki tampon haznesi arasında yerleştirilmiştir. Numune bir uçtan verilirken ayrılan maddeler diğer uca tayin edilir [3].

### 2.5.1. Kapiler kolon

Kapiler elektroforezde genellikle 50-100  $\mu\text{m}$  iç çaplı, erimiş  $\text{SiO}_2$ 'ten oluşan silika kapiler kullanılır. Prensipinde, cam veya plastik kapiler de kullanılabilir, fakat bunlar düşük dalga boylu UV bölgeleri için yeterince saydamlık sağlamazlar. Kullanımdan önce, silika kapilerin polimid kaplı yüzeyi, dedeksiyon noktasından mekanik olarak kaldırılmalı veya yakılarak çıkarılmalıdır. Birçok uygulamada iyileştirilmemiş ve

modifiye edilmemiş kapiler kullanılmaktadır. Kapiler ve onun kondisyonu, CE analizlerinin etkin ve verimli olabilmesi için anahtar rolünü oynamaktadır.

Yeni kapileri bir analizde kullanmadan önce, kapiler 1 mM NaOH ile ardından su ve kullanılacak tampon çözeltisi ile yıkanmalıdır [21,26]. Bu işlem silanol gruplarının iyonlaşması ve kapiler iç yüzeyinin dengeye gelmesi için yapılmaktadır.

### 2.5.2. Enjeksiyon yöntemleri

En yaygın numune verme yöntemleri, elektrokinetik enjeksiyon ve basınç enjeksiyonudur [3].

#### 2.5.2.1. Hidrodinamik enjeksiyon

Basınç enjeksiyonunda, kapilerin numunenin verildiği ucu, numunenin içinde bulunduğu küçük bir kap içine geçici olarak konur ve basınç farkı numuneyi kapiler içine enjekte eder. Basınç farkı, kapilerin dedektör ucuna vakum, numune ucuna basınç uygulayarak veya, numune ucunun yükseltilmesi ile meydana getirilir.

Kapiler kolona enjekte edilen örnek zonunun uzunluğu ve örnek hacmi sırasıyla 2.17 ve 2.18 eşitlikleri ile hesaplanır.

$$I_{enj} = (3,5 \times 10^6) r^2 \cdot P \cdot t_{enj} / L \quad (2.17)$$

$$H_{enj} = \Delta P \pi r^4 t_{enj} / 8 \eta L \quad (2.18)$$

I = örnek zonunun uzunluğu

$3,5 \times 10^6 = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de su için hesaplanmış bir sabit

r = kapilerin iç çapı

P = basınç

$t_{enj}$  = enjeksiyon süresi

L = kapilerin toplam uzunluğu

$H_{enj}$  = Enjekte edilen örnek hacmi

$\eta$  = tampon çözeltisi viskozitesi[25]

Basınç enjeksiyonunda, iyon yükünden dolayı hareketlilikte herhangi bir fark meydana gelmez; fakat jelle doldurulmuş kapilerde bu yöntem kullanılamaz [3].

### 2.5.2.2. Elektrokinetik enjeksiyon

Elektrokinetik enjeksiyonda, kapilerin bir ucu ve buna bağılı elektrot tamponun bulunduğu bölümden çıkarılır, numunenin bulunduğu küçük bir kap içerisine konur. Belirli bir süre potansiyel uygulanır; böylece elektroosmotik akış ve iyonik göçün etkisi ile kapiler içine numunenin alınmasını sağlamış olur. Daha sonra kapiler ve elektrot tekrar önceki tampon çözelti içine yerleştirilir ve ayrılma süresince potansiyel uygulanır. Bu enjeksiyon tekniği ile hızlı hareket eden iyonlar, yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınmaktadır [3].

$$I_{enj} = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) V_i t_i / L \quad (2.19)$$

$$w = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) \pi r^4 V_i t_i C / L \quad (2.20)$$

$\mu_{ep}$  = molekülün elefetroforetik mobilitesi

$\mu_{eo}$  = örnek çözeltilsinin elektroosmotik mobilitesi

$V_i$  = enjeksiyon voltajı

$L$  = kolon uzunluğu

$C$  = örnek konsantrasyonu

$w$  = enjekte edilen örnek miktarı

Eşitlik 2.20'den de görülebileceği gibi elektrokinetik enjeksiyon boyunca sisteme verilen örnek miktarı enjeksiyon zamanı ve enjeksiyon voltajının çeşitlendirilmesi ile kontrol edilebilir [23].

### 2.5.2.3 Örnek sıkıştırma

Örnek sıkıştırma, tampon iletkenliğinin enjekte edilen örnek konsantrasyonundan fazla olduğu durumlarda gerçekleşir. Analit bölgesindeki daralmanın nedeni, elektrik alanın spesifik iletkenlik ile ters orantılı olmasıdır, örneğin düşük iletkenlikte daha yüksek elektrik alan olması. Elektroforetik hız yüksek elektrik alanda artar ve böylece analit bölgesi daha da darlaşır.

Örnek sıkıştırmada optimum koşul tampon çözeltilsinin yaklaşık on kat seyreltik çözeltilsinde hazırlanan örneklerdir.

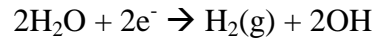
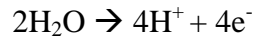
Örnek en basit şekilde, saf su çözeltilsi halinde de enjekte edilebilir. Tampon ve sulu örnek çözeltileri arasındaki iletkenlik farkı nedeniyle, örnek ilk önce örnek ve

tampon çözeltileri arayüzündeki yüksek elektrik alan altında hızlanır, daha sonra ise elektrik alanın daha düşük olduğu tampon alanına girdiğinde yavaşlar ve örnek bölge sınırına yığılır. Bu metod sadece tuz içermeyen örnek çözeltileri için uygundur.

Örnek sıkıştırma olarak adlandırılan bu etki, hem hidrodinamik hem de elektrokinetik enjeksiyonlarda verimliliği arttırmak için kullanılabilir [23,26].

### 2.5.3 Elektrotlar

CE’de platin elektrotlar kullanılır. Elektrotlardaki reaksiyonlar suyun ayrışma reaksiyonudur. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile aşağıdaki gibidir.



### 2.5.4 Voltaj kaynağı

Voltaj -30kV ve +30kV arasında değişebilir olmalı ve ayarlanan değer çalışma boyunca mümkün olduğunca sabit kalmalıdır. Voltaj arttığında oluşan elektrik alan da artacağından kapiler içerisindeki elektroosmotik akış hızlanacaktır. Bu yüzden yüksek voltaj kaynağı kullanılır. Voltajın sabit olması göç süresinin tekrarlanabilirliği açısından önemlidir [26,27].

### 2.5.5 Dedektör

Dedektörler konsantrasyon değişikliklerinden doğan kimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştürürler. Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtiği için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonların HPLC’dekine benzer. Bununla birlikte, kapiler elektroforezde her bir iyon, kendisinin elektroforetik hareketliliği ile belirlenen bir hızla göçtüğünden dedektörlerin davranışlarında bir fark gözlenir. Analit bantları dedektörden farklı hızlarla geçerler, bundan dolayı pik alanları kısmen alıkonma zamanlarına bağlıdır [3].

Kapiler elektroforezde kullanılan farklı özelliklerdeki dedektörler çizelge 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.2 :** CE’de kullanılan dedektör türleri [21]

Dedeksiyon Türü	LOD Değerleri (mol/L)	Özellikleri
UV-GB absorpsiyon	$10^{-7}$ - $10^{-4}$	Çok kapsamlı uygulama alanı Diodarray dedektörler ile spektral dedeksiyon
İndirek UV	$10^{-16}$ - $10^{-13}$	Aminler, şekerler, organik, inorganik iyonlara uygulama Kromofor grup içeren bir bileşik ile türevlendirilme
Floresans	$10^{-9}$ - $10^{-4}$	Aminoasitler, DNA, peptidler Hassastr Örnek türevlendirilmesi gerekebilir
Lazer indüklenmiş floresans	$10^{-14}$ - $10^{-16}$	Pahalıdır Çok hassastr Örnek türevlendirilmesi gerektirir
Amperometri	$10^{-8}$ - $10^{-6}$	Kolay indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddelere uygulama Hassastr Özel kapiler modifikasyonu gerekli
Potansiyometri	$10^{-8}$ - $10^{-7}$	Alkali iyonlarına uygulama
Kütle Spektrometrisi	$10^{-8}$ - $10^{-7}$	Protein, peptid, ilaç uygulamaları Hassastr Yapı hakkında bilgi sağlar
Alev Fotometrisi	$10^{-3}$ - $10^{-5}$	İyonik organik bileşiklere uygulama
Kondüktivite dedektörleri	$10^{-7}$ - $10^{-8}$	Özel kapiler modifikasyonu gerekli

CE’de genellikle analitler kapiler içindeyken dedekte edilirler. Fakat bazı nadir durumlarda, örneğin kütle spektrometri, amperometrik veya iletkenlik dedektöründe, dedeksiyon kapiler dışında gerçekleşir [26].

### 2.5.5.1 UV dedektör

UV-Görünür bölge adsorpsiyonu kapiler elektroforezde en çok kullanılan dedeksiyon tekniğidir [23].

Dedeksiyon hacmini nL veya daha az tutabilmek için dedeksiyon kolon üzerinde yapılmalıdır. Bunun için kapilerin iç kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme veya kazıma ile uzaklaştırılır. Kapilerin bu kısmı daha sonra dedektör hücresi olarak görev yapar. Ne yazık ki, bu durumda ışın yolunun uzunluğu 50 ile 100  $\mu\text{m}$ ’den fazla olmaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırları sınırlar. Bununla birlikte, hacmin çok küçük olması nedeniyle kütle gözlenebilme sınırları HPLC’dekine eşit veya ondan daha iyi olur [3].

Yüksek hassasiyet genellikle düşük-UV dedeksiyon dalga boyu kullanımı ile gerçekleştirilebilir. Peptidler ve karbonhidratlar, örneğin, güçlü bir kromoforları olmamasına rağmen ama 200 nm veya altında yeteri kadar tespit edilebilir [21].

## **2.6 Kapiler Elektroforez Çeşitleri**

Kapiler elektroforetik ayırma, mod ile isimlendirilen birkaç değişik şekilde yapılır.

### **2.6.1 Kapiler zon elektroforez (CZE)**

Numune, tampon tarafından çevrelenen dar bir zon (şerit) halinde uygulanır. Elektrik alan uygulandığında, numune zonundaki her bir bileşen kendi mobilitelerine göre göç ederler. Bütün numune komponentleri saf materyale ait zonlar oluşturmak üzere ayrılırlar. Nötral moleküller ayrılamazlar.

### **2.6.2 Kapiler jel elektroforez (CGE)**

Bu teknikte kapiller iç tarafında bir jel matris materyal vardır. Farklı büyüklükte, fakat aynı mobiliteye sahip bileşenler bu teknikte ayrılır. Daha büyük olan komponentler jel içinde yavaş ilerleyecek ve kapiller içinden daha sonra geçecektir. Özellikle DNA ve protein ayırmaları için sık kullanılan bir yöntemdir [2].

### **2.6.3 Kapiler izotakofrez (CITP)**

CITP'de ayırma, örneğin, mobilitesi farklı iki tampon arasında sıkıştırılarak göçüne dayanır. Anyon ve katyonlar aynı anda ayrılamaz.

### **2.6.4 Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)**

Klasik elektroforezden farklı olarak izoelektrik odaklama, analiz edilecek numunenin bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanır. Protein ve amino asitler gibi amfiprotik türlerin ayrılmasında kullanılır [3].

### **2.6.5 Kapiler elektrokromatografi (CEC)**

Elektrokromatografi, kapiler elektroforez ve HPLC'nin iyi özelliklerini birleştiren hibrit bir yöntemdir. Ayırma kolonu, kromatografik dolgu materyali ile doludur. CEC'de sıvı silika duvarı ve partikül yüzeyiletkileşim içindedir. Sonuç olarak, elektroosmoz açık bir tüpteki gibi değişik yüzeylerde yüklü partiküllerin varlığı ile meydana gelir. Dolgusuz bir kapilerde akış daha düzgünken, burada kanalın tortulu

doğası nedeniyle daha az mükemmeldir. HPLC ve CEC arasındaki tek fark, mobil fazın sürüklenmesi için HPLC'deki gibi bir basınç pompası değil, bir yüksek voltajın kullanılmasıdır [2,3,23].

### **2.6.6 Misel elektrokinetik kromatografi (MEKC)**

MEKC'de ayırma mekanizması örneğin, çözelti ve misel fazları arasında dağılımıdır. Bu tekniğin nötral moleküllerin de CE'de ayrılmasına olanak verir.

Misel ile yapılan kapiler elektroforezde, çalışılan tampon içine kritik misel derişimini aşacak şekilde yüzey aktif madde ilave edilir. Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğunda yüzey aktif madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır. Bu tip anyonik misellerin yüzeyi büyük negatif yüke sahip oldukları için pozitif elektroda doğru hareket ederler. Böylece, bir deneyde tampon karışımı hızlı hareket eden su faz ile yavaş hareket eden misel fazlarından meydana gelir. Böyle bir sisteme numune ilave edildiğinde, numune bileşenleri sulu faz ve miselin iç kısmı olan hidrokarbon fazı arasında dağılırlar. Buradaki dağılım dengesi çözünen maddenin polaritesine bağlıdır. Çözünenin polar olması durumunda sulu faz tercih edilirken, polar olmayan maddeler ise hidrokarbon faz olan miseli tercih eder [3,23].

### 3. DENEYSEL TASARIM VE OPTİMİZASYON

Kemometri, mümkün olduğu kadar az deney yapılarak çeşitli yöntemlerden elde edilen kimyasal verilere istatistiksel ve matematiksel tekniklerin uygulanması ile bu verilerden daha fazla yararlı bilgilerin elde edilmesine olanak tanıyan bir disiplindir. Kemometri yalnızca veri değerlendirmede değil, deney tasarımında da yol gösterici olarak kullanılmaktadır [28].

Deneysel tasarımın amacı deney sayısını, maliyeti azaltmak ve zamandan tasarruf sağlamaktır [29]. İstatistiksel deneysel tasarım yöntemleri ile, deneysel çalışmalarda tüm parametreler aynı anda incelenebilir. Klasik yöntemlerde karşılaşılan problemler, istatistiksel deney tasarım yöntemleri ile giderilebilir. Kemometrik yöntemlerin avantajı belli bir modele gerek duyulmamasıdır. Model elde edildiği zaman optimizasyonu, regresyon modelleri ile gerçekleştirmek çok kolaydır. Modelde bir bağımlı değişken (yanıt) ve çeşitli bağımsız değişkenler (faktörler) vardır [30,31].

CE duyarlılığı artırmak için kullanılan yöntemlerden biri olan örnek sıkıştırma yöntemindeki deneysel şartların optimizasyonu için kullanılan bağımlı değişkenler; pik yükseklikleridir. Bunu etkileyen bağımsız değişkenler ise enjeksiyon voltajı, basıncı ve süresi, tampon bileşimi, konsantrasyonu, pH'ı ve iyonik kuvveti, organik çözücü gibi geniş bir aralıkta değişen ayırma şartlarıdır. Optimum şartları belirlemek için kullanılan klasik yöntem, bir parametreyi değiştirirken, diğer parametreleri adım adım sabit tutmaktır. Bu şartları klasik yöntemi kullanarak araştırmak çok fazla deneysel işlem gerektirir ve deneyler yorucu, bıktırıcı ve zaman alıcıdır. Bu yöntemde başka bir etkileşim görüldüğü zaman verilen herhangi bir değişkenin etkisi diğer değişkenlerin büyüklüğüne bağlı olduğu için tek değişkenli optimizasyon uygun değildir [32].

Kemometrik deneysel tasarım teknikleri ile yukarıda bahsedilen eksiklikler ortadan kaldırılabılır. Deney sayısı kemometrik yöntemler ile oldukça azaltılabilir. Kemometrik deneysel tasarım teknikleri, bir yöntemin geliştirilmesinin başlangıç

aşamalarını ve analiz verilerinden, çok miktarda anlamlı bilginin çıkarılmasını içerir. Bunu az sayıdaki matematiksel çalışma ile pek çok parametrenin ard arda taranması takip eder [28,32].

Optimizasyon iki nedenle yapılır. Birincisi deney sonucunu etkileyen faktörlerin optimum değerlerini bulmak. İkinci ise, her bir faktörün sonuca etkisini gösteren matematiksel modelin oluşturulmasıdır. Optimizasyon tarama tasarımları ile bulunan önemli faktörlerin optimum değerlerinin belirlenmesi işlemidir.

Deneysel tasarımın önemi, tarama tasarımları, optimizasyon, zaman tasarufu ve modelleme olarak dört madde ile açıklanabilir [30].

### **3.1 Yanıt Yüzey Metodu**

Yanıt yüzey yöntemi (YYM), çeşitli bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenin değerini optimize etmek için istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. YYM de bağımlı değişkenler yanıt ve bağımsız değişkenler faktör olarak değerlendirilir. YYM yanıtın çok sayıda faktörden etkilendiği işlemlerin analizinde, modellemesinde ve optimizasyonunda kullanılmaktadır [33].

YYM da ilk olarak yanıtı etkileyen önemli faktörlerin belirlenmesi tarama tasarımları ile gerçekleştirilir. Optimum noktaya ulaşmak için merkezi kompozit tasarım (CCD) ve Box Behnken (BBD) tasarımları kullanılır. Bu tasarımlardan elde edilen ikinci derecede model denklemlerden yanıt yüzey grafikleri ve kontur grafikleri elde edilir [33].

#### **3.1.1 Tarama Tasarımları**

Full faktöriyel tasarım (FFD), en basit ve en çok kullanılan tarama tasarımlarındandır. Yanıtı etki eden faktörlerin belirlenmesinde kullanılan iki seviyeli bir tasarımdır. Full faktöriyel tasarımda her bir faktörün ve etkileşimin yanıtı etkileri incelenir. Tasarımda deney sayısı  $N=2^k$  formülü ile verilir. Burada 2 seviye sayısını, k faktör sayısını gösterir. Seviyeler düşük seviye -1 ve yüksek seviye +1 olarak kodlanır. İki faktör için deney sayısı  $2^2=4$ , üç faktör için  $2^3=8$  dir. Dört faktör için deney sayısı  $2^4=16$  dır. İki seviyeli full faktöriyel tasarımda 7 faktör için 128, 10 faktör için 1024 deney yapılması gerekmektedir. Faktör sayısı arttıkça deney

sayısında çok fazla arttığı için full faktöriyel tasarım pratik olmamaktadır. Bu durumda deney sayısının azaltılabileceği fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanılabilir.

Fraksiyonel faktöriyel tasarımda deney sayısı azaltılırken bazı faktörler arası etkileşimler incelenememektedir. Bu yöntemde deney sayısı  $2^{k-p}$  formülünden hesaplanır. K faktör sayısı p= 1,2,3,4 gibi tam sayılardır. 5 faktörlü bir tasarım için deney sayısı  $N=2^{5-1} = 16$  veya  $2^{5-2}= 8$  olarak azaltılabilir. Faktör sayısı 6,7,8 ise fraksiyonel faktöriyel tasarım yapılır. Bu tasarımda her faktörün etkisi, incelenir. Deney sayısı azalınca bazı ikili etkileşimler incelenemez. Faktör sayısı 6'dan büyük olduğunda bir başka tasarım olan Placket Burman tasarımı(PBD) kullanılır. Placket Burman tasarımla her bir faktörün sonuç üzerine etkileri incelenirken, faktörler arası etkileşimler dikkate alınmamaktadır [34].

Tasarımı yapmak için aşağıdaki adımlar takip edilir.

Birinci adımda, incelenen her bir faktör için düşük ve yüksek seviyeler belirlenir. Çizelge 3.1' de bu çalışmada incelenen faktörler ve seviyeleri görülmektedir.

**Çizelge 3.1:** Çalışmada kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Kodlu değerlerin seviyeleri	
	-1	1
X <sub>1</sub> (t <sub>inj</sub> )	0,5	2,5
X <sub>2</sub> (C <sub>NaCl</sub> )	10	80
X <sub>3</sub> (V <sub>inj</sub> )	-5	-10
X <sub>4</sub> (MeOH)	10	50
X <sub>5</sub> (pH)	5	7,5

İkinci adımda, kodlanmış seviyelere göre tasarım tablosu oluşturulur. Burada yüksek seviye (+1) ve düşük seviye (-1) dir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2:** Fraksiyonel faktöriyel tasarım tablosu

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	Y
-1	-1	-1	-1	1	0,003387
1	-1	-1	-1	-1	0,0042
-1	1	-1	-1	-1	0,002859
1	1	-1	-1	1	0,000595
-1	-1	1	-1	-1	0,002489
1	-1	1	-1	1	0,001234
-1	1	1	-1	1	0,005546
1	1	1	-1	-1	0,010578
-1	-1	-1	1	-1	0,015816
1	-1	-1	1	1	0,027416
-1	1	-1	1	1	0,032747
1	1	-1	1	-1	0,046268
-1	-1	1	1	1	0,011652
1	-1	1	1	-1	0,014919
-1	1	1	1	-1	0,026684
1	1	1	1	1	0,044284

Üçüncü adımda kodlanmış değerler yerine, faktörlerin gerçek değerleri yerleştirilerek deneysel çalışmalar gerçekleştirilir (Çizelge 3.3) [30].

**Çizelge 3.3:** Faktörlerin gerçek değerleri

Deney No	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
1	0,5	10	-5	50	7,5
2	2,5	10	-5	10	5
3	0,5	80	-5	10	5
4	2,5	80	-5	50	7,5
5	0,5	10	-10	10	5
6	2,5	10	-10	50	7,5
7	0,5	80	-10	50	7,5
8	2,5	80	-10	10	5
9	0,5	10	-5	10	5
10	2,5	10	-5	50	7,5
11	0,5	80	-5	50	7,5
12	2,5	80	-5	10	5
13	0,5	10	-10	50	7,5
14	2,5	10	-10	10	5
15	0,5	80	-10	10	5
16	2,5	80	-10	50	7,5

İki seviyeli tasarımlar, her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Bu tasarımlar ile faktörlerin optimum koşulları bulunamamaktadır.

### 3.1.2 Merkezi kompozit tasarım

Optimum değerlerin bulunması için merkezi kompozit tasarım (CCD) veya Box Behnken tasarımı (BBD) kullanılır. Merkezi kompozit tasarım 3 ya da 5 seviyeli, Box-Behnken tasarım da sadece 3 seviyeli yapılabilmektedir [34]. Bu tasarımlarla parabolik terimler içeren ikinci dereceden modeller oluşturulur. CE ayırmalarında en çok kullanılan deneysel tasarım yöntemleri PBD, BBD, CCD, FFD tasarımlarıdır [31-36].

Merkezi kompozit tasarımda üç tür tasarım noktası bulunur. Bunlar; iki seviyeli full faktöriyel ya da fraksiyonel faktöriyel noktaları, star (eksenel) noktalar ve merkezi noktalar. Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki formülle belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (3.1)$$

$2^k$  faktöriyel noktaları gösterir. Burada seviyeler (-1) ve (+1) olarak faktörlerin minimum ve maksimum değerlerini gösterir. İki faktörün olduğu durumda, 4 faktöriyel tasarım noktası vardır.  $2k$  star noktalar gösterir ve seviyeler  $\pm\alpha$  değerlerini alır.  $\alpha$  değeri  $\pm\sqrt[4]{2^k}$  formülü ile hesaplanır.  $\alpha$ , minimum ve maksimum değerlerin dışında bir değerdir ve genellikle 1' den büyüktür.  $\alpha$ ' nın değeri star noktaların yerini belirler. Bu noktalar modelin eğriliğini belirlemede kullanılır. Bu tasarım dairesel bir simetriye sahiptir. 3.1 nolu formüldeki 1, merkezi noktaları gösterir. Merkezi noktalar 0 seviyesindeki noktalardır. 0 ile gösterilen seviye, faktörler için belirlenen minimum ve maksimum değerlerin ortalaması alınarak bulunur. Merkezi noktalar, deneysel hataları tespit etmek için 4-6 kez tekrarlanır.

Bu çalışmada, optimizasyon için merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Bu yöntemde ilk adım, bağımlı değişken (yanıt) üzerinde etkisi olduğu düşünülen bağımsız değişkenleri (faktörleri) ve bunların seviyelerini belirlemektir. NaCl konsantrasyonu ve enjeksiyon süresi olarak iki faktör belirlendiğinden,  $2^2$  full faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Pik yüksekliği, yanıt (bağımlı değişken, y) olarak alınmıştır.

Bu çalışmada tasarlanan deneyler ve faktörlerin kodlu ve gerçek değerleri Çizelge 3.4'te görülmektedir.

**Çizelge 3.4:** Optimizasyon deneyleri için tasarlanan deney ve faktörlerin değerleri  
( $\alpha=1.414, -\alpha=-1.414$ )

Deney no	Kodlanmış değerler		Deneysel değerler	
	$X_1(t_{ini})dk$	$X_2(C_{NaCl})mM$	$X_1$	$X_2$
1	-1	-1	0,5	25
2	-1	1	0,5	95
3	1	-1	2,2	25
4	1	1	2,2	95
5	$-\alpha$	0	0,148	60
6	$\alpha$	0	2,5	60
7	0	$-\alpha$	1,35	10,5
8	0	$\alpha$	1,35	109,5
9	0	0	1,35	60
10	0	0	1,35	60
11	0	0	1,35	60
12	0	0	1,35	60
13	0	0	1,35	60

### 3.3 Model Oluşturma

Tarama tasarımı ve optimizasyon sonucu her bir faktörün etkisi matematiksel modelle ifade edilebilir. Böylece deneysel sonucun yanında, hesaplama, tahmini sonuç da bulunmuş olur. Beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleştirilip gerçekleştirilemediği kontrol edilir.

İstatistiksel deneysel tasarımdan elde edilen veriler çoklu lineer regresyon yöntemi kullanılarak değerlendirilir. Yanıtlar polinomiye fonksiyonlar ile tanımlanır. Tarama tasarımları için polinomiye eşitlik;

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (3.2)$$

Merkezi kompozit tasarım için ise;

$$y = b_0 + \sum_1^k b_i x_i + \sum_1^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j \quad (3.3)$$

şeklinde verilir. Burada  $y$ : yanıt;  $x_1, x_2, \dots, x_k$  faktörler;  $b_i \dots b_k$  regresyon modeli ile belirlenen katsayılar.  $b_{ij} x_i x_j$  faktörler arasındaki etkileşimi;  $b_{ii} x_i^2$  ise modelin eğriliğini tanımlar [28].

Hesaplamalar için faktörler arasındaki etkileşimleri de içine alan bir tasarım matrisi oluşturularak veriler analiz edilir ve yukarıdaki matematiksel modellerden biri oluşturulur.

Bu çalışmada optimum değerler Minitab programı ile hesaplanmıştır.



## **4. DENEYSEL KISIM**

### **4.1 Cihazlar**

Analizler Prince Technologies (Emmen, Netherlands) kapiler elektroforez cihazında, Polymicro Technologies marka (Phoenix, AZ, USA) kapiler kolon ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon için Bischoff Lambda 1010 UV dedektörü kullanılmıştır. Veri eldesi DAX 8.0 Data Acquisition and Analysis programında yapılmıştır.

Çözeltiler Elga Purelab Option-Q sistemi ile elde edilen saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltilerinin pH'ları Thermo Scientific Orion Dual Star marka pH metre ile ayarlanmıştır.

Örnekler hem hidrodinamik hem de elektrokinetik olarak enjekte edilmişlerdir. Dedeksiyon, 25 °C'de, UV dedektörde ile 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

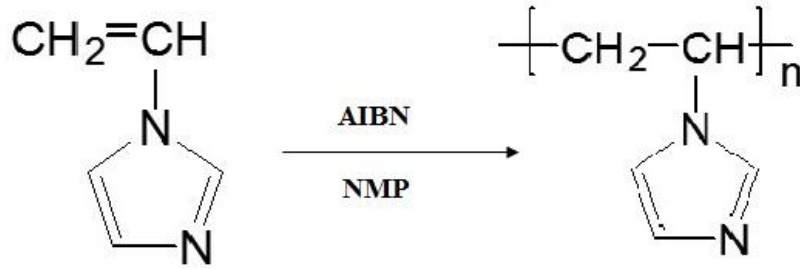
### **4.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması**

Anyon analizleri için  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$  ve  $\text{BrO}_3^-$  kullanılmıştır. Anyonlar Na tuzlarından hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , TRIS, TRICENE, borat, MES tamponları kullanılmıştır. pH ayarı için 1M NaOH, 1M HCl ve 1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  kullanılmıştır. Nötral marker olarak formamid kullanılmıştır. Tüm maddeler Merck markadır.

### **4.3 PVI Sentezi**

PVI tersiyer amin grupları nedeniyle zayıf bir katyonik polielektrolittir. PVI'nin pozitif yükü, pH'a, konsantrasyona ve elektrolit tipine bağlıdır. Ortalama pKa değeri 5'tir. Kimyasal yapısı şekil 4.1'de görüldüğü gibidir. AIBN'nin başlatıcı olarak kullanıldığı vinil imidazol (VI) monomerinin polimerizasyonu literatürde açıklanan metod ile gerçekleştirilmiştir [36]. Distile monomer-VI (15 g) 100 mL toluen içinde çözülmüş ve 70 °C'de nitrojen atmosferi altında 1.3 g başlatıcı ile 48 saat boyunca

polimerize edilmiştir. Polimer beyaz bir toz olarak çökmüştür. Katı kısım süzülerek toplanmış ve oda sıcaklığındaki vakum altında kurutulmuştur. Polimer %85 verimle elde edilmiştir. PVI Mark-Houwink sabitleri  $a = 0.51$  ve  $k = 12.2 \times 10^{-4}$  (dL/g) [37]. Polimerin  $M_v$  değeri  $5.0 \times 10^4$  bulunmuştur. Polimerizasyon, şekil 4.1’de görüldüğü gibidir [38].



Şekil 4.1 : PVI polimerizasyonu

#### 4.4 Kaplama Koşulları

Kullanılan silika kapiler kolon 75 µm iç çapına, 70 cm toplam uzunluğa ve 56 cm etkin uzunluğa sahiptir. Kapiler kolon ilk kullanımda 30 dakika 1M NaOH çözeltisi ile yıkanmış ardından kaplama işlemi için 5 dakika %0,5’ lik PVI çözeltisi ile yıkanmış ve 10 dakika bu çözeltide bekletilmiştir. Gün başında ve sonunda 5 dakika 0,1 M HCl çözeltisi, 5 dakika %0,01 PVI, 5 dakika su ve 5 dakika tampon çözeltisi ile; gün sonunda ise dakika 0,1 M HCl çözeltisi ve 5 dakika su ile yıkanmıştır.

#### 4.5 Elektroosmotik Akış Mobilitesinin Ölçümü ve Hesaplanması

Elektroforetik mobilite ölçümü için farklı pH’larda farklı tampon çözeltiler kullanılmıştır. Çözeltilerin uygun pH değerlerine gelmesi için 1M NaOH ve 1M HCl çözeltileri kullanılmıştır. Mobilite nötral bir madde kullanılarak ölçülür. Genel olarak EOA’nın büyüklüğü 2.11 eşitliğinden hesaplanır. Fakat EOA çok yavaş olduğu zaman bu eşitlik kullanılamaz. EOA’ın yavaş olması çok uzun analiz sürelerine neden olur. Bu durumda EOA ölçümü Williams ve Vigh [1] tarafından geliştirilen bir metoda göre gerçekleştirilir. Bu çalışmada EOA ölçümünde bu metod kullanılmıştır. Bu metod, kapilerde nötral maddenin ardarda üç bant oluşturması temeline dayanır. Bu çalışmada nötral madde olarak formamid kullanılmıştır. Formamidin ilk bölgesi 0,02 dakika 60 mbar basınçla injekte edilmiş ve ardından 0,02 dakika boyunca 60 mbar basınç uygulanmıştır. İkinci formamid bölgesi için 60 mbar basınçla 0,02

dakika boyunca formamid enjekte edilmiş ve 0,02 dakika 60 mbar basıncın tekrar uygulanmasının ardından 3 dakika -15 kV potansiyel uygulanmıştır. Üçüncü formamid bölgesi için tekrar 60 mbar basınçla 0,02 dakika süreyle formamid enjekte edilmiştir ve 60 mbar basınç altında elektroferogram gözlenmiştir. Bu metodla ölçülen EOA hızı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\mu_{eo} = \frac{\left[ t_3 - 2t_2 + t_1 \right] \frac{L_d}{t_1 + \frac{t_{inj}}{2}} L_t}{V \cdot \left( t_{mig} - \frac{t_{rampup}}{2} - \frac{t_{rampdown}}{2} \right)} \quad (4.1)$$

Burada;

$\mu_{EO}$  = elektroosmatik mobilite

$t_1, t_2, t_3$  = 1,2,3 bandın göç zamanları

$L_d$  = kapilerin etkin uzunluğu

$L_t$  = kapilerin toplam uzunluğu

$t_{mig}$  = uygulanan voltajın süresi

$t_{rampup}$  ve  $t_{rampdown}$  = uygulanan voltajın lineer değişim süreleridir.

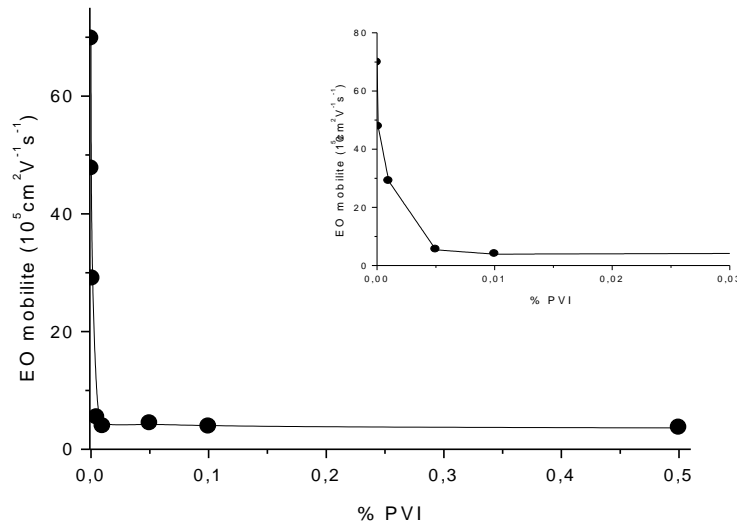


## 5. SONUÇLAR

### 5.1 PVI Konsantrasyonunun Optimizasyonu ve Kaplama İşlemi

EOA'nın büyüklüğü beklenildiği gibi PVI çözeltisinin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle ilk önce kaplama çözeltisinin konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Şekil 5.1'de EOA'a PVI konsantrasyonunun etkisi görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi PVI konsantrasyonu artışı ile EOA azalmaktadır. Mobilite sabit kaldığı zaman yeterli kaplamaya ulaşılmıştır. Mobilite % 0,02 PVI konsantrasyonundan sonra sabitlenmiştir. EOA mobilitesi normal kapilerdekenden ~10 kat kadar azalmıştır. Sonuçlar PVI ile dinamik kaplamanın gerçekleştiğini göstermektedir. Kaplama süresi 1-10 dakika arasında incelenmiştir ve kararlı bir kaplam için 5 dakikanın yeterli olduğu belirlenmiştir.

PVI molekülündeki azot kapiler duvarının silanol grupları ile etkileşim yapmaktadır. Silanol gruplarının negatif yüklü ve PVI'nın azotun protonasyonu nedeniyle pozitif yüklü olması nedeniyle, kapiler duvarı ile PVI arasındaki etkileşimin elektrostatik olduğu düşünülebilir.

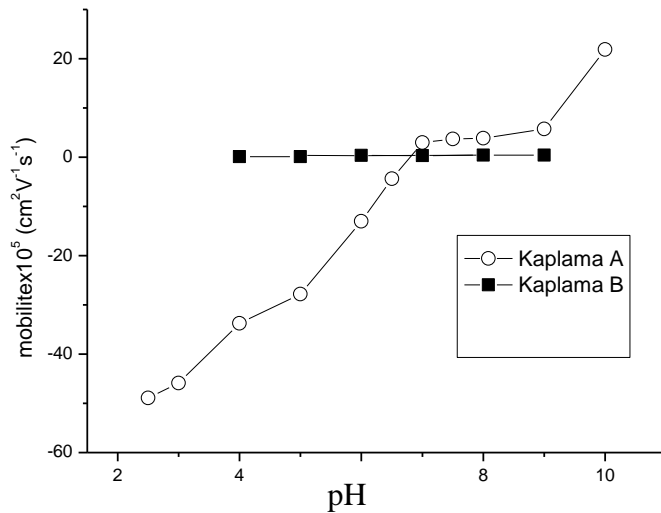


Şekil 5.1: Elektroosmatik akışa PVI konsantrasyonunun etkisi

Kaplama işlemi iki farklı şekilde hazırlanan PVI çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Kaplama A da; kaplama çözeltisi PVI suda çözülerek hazırlanmıştır. Kaplama B de ise; 0,1 M NaCl çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

## 5.2 EOA'a Tampon pH'nın Etkisi

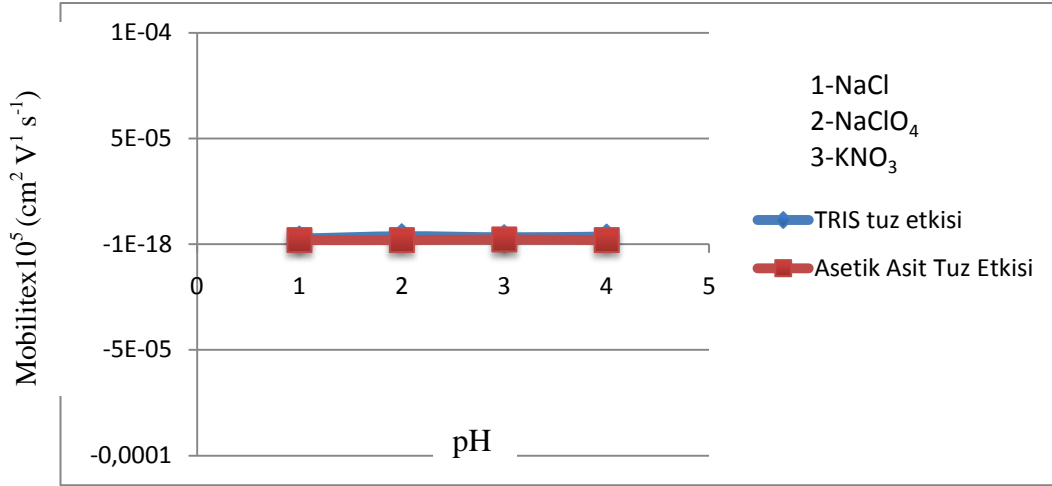
Bu iki farklı kaplama için EOA ile tampon pH'ı arasındaki ilişki pH 2-10 arasında incelenmiştir. Bu pH aralığında H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, TRIS, TRICENE, borat, MES tampon çözeltileri ile denemeler yapılmıştır. Her iki kaplama için farklı tamponlar ile yapılan denemeler sonucunda şekil 5.2'dekine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 5.2'de iki dinamik kaplama türüne pH'ın etkisi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi kaplama A pH'dan oldukça fazla etkilenmektedir. 7 nin altındaki pH larda PVI molekülündeki azotun protonasyonu nedeniyle pozitif bir yüke sahiptir. Bu da EOA'nın ters (katoddan anoda) çevrildiğini gösterir. Yüksek pH larda ise PVI anyonik türleri bağladığı için yükü negatif olmaktadır. Bu durumda EOA yönü anottan katoda doğrudur. Kaplama B'nin pH 3-9 arasında mobilitenin sabit kaldığı görülmektedir. Bu kaplamada mobilite de sadece düşük ve yüksek pH larda bir değişim görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada kaplama B kullanılmıştır. Kaplama B ile EOA önemli derecede basıtırılmıştır.



Şekil 5.2: Elektroosmatik akışa tampon pH'nın etkisi

### 5.3 EOA'a Çeşitli Tuzların Etkisi

Çalışma tamponuna farklı tuzların eklenmesinin mobiliteye etkisi Şekil 5.3'te görülmektedir. EOA'a farklı tuzların önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Çizelge 5.1'den görüldüğü gibi kaplamada en çok bozulmaya NaOH neden olmuştur.



Şekil 5.3: Elektroosmatik akışa tuz etkisi

### 5.4 PVI Kaplamanın Kararlılığı ve Tekrarlanabilirliği

Kaplamanın dayanıklılığı tampona organik çözücü, asit, baz, çeşitli tuzlar ve SDS ilave edilerek test edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 5.1'de verilmiştir. Kapilerden 15 dakika süreyle çeşitli çözücüler, sonra 2 dakika su ve 2 dakika tampon çözelti geçirilerek EOA belirlenmiştir. Buradan kaplamanın bozulma oranı belirlenmiştir.

Çizelge 5.1: Farklı çözücülerle kaplamanın kararlılığı

Çözücü	EOA <sub>1</sub> (10 <sup>6</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	EOA <sub>2</sub> (10 <sup>6</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Bozulma (%)
0,1 M HCl	3,83	3,77	1,6
0,1 M NaOH	3,81	4,36	14
CH <sub>3</sub> OH	3,74	3,68	1,6
CH <sub>3</sub> CN	3,78	3,47	8

Çizelge 5.2'de ise kaplı kapilerin gün içinde ve günler arası yapılan ölçümlerle hesaplanan tekrarlanabilirliği görülmektedir.

**Çizelge 5.2:** Kaplı kapilerin tekrarlanabilirliği

	Ortalama EOA <sub>1</sub> (10 <sup>6</sup> cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	RSD (%)
Gün içi (n=5)	3,65	0,85
Günler arası (n=5)	3,81	1,62

## 5.5 Deneysel Tasarım Kullanılarak Anyonların Örnek Sıkıştırma Yöntemi ile Optimizasyonu

### 5.5.1 Fraksiyonel faktöriyel tasarım ile etkili faktörlerin bulunması

Bölüm 3.1.1'de açıklanan yöntemle Çizelge 3.2'de verilen tasarım çizelgesi kullanılarak faktörler ve aralarındaki etkileşimleri incelemek için iki seviyeli fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanılmış ve bu amaçla 16 deney gerçekleştirilmiştir. Bu tarama tasarımı ile etkili faktörler belirlenmiştir. Yanıt olarak pik yükseklikleri alınmıştır. Faktörler için tasarım matrisi, yüksek ve düşük seviye değerleri, yanıtla birlikte kodlu değerler Çizelge 3.3'de, deneysel ölçümler sonucu yanıt değerleri de Çizelge 3.2'de verilmiştir. Deneyler rasgele sıra ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım analizleri Microsoft EXCEL ve MİNİTAB programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Regresyon analizi ile faktörler için bulunan katsayılar ve p değerleri Çizelge 5.3'te verilmiştir. Etkili faktörler p-değerlerinden belirlenebilir. Etkili faktörlerin belirlenmesi için p-değerinin anlamlılık düzeyinin 0,05 ten küçük olması gerekir. p-değeri 0,05 den küçük olan faktörler X<sub>2</sub> ve X<sub>4</sub> tür. Bu durumda tarama tasarımı sonuçlarından enjeksiyon süresi ve NaCl konsantrasyonu etkili faktörler olarak bulunmuştur.

**Çizelge 5.3** Model için katsayılar ve faktörler için p değerleri

	SCN <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	<i>Katsayılar</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Katsayılar</i>	<i>P-değeri</i>
Kesişim	0,015667	1,28E-05	0,013807	0,000116
X <sub>1</sub>	0,00302	0,157742	0,004714	0,064076
X <sub>2</sub> *	<b>0,005528</b>	<b>0,018938</b>	<b>0,006567</b>	<b>0,015856</b>
X <sub>3</sub>	-0,00099	0,62616	-0,00131	0,576733
X <sub>4</sub> *	<b>0,011806</b>	<b>0,000137</b>	<b>0,008154</b>	<b>0,004848</b>
X <sub>5</sub>	0,00019	0,925161	0,000431	0,853016

### 5.5.2 Yanıt yüzey metodu ile optimizasyon

Optimum şartların bulunması için pik yüksekliğini (yanıtı) etkileyen faktörler olarak, yukarıda tarama tasarımında bulunan NaCl konsantrasyonu ve enjeksiyon süresi alınarak merkezi kompozit tasarım ile deneysel çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 5.4'te faktörler ve gerçek değerleri gösterilmektedir. Çizelge 5.5'te tasarlanan deneyler ve yanıtlar görülmektedir. Deneyler rastgele sıra ile gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 5.4:** MKT da kullanılan Faktörlerin seviyeleri ve gerçek değerleri

Faktörler	Faktör seviyeleri				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$C_{NaCl}$	10,5	25	60	95	109,5
$t_{inj}$	0,148	0,5	1,35	2,2	2,55

**Çizelge 5.5:** Faktörlerin seviyeleri ve yanıtlar

Deney No	$X_1$	$X_2$	y1	y2	y3	y4	y5
1	-1	-1	0,001586	0,00113	0,005097	0,002003	0,000429
2	1	-1	0,002126	0,001873	0,018087	0,002499	0,001284
3	-1	1	0,004642	0,001879	0,008262	0,009419	0,002617
4	1	1	0,010658	0,009527	0,033966	0,030196	0,006968
5	-1,414	0	0,000612	0,000764	0,001172	0,001573	0,000529
6	1,414	0	0,004636	0,013224	0,036497	0,032012	0,005612
7	0	-1,414	0,000197	0,001681	0,005477	0,000652	0,00000
8	0	1,414	0,009339	0,014321	0,024056	0,024259	0,00516
9	0	0	0,004636	0,011819	0,020134	0,019503	0,003763
10	0	0	0,004488	0,011624	0,020584	0,019401	0,003845
11	0	0	0,004708	0,010724	0,018846	0,015859	0,003298
12	0	0	0,004545	0,010579	0,01897	0,015233	0,003901
13	0	0	0,015753	0,010797	0,01881	0,015753	0,002746

Deneysel veriler çoklu regresyon analizi uygulanarak analiz edilmiştir. Yanıtlar ve faktörler arasındaki ilişkileri belirlemek için yanıt yüzey metodu kullanılmıştır. Tasarımda kullanılan enjeksiyon süresi ( $X_1$ ) ve NaCl konsantrasyon ( $X_2$ ) değerleri için;  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2^2$  ve  $X_1 X_2$  için katsayılar hesaplanmıştır. Bulunan regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklemler sırasıyla  $Br^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SCN^-$  ve  $BrO_3^-$  için aşağıdaki şekilde türetilmiştir:

Değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon denklemleri:

$$Y = 0,004583 + 0,002165 X_1 + 0,004332 X_2 - 0,001430 X_1^2 + 0,000711 X_2^2 + 0,002735 X_1 X_2$$

$$Y = 0,011107 + 0,004600 X_1 + 0,004643 X_2 - 0,006064 X_1^2 - 0,005055 X_2^2 + 0,003450 X_1 X_2$$

$$Y = 0,019457 + 0,015664 X_1 + 0,008006 X_2 - 0,000852 X_1^2 - 0,004929 X_2^2 + 0,006352 X_1 X_2$$

$$Y = 0,017144 + 0,011365 X_1 + 0,012100 X_2 - 0,002158 X_1^2 - 0,0006495 X_2^2 + 0,010132 X_1 X_2$$

$$Y = 0,003509 + 0,002190 X_1 + 0,002680 X_2 - 0,000440 X_1^2 - 0,000931 X_2^2 + 0,001746 X_1 X_2$$

olarak bulunmuştur.

Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen model denklemden pik yükseklikleri hesaplanmış ve deneysel veriler ile karşılaştırılmıştır. Nitrat için hesaplanan regresyon katsayıları örnek olarak çizelge 5.6'da verilmiştir.

**Çizelge 5.6:** Pik yüksekliği için tahmin edilen regresyon katsayıları (Nitrat için)

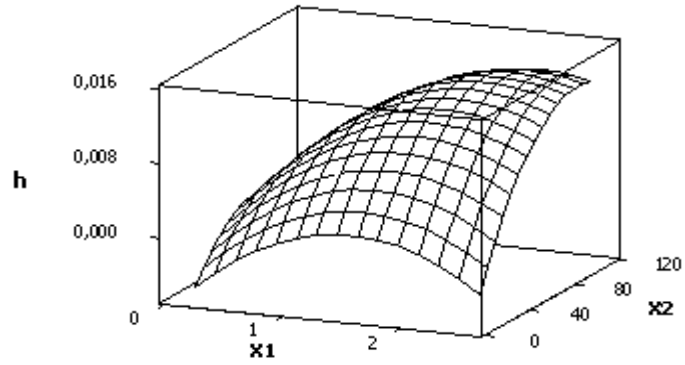
	Katsayılar	Katsayılar	t	P
Sabitler	0,019457	0,000856	22,723	0,000
X <sub>1</sub>	0,015664	0,000957	16,369	0,000
X <sub>2</sub>	0,008006	0,000957	8,362	0,000
X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	-0,000852	0,001451	-0,587	0,576
X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	-0,004929	0,001452	-3,395	0,012
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	0,006352	0,001913	3,320	0,013
S = 0,001915    R-Sq = %98,1    R-Sq(adj) = %96,7				

Çoklu belirleme katsayısı olan R<sup>2</sup> 0,895-0,981 arasında bulunmuştur. Bu katsayılar pik yüksekliğindeki değişimin ne kadarının faktörlerce açıklanacağını gösterir. Bu matematiksel modellerin uygun olduğunu söyleyebiliriz.

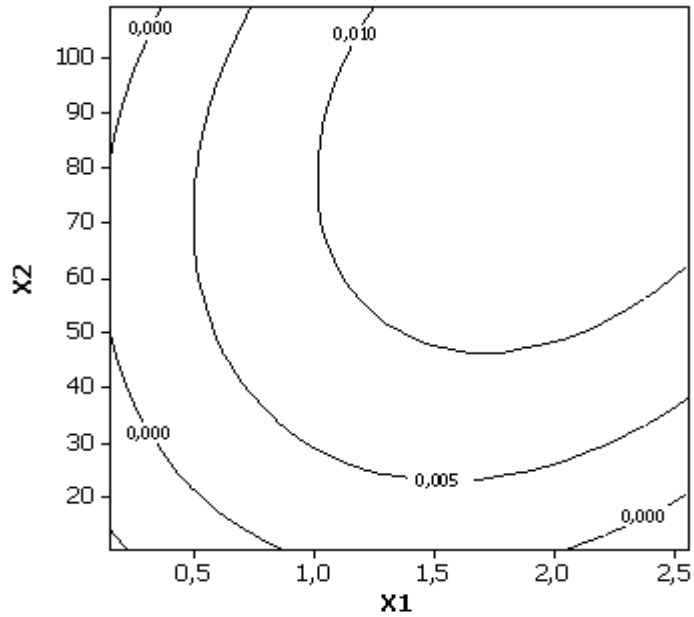
Çizelge 5.6'ya bakıldığında konsantrasyon ve enjeksiyon süresi ile yanıt(pik yüksekliği) arasında pozitif doğrusal bir etki olduğu görülmektedir(p<0,05). Bunun anlamı artan konsantrasyon ve enjeksiyon süresi ile pik yüksekliğinin artacağıdır. p değerlerinin küçük olması katsayının önem derecesinin fazla olduğunu göstermektedir. İnjektion süresi daha büyük etkiye sahiptir. Konsantrasyon ve enjektion süresi arasındaki negatif kuadratik etkileşimin anlamı ise, her iki

parametre arttığında pik yüksekliğinin de artacağı, belli bir değerde maksimuma ulaşacağı ve parametreler daha yüksek değerlere çıktığında ise pik yüksekliğinin azalacağı anlamına gelmektedir. İki parametre arasındaki etkileşim de anlamlıdır. Fakat enjeksiyon süresinin kuadratik etkileşimi anlamlı değildir ( $p>0,05$ ).

Şekil 5.4'te pik yüksekliğine etki eden NaCl konsantrasyonu ve enjeksiyon süresinin üç boyutlu yanıt yüzey grafiği görülmektedir. Bu grafik iki faktörün hem birbirleri, hem de yanıt üzerindeki etkilerini göstermektedir. Şekil 5.5'te ise kontur grafiği görülmektedir.



Şekil 5.4: Yüzey grafiği

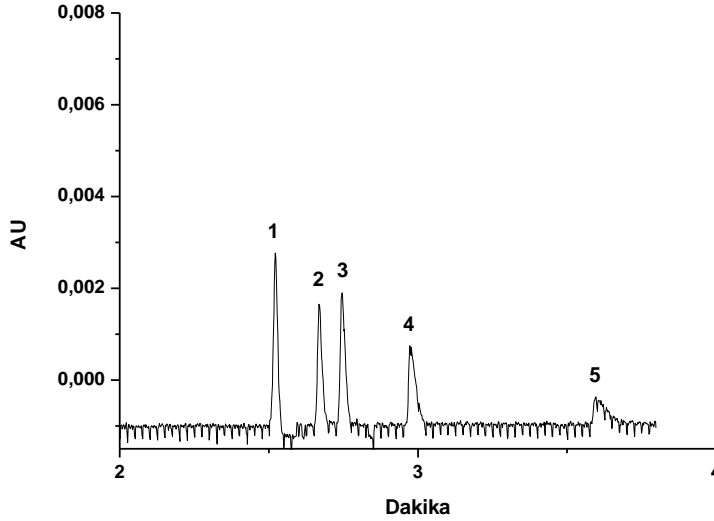


Şekil 5.5: Kontur grafiği

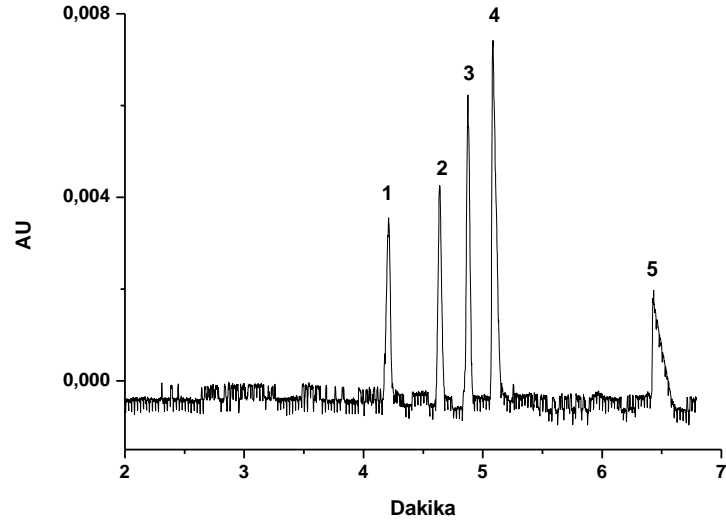
Optimum noktalar, minitab programı ile NaCl konsantrasyonu; 89 mM ve enjeksiyon süresi; 2 dakika olarak bulunmuştur. Bu koşullarda model  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$  ve  $\text{BrO}_3^-$  için sırasıyla 0,003792; 0,0046691; 0,0067317; 0,0077044 ve 0,0011134 pik yüksekleri vermiştir.

Şekil 5.6'daki elektroferogram metanol içermeyen örnekler ve NaCl içermeyen çalışma tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.7'deki elektroferogram optimum şartlarda, yani metanol içeren örnekler ve NaCl içeren tampon çözelti ile elde edilmiştir.

Şekillerden görüldüğü gibi pik yükseklikleri Şekil 5.7'de artmıştır. Örneğe eklenen metanol ve tampona eklenen NaCl ile örnek ve tampon arasında iletkenlik farkı yaratılarak yöntemin hassasiyeti artırılmıştır. Örnekler çeşitli miktarlarda metanol eklenerek denemeler yapılmıştır. Metanol miktarının pik yüksekliği üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Fakat tampona eklenen NaCl miktarı pik yüksekliklerine etki etmektedir. NaCl için optimum konsantrasyon değeri optimizasyon çalışmalarından belirlenmiştir.



**Şekil 5.6:** Tampon: 20 mM TRIS (pH 7,5), enjeksiyon süresi: 2 dakika, enjeksiyon: -5 kV, örnek konsantrasyonları  $10^{-4}$  mM (1:  $\text{Br}^-$ , 2:  $\text{NO}_2^-$ , 3:  $\text{NO}_3^-$ , 4:  $\text{SCN}^-$  ve 5:  $\text{BrO}_3^-$ )



**Şekil 5.7:** Optimum koşullar Tampon: 89 mM NaCl + 20 mM TRIS (pH 7,5), enjeksiyon süresi: 2 dakika, enjeksiyon voltajı: -5 kV, örnek konsantrasyonları; 1:  $10^{-4}$  mM  $\text{NO}_2^-$  2:  $10^{-4}$  mM  $\text{NO}_3^-$ , 3:  $10^{-3}$  mM  $\text{Br}^-$ , 4:  $5 \times 10^{-3}$  mM  $\text{SCN}^-$ , 5:  $10^{-2}$  mM  $\text{BrO}_3^-$  + %50 metanol

## 5.6 Metod Validasyonu

### 5.6.1 Tekrarlanabilirlik değerleri

Tekrarlanabilirliği hesaplayabilmek için inorganik anyonların standartı ardarda yedi kez injekte edilmiştir. %RSD değerleri, pik alanı için 3,51-4,6 arasında, geliş süresi için ise 0,46-0,64 değerleri arasında bulunmuştur.

### 5.5.2 Dedeksiyon Limiti (LOD)

Metot için LOD değeri, gürültünün üç katı sinyal kabul edilerek hesaplanmıştır.  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$   $\text{NO}_3^-$   $\text{SCN}^-$  ve  $\text{BrO}_3^-$  için sırasıyla LOD değerleri 100 nM, 7,81 nM, 5,42 nM, 240 nM, 3,26  $\mu\text{M}$  olarak tayin edilmiştir.

### 5.6.3 Kalibrasyon

Anyonlara ait kalibrasyon denklemleri ve regresyon değerleri izelge 5.7’de görülmektedir.

**Çizelge 5.7:** Kalibrasyon değerleri

<b>Anyonlar</b>	<b>Lineer regresyon denklemi</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Br<sup>-</sup></b>	$y = 0,0355x + 1,657x10^{-4}$	$R^2 = 0,9799$
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	$y = 0,0031x + 1,3698x10^{-4}$	$R^2 = 0,986$
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$y = 0,0031x + 2,4091x10^{-4}$	$R^2 = 0,981$
<b>SCN<sup>-</sup></b>	$y = 0,006x + 3,425x10^{-4}$	$R^2 = 0,9849$
<b>BrO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$y = 0,0067x + 1,2236x10^{-4}$	$R^2 = 0,9954$

## 6. TARTIŞMA VE YORUM

Bu çalışmanın birinci bölümünde EOA'nın kontrolü için PVI kullanılarak basit bir dinamik kaplama metodu geliştirilmiştir. PVI ile kaplamanın oldukça hızlı gerçekleştiği ve kararlı olduğu tespit edilmiştir. PVI kaplama ile EOA bastırılmıştır. EOA hızının pH 3-9 aralığında değişmediği belirlenmiştir. Kaplama farklı tampon çözeltiler ve tuzlardan etkilenmemiştir.

Bu kaplama ile inorganik anyonların analizi için kemometrik yöntem kullanılarak bir örnek sıkıştırma yöntemi geliştirilmiştir. Metodun optimizasyonu merkezi kompozit tasarım kullanılarak sadece 13 deney yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yanıt yüzeyi ile pikler arasında iyi bir rezolüsyon sağlayan optimum elektroforetik şartları belirlenmiştir. Optimum şartlar 89 mM NaCl + 20 mM TRIS (pH=7.5) ve 2 dakika enjeksiyon süresi olarak bulunmuştur.

Böylece inorganik anyonların optimum şartlarda 6,5 dakika gibi kısa bir sürede hızlı bir analizi sağlanmıştır. Geliştirilen örnek sıkıştırma yöntemi ile küçük konsantrasyonlardaki örneklerin analizi gerçekleştirilebilir.

PVI kaplama ayrıca proteinlerin analizinde de kullanılabilir. Bunlardan başka susuz CE, iletkenlik dedektörü ve CE-MS uygulamaları ile de kullanılabilir bir kaplama olarak önerilebilir.



## KAYNAKLAR

- [1] Williams B.A., Vigh G. (1996). Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis, *Anal Chem.*, 1;68(7):1174-80.
- [2] Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın, İ. (2004). Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
- [3] Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A. (1998). Enstrümantal Analitik İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [4] Yao, Li., Liu, Q., Li, Y., Yao, S., (2011). Nonionic surfactant enhanced semipermanent coatings for capillary electrophoresis of inorganic anions without use of organic additives, *Journal of Separation Science*, 34(18), 2441-2447.
- [5] Horvath, J., Dolnik, V. (2001). Polymer wall coatings for capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 22, 644-655.
- [6] Znaleziona, J., Petr, J., Knob, R., Vitězslav, M., Ševčík, J. (2008). Dynamic Coating Agents in CE, *Chromatographia*, 67(1), 5-12.
- [7] Robb, C. S. (2007). Applications of Physically Adsorbed Polymer Coatings in Capillary Electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(5-7), 729-759.
- [8] Kaneta, T., Uedaa, T., Hata, K., Imasaka, T. (2006). Suppression of electroosmotic flow and its application to determination of electrophoretic mobilities in a poly(vinylpyrrolidone)-coated capillary, *Journal of Chromatography*, 1106, 52-55.
- [9] Carter, B., Desai, A., Sharma, A. (2006). Use of poly(vinyl alcohol)-coated capillaries for separation of amino terminated polyamidoamine dendrimers, *Electrophoresis*, 28, 335-340.
- [10] Di Pietro, N., Placanica, G., Fiorini, I., Manera, C., Orlando, C., Palombo, F., Saccomanni, G., Salotti, V., Macchia, M. (2006). Use of capillary electrophoresis and poly(ethylene oxide) as the coating agent for the determination of substances related to heroin addiction and treatment, *J Anal Toxicol*, 30(9), 679-82.
- [11] Nehmé, R., Perrin, C., Cottet, H., Blanchin, M.D., Fabre, H. (2011). Stability of capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and multilayers under various analytical conditions—Application to protein analysis, *Journal of Chromatography*, 1218, 3537-3544.

- [12] **Takayanagi, T., Motomizu, S.** (2006). Chitosan as Cationic Polyelectrolyte for the Modification of Electroosmotic Flow and Its Utilization for the Separation of Inorganic Anions by Capillary Zone Electrophoresis, *Analytical Sciences*, 22, 1241-1244.
- [13] **Spanilá, M., Pazourek, J., Have, J.** (2006). Electroosmotic flow changes due to interactions of background electrolyte counter-ions with polyethyleneimine coating in capillary zone electrophoresis of proteins, *Journal of Separation Science*, 29, 2234-2240.
- [14] **Yao, Y. J., Loh, K. C., Chung, M. C. M., Li, S. F. Y.** (1995). Analysis of recombinant human tumor necrosis factor beta by capillary electrophoresis *Electrophoresis*, 16, 647-653.
- [15] **Chiu, R. W., Jimenez, J. C., Monning, C. A.** (1995). *Analytical Chemistry Acta*, 30, 193-201.
- [16] **Timerbaev, A. R.** (2002). Recent advances and trends in capillary electrophoresis of inorganic ions, *Electrophoresis*, 23, 3884-3906.
- [17] **Chen, Y., Lü, W., Chen, X., Teng, M.** (2012). Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis, *Cent. Eur. J. Chem.*, 10 (3), 611-638.
- [18] **Hanrahan, G., Montes, R., Gomez, F. A.** (2008). Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications, *Anal Bioanal Chem*, 390, 169–179.
- [19] **García-Villar, N., Saurina, J., Hernández-Cassou, S.** (2006). Capillary electrophoresis determination of biogenic amines by field-amplified sample stacking and in-capillary derivatization, *Electrophoresis*, 27, 474–483.
- [20] **Galeano-Díaz, T., Acedo-Valenzuela, M.I., Mora-Díez, N., Silva-Rodríguez, A.** (2005). Response surface methodology in the development of a stacking-sensitive capillary electrophoresis method for the analysis of tricyclic antidepressants in human serum, *Electrophoresis*, 26, 3518–3527.
- [21] **Heiger, D.** (2000). High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction, Agilent Technologies, Germany.
- [22] **Landers J.P.** (1994). Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, USA.
- [23] **Li, S.F.Y.** (1992). Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [24] **Reiter, R.J.** (1991). Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions, *Endocrine Reviews*, 12, 151-180.

- [25] **Gürkök, A. G.** (2007). *Biyolojik Önemi Olan İndol Türevi Bileşiklerin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları Ve Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*, (yüksek lisans tezi), Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [26] **Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T.** (1996). *Capillary Electrophoresis Methods and Potentials*, Vieweg, Germany.
- [27] **Kocatürk, N.** (2002). *İnorganik Anyonların Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Tayininde Yüksek Tuz Etkisinin İncelenmesi ve Deniz Suyunda Bromat Tayini*, (yüksek lisans tezi), İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [28] **Harons V.** (2003). Aspects of optimization of separations of drugs by chemometrics, *Acta Universitatis Upsaliensis*, UPPSALA.
- [29] **Mongomery, D., C.** (2005). *Design and Analysis of Experiments*, 6th Ed. Hoboken, NJ : John Wiley & Son.
- [30] **Brereton R. G.** (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- [31] **Hanrahan Eds. G., Gomez F. A.** (2010). *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- [32] **Hanrahan G., Montes R., and Gomez F.A.** (2008). Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications, *Anal Bioanal Chem* (2008) 390:169–179.
- [33] **Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M.** (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [34] **Otto, M.** (1999) *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Weinheim, New York.
- [35] **Morgan, E.**, (1991). *Chemometrics: Experimental Design*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [36] **Pekel, N., Şahiner, N., Güven, O., Rzaev, Z.M.O.** (2001). Synthesis and characterization of N-vinylimidazole-ethyl methacrylate copolymers and determination of monomer reactivity ratios, *European Polymer Journal*, 37, 2443-2451
- [37] **Tan, J.S., Sochor, A.R.**, (1981). Chain characteristics and counterion binding of poly(N-vinylimidazole) and its protonated and quaternized salts, *Macromolecules*, 14, 1700.
- [38] **Öncül, A., Çoban, K., Sezer, E., Şenkal, B. F.** (2011). Inhibition of the corrosion of stainless steel by poly-N-vinylimidazole and N-vinylimidazole, *Progress in Organic Coatings*, 71, 167-172.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad Soyad:** Sirun Özçelik

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İstanbul, 16.02.1989

**Adres:** Kocamustafapaşa, Fatih/ İstanbul

**E-Posta:** sirun\_8@hotmail.com

**Lisans:** Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya, Haziran 2010

**Yüksek Lisans:** İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya, Haziran 2013

### **Mesleki Deneyim ve Sunumlar:**

Embil İlaç, Kalite Kontrol Departmanı- Laboratuvar Stajı ( Haziran 2008-Temmuz 2008)

Embil İlaç, Üretim Departmanı- İşletme Stajı ( Ağustos 2009-Eylül 2009)

Kromatografi Kongresi, Bursa, Türkiye- Poster Sunumu (19-22 Haziran 2013)