KAPİLER ELEKTROKROMATOGRAFİ İÇİN YENİ MONOLİTİK SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NEW MONOLITHIC STATIONARY PHASES FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

AYŞE ASLIHAN GÖKALTUN

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

AYŞE ASLIHAN GÖKALTUN'un hazırladığı "Kapiler Elektrokromatografi için yeni monolitik sabit fazların sentezi ve karakterizasyonu" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından ''**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'' nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erhan BİŞKİN
Başkan .....

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL
Danışman .....

Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ
Üye .....

Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL
Üye .....

Doç. Dr. Cengiz KOÇUM
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Kıymetli eşime ve canım aileme en derin sevgilerimle..

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede

başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

09/09/2014

AYŞE ASLIHAN GÖKALTUN

ÖZET

KAPİLER ELEKTROKROMATOGRAFİ İÇİN YENİ MONOLİTİK SABİT FAZLARIN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Ayşe Aslıhan GÖKALTUN

Doktora, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Aralık 2014, 227 sayfa

Tez kapsamında, hidrofilik özelliğe sahip, reaktif kloropropil grubu içeren yeni bir monomer, 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl) kullanılarak poliakrilat formunda kapiler monolitlerin blok kopolimerizasyonu ile sentezi yapılmıştır. Monolitler 100 µm iç çapa sahip poliimid kaplı silika kapiler tüpler içerisinde termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Monolitik kolonlar, yapısındaki ‘‘kloropropil’’ grubunun reaktif özelliği kullanılarak tek basamaklı reaksiyonlar ile anyonik (sodium bisülfit, $NaHSO_3$) ve katyonik (polietilenimin, PEI) ligandlar kullanılarak sırasıyla katyon ve anyon değiştirici formlara dönüştürülmüştür. Kolonlar, kapiler elektrokromatografi sisteminde ayırma ortamı olarak kullanılmış ve kolonların ayırma performansları incelenmiştir. Çalışmada kapiler monolitik kolon sentezinde farklı alkil zincir uzunluğuna ve polariteye sahip çapraz bağlayıcılar (gliserol dimetakrilat; GDMA, etilenglikol dimetakrilat; EDMA ve 1,4-bütandiol dimetakrilat; BDDA) kullanılarak, gözenek

yapıcı solvent ve monomer faz bileşimleri değiştirilmiştir. Böylece çapraz bağlayıcı türü, gözenek yapıcı solvent ve monomer faz bileşiminin, poli(HPMA-Cl) bazlı kapiler monolitlerin gözeneklilik ve mobil faz geçirgenlik özelliklerine etkisi tanımlanmıştır. Farklı çapraz bağlayıcılar ile üretilen uygun kapiler monolitler $NaHSO_3$ ile reaksiyona sokularak, sülfonik asit grubu içeren katyon değiştirici sabit fazlar elde edilmiştir. Bu sabit fazlar kapiler elektrokromatografi sisteminde ters faz modunda alkilbenzen ve fenol türevlerinin ayrımında başarıyla kullanılmıştır. Bu ayrımlarda en yüksek teorik tabaka sayısı değeri 210.000 m^{-1} olarak, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler polietilenimin (PEI) ile reaksiyona sokularak, amin grubu içeren anyon değiştirici sabit fazlar elde edilmiştir. Kolonlar kapiler elektrokromatografi sisteminde ters faz modunda alkilbenzen, fenol, çoklu aromatik hidrokarbonlar, nükleosid ve nükleotit türevlerinin ayrımında başarıyla kullanılmış ve bu ayrımlarda en yüksek teorik tabaka sayısı 205.000 m^{-1} olarak elde edilmiştir. Sonuçlar, poliakrilat formunda, yeni bir reaktif kapiler monolit üretildiğini ve bu monolit ile anyon ve katyon değiştirici formlarda yeni elektrokromatografik sabit fazların elde edilebileceğini göstermiştir. Böylece sabit faz sentezi için yaygın olarak kullanılan reaktif yapılar olan poli(klorometilstiren-co-divinilbenzen) ve poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) formlarına yeni bir alternatif geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: kapiler elektrokromatografi (CEC), 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat, reaktif kloropropil grubu, sodyum bisülfit, polietilenimin, ters faz kromatografisi (RPC).

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NEW MONOLITHIC STATIONARY PHASES FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

Ayşe Aslıhan GÖKALTUN

Doctor of Philosophy, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

December 2014, 227 pages

In the scope of this thesis, the synthesis of polymethacrylate based capillary monoliths was performed via block copolymerization by using a new hydrophilic monomer with reactive chloropropyl moiety, 3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate (HPMA-Cl). All monoliths were obtained by thermally initiated free radical polymerization within polyimide coated fused silica capillary tubes with an internal diameter of 100 μm. After synthesis, the monolithic columns were converted into the anion and cation exchanger columns via simple and single stage reactions by utilizing the reactive property of ‘‘chloropropyl’’ moiety against anionic and cationic ligands, respectively. The columns were tried as separation media in capillary electrochromatography and their separation performance was investigated. In the first part of the study, the porogen mixture and the monomer phase compositions were changed by using crosslinking agents with different alkyl

chain lengths and polarities (i.e. glycerol dimethacrylate, GDMA, ethylene dimethacrylate, EDMA and butanediol dimethacrylate, BDDA). Then, the effects of porogen mixture and monomer phase compositions on the permeability and porous properties of poly(HPMA-Cl) based monoliths were evaluated. The appropriate capillary monoliths produced with different crosslinking agents were reacted with sodium bisulfite ($NaHSO_3$) and cation exchanger stationary phases functionalized with sulfonic acid groups were obtained. These stationary phases were successfully used in the electrochromatographic separation of alkylbenzenes and phenols in reversed phase mode. The maximum theoretical plate numbers achieved in these separations was 210.000 plates/m with the poly(HPMA-Cl-co-EDMA) monolith. In the second part of the study, the anion exchanger stationary phases functionalized with amine groups were obtained by reacting poly(HPMA-Cl-co-EDMA) monoliths with polyethylenimine (PEI). These columns were successfully tried in the electrochromatographic separation of alkylbenzenes, phenols, polyaromatic hydrocarbons, nucleosides, nucleotides and the highest theoretical plate counts was achieved as 205.000 plates/m in these separations. The results indicated that a new reactive monolith in the form of polyacrylate was obtained and the synthesis of new electrochromatographic stationary phases could be achieved by using this reactive monolith. Hence, a new alternative to the commonly utilized reactive structures like poly(chloromethylstyrene-co-divinylbenzene) and poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) was developed.

Keywords: capillary electrochromatography (CEC), 3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate, reactive chloropropyl moiety, sodium bisulfite, polyethyleneimine, reversed phase chromatography (RPC).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi birikiminden faydalanma olanağı bulduğum için kendimi daima şanslı saydığım, fikirlerimin biçimlenmesine katkıda bulunup, beni eğitim hayatım boyunca büyük hedeflere yönelten ve bana hep yol gösteren çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e teşekkürün az kalacağını düşünerek en derin minnet ve şükran duygularımı sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca, önerileriyle tezimi destekleyen ve akademik yaşantıma değerli katkılar sağlayan Dr. Bekir Çelebi'ye ve bu süre zarfında karşılaştığım sorunların aşılmasında yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Cemil Aydoğan'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Her zaman sevgisini ve desteğini tüm içtenliğiyle bana sunan ve tez çalışmam boyunca da unutulmaz yardımlarda ve fedakarlıklarda bulunan can dostlarım Çiğdem Kip'e ve Özlem Hamaloğlu'na, zor zamanlarımda verdikleri sevgiyle, destekle ve cesaretle bana yeniden umut kazandıran, stresli, kaygılı, mutlu bir çok anı birlikte yaşadığım ve daima yanımda olduklarını bildiğim can dostlarım Özge Yüksel Orhan'a ve Pınar Kodal'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, gösterdikleri yakın ilgi ve samimi arkadaşlıklarıyla tez çalışmam boyunca destek ve katkılarda bulunan arkadaşlarım, Ebru Sağ'a, İlknur Durukan'a, Gülçin Günal'a, Eda Öğüt'e, Hasan İlhan'a, Duygu Deniz Usta'ya, Kuroş Salimi'ye ve Erhan Şenlik'e çok teşekkür ederim.

Mutluluklarım kadar sıkıntılarımı da paylaşan, en zor zamanlarımı huzura dönüştüren, güler yüzü, cömert kalbi, emsalsiz hoşgörüsü ve anlayışıyla yanımda olan ve kendimi daima şanslı hissettiren kıymetli eşim Selçuk GÖKALTUN'a, bilgelikleriyle ve iyilikleriyle oluşumuma ifade edebileceğimden çok daha fazla katkıda bulunmuş olan, benden onaylarını hiç bir zaman esirgemeyen ve beni hep teşvik ederek yanımda olan CANIM AİLEM'E teşekkürlerimi ve yüreğimdeki en özel sevgiyi gönderiyorum.

A. Aslıhan Gökaltun

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ 1

2. LİTERATÜR ÖZETİ 3

2.1. CEC Sisteminin Tarihsel Gelişimi 3

2.2. Elektroozmoz, Elektriksel Çifte Tabaka ve Elektroozmotik Akış 6

2.3. Elektroozmotik Akışı Etkileyen Faktörler 12

2.3.1. Dolgulu ve Boş Kısımların Katkısı 12

2.3.2. Uygulanan Voltaj 12

2.3.3. Mobil Fazın pH Değeri 14

2.3.4. Dolgu Materyalinin Çapı 14

2.3.5. Dolgu Malzemesine Bağlı Organik Grupların Varlığı 14

2.3.6. Mobil Fazın Kompozisyonu 15

2.4. Kolon Teknolojisi 15

2.4.1. CEC için Kolon Çeşitleri 16

2.4.1.1. Partikül Dolgulu Kolonlar 16

2.4.1.2. Açık-Tübüler Kolonlar (OTC) 19

2.4.1.2.1. Açık Tübüler Kapiler Elektrokromatografi (Open Tubular Capillary Electrochromatography, OT-CEC) 20

2.4.1.2.2. Açık Tübüler Sıvı Kromatografisi (OT-LC) 21

2.4.1.3. Monolitik Kolonlar 21

2.4.2. Monolitik Kolonların Tarihsel Gelişimi 24

2.4.2.1. Monolitik Kolonların Hidrodinamik Özellikleri 25

2.4.2.2. Monolitik Kolonlar ile Kapiler Elektrokromatografi 25

2.4.3. CEC Sisteminde Monolitik Kolonlar 27

2.4.3.1. Monolitik Silika Kolonlar 27

2.4.3.1.1. Monolitik Silika Kolonların Kromatografik Performansları 28

2.4.3.2. Polimer Bazlı Monolitik Kolonlar 30

2.4.3.2.1. Akrilat-Metakrilat Bazlı Polimerik Monolitler 32

2.4.3.2.2. Stiren Bazlı Polimerik Monolitler 35

2.4.3.2.3. Akrilamid Bazlı Polimerik Monolitler 38
2.5.1. Polimerizasyon Sıcaklığının Etkisi..... 41
2.5.2. Gözenek Yapıcı Sistemin Etkisi.....42
2.5.3. Yapı Oluşumu..... 42
2.5.4. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü 43
2.5.5. Fonksiyonel Grupların Bağlanması 44
2.5.5.1. Fonksiyonel Monomerlerin Kopolimerizasyonu..... 44
2.5.5.2. Polimerizasyon Sonrası Fonksiyonel Grupların Bağlanması 45
2.5.5.3. Baskılama Yöntemi 47
2.6. Monolit Özelliklerinin CEC'de Ayırma Üzerine Etkisi..... 47
2.6.1. Gözenek Boyutu ve Verimlilik..... 47
2.6.2. Monolitik Kolon Boyunca Çözelti Akışı 48
2.6.3. Yüzey Kimyasının Kontrolü 49
2.6.3.1. Yüklü Grupların Fonksiyonel Forma Dönüştürülmesi..... 49
2.6.3.2. Alıkonma ve Seçicilik..... 50
2.7. CEC Uygulamaları..... 51
2.7.1. Akiral Analizler..... 51
2.7.2. Kiral Analizler 52

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 53
3.1. CEC Sistemi İçin Geliştirilen Kapiler Monolitik Kolonların Hazırlanması..... 53
3.1.1. Materyal..... 53
3.1.2. Kapiler Tüplerin Monolit Sentezine Uygun Forma Getirilmesi..... 54
3.1.3. Monolit Sentezi..... 56
3.1.4. HPMA-Cl Bazlı Monolitlerin Sodyum Bisülfit ($NaHSO_3$) ve Polietilenimin (PEI) ile fonksiyonelleştirilmesi..... 59
3.2. Monolit Yapısının Karakterizasyonu..... 61
3.2.1. Monolitlerin Mobil Faz Geçirgenliğinin İncelenmesi 61
3.2.2. Kapiler Monolitik Kolonların Karakterizasyonu 62
3.2.3. Kapiler Monolitik Kolonların Elektrokromatografik Performanslarının İncelenmesi 64
3.2.4. Kromatografik Parametrelerin Tayini..... 67
3.2.4.1. Elektroozmotik Mobilite 67

3.2.4.2. Alıkonma Faktörü 67
3.2.4.3. Pik Çözünürlüğü 67
3.2.4.4. Teorik Tabaka Sayısı (N) ve Teorik Tabaka Yüksekliği (h) 68
3.2.4.5. Kolon Geçirgenliği 69
3.2.5. Tekrarlanabilirlik 69
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 71
4.1. Kapiler Monolitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu 72
4.1.1. Gözenek yapıcı solvent bileşiminin etkisi 72
4.1.2. Monomer faz bileşiminin etkisi 80
4.2. Ligand Bağlı Kapiler Monolitlerin Karakterizasyonu 84
4.2.1. Sodyum Bisulfit ($NaHSO_3$) ile Türevlendirilen Kapiler Monolitlerin Karakterizasyonu 84
4.2.2. Polietilenimin (PEI) ile Türevlendirilen Kapiler Monolitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu 94
4.3. $NaHSO_3$ Bağlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının İncelenmesi 98
4.3.1. Sabit Faz Üzerindeki Fonksiyonel Grup Derişiminin Etkisi 99
4.3.2. Mobil faz polaritesinin (ACN derişimi) etkisi 103
4.3.3. Sürücü Gücün Etkisi 120
4.3.4. Anyonik Polimer Bazlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının Literatür Çalışmaları ile Kıyaslanması 134
4.3.5. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları 135
4.4. PEI Bağlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının İncelenmesi 137
4.4.1. Sabit Faz Üzerindeki Fonksiyonel Grup Derişiminin Etkisi 137
4.4.2. Mobil Faz Polaritesinin (ACN derişimi) Etkisi 140
4.4.3. Sürücü Gücün Etkisi 174
4.4.4. Katyonik Polimer Bazlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının Literatür Çalışmaları ile Kıyaslanması 198
4.4.5. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları 199
5. SONUÇLAR 201
KAYNAKLAR 203
ÖZGEÇMİŞ 225

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Farklı iyonik güce sahip çözeltilerinin elektriksel çifte tabaka kalınlığı.. 8

Çizelge 3.1. Farklı monomer ve İso-PrOH ve Dec-OH derişimleri ile hazırlanan metakrilat bazlı monolitlerin sentez koşulları 57

Çizelge 4.1. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri.....76

Çizelge 4.2. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 76

Çizelge 4.3. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 76

Çizelge 4.4. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 82

Çizelge 4.5. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 85

Çizelge 4.6. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 86

Çizelge 4.7. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik

değerleri 86

Çizelge 4.8. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı monolitlerin ligand içeriği 92

Çizelge 4.9. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 93

Çizelge 4.10. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri 95

Çizelge 4.11. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı monolitlerin ligand içerikleri..... 98

Çizelge 4.12. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen sülfonik asit bağlı monolitlerin ligand içeriği 100

Çizelge 4.13. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri. 105

Çizelge 4.14. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri. 105

Çizelge 4.15. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri. 106

Çizelge 4.16. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mM pH7

fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 114

Çizelge 4.17. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenolllerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 114

Çizelge 4.18. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, fenolleriin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mMpH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 115

Çizelge 4.19. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 123

Çizelge 4.20. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 123

Çizelge 4.21. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 124

Çizelge 4.22. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 130

Çizelge 4.23. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 130

Çizelge 4.24. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde

edilen pik çözünürlük değerleri 131

Çizelge 4.25. Anyonik polimer bazlı monolitlerin kromatografik performanslarının literatür çalışmaları ile kıyaslanması 134

Çizelge 4.26. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen monolitik kolonların analizden analize ve kolondan kolona elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri 136

Çizelge 4.27. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzen türevlerinin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri. 143

Çizelge 4.28. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenol karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 150

Çizelge 4.29. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, PAH karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 157

Çizelge 4.30. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, nükleotid/nükleosid karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri. 165

Çizelge 4.31. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, nükleosid karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri.. 172

Çizelge 4.32. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzen türevlerinin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 177

Çizelge 4.33. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri 182

Çizelge 4.34. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak PAH ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri 187

Çizelge 4.35. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak nükleotid-nükleosid karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri 192

Çizelge 4.36. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak nükleosid karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri 196

Çizelge 4.37. Katyonik polimer bazlı monolitlerin kromatografik performanslarının literatür çalışmaları ile kıyaslanması 198

Çizelge 4.38. PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak analizden analize ve kolondan kolona elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri 200

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Farklı partikül çapına sahip kolonlarda sürücü güç olarak basınç ve elektriksel kuvvet uygulandığında elde edilen teorik tabaka yüksekliklerinin karşılaştırılması.....4

Şekil 2.2. CEC sisteminde flutikazon propiyonat (1) ve ona bağlı safsızlıkların (2-5) ayrımı sonucu elde edilen kromatografik analiz sonuçları..... 5

Şekil 2.3. Silika kapiler kolon yüzeyinin yakınında oluşan elektriksel çifte tabakanın gösterimi.....6

Şekil 2.4. Kapiler kolon boyunca yük dağılımı ve zeta potansiyelin değişimi.....8

Şekil 2.5. Kapiler kolon içerisinde anyonik, katyonik ve nötral analitlerin EOF ile hareketi..... 9

Şekil 2.6. Kapiler elektrokromatografi sisteminde farklı yüklere sahip analitlerin hareketi.....10

Şekil 2.7. (A) HPLC ve (B) CEC sistemlerinde elde edilen akış profilleri ve analit pikleri.....11

Şekil 2.8. Farklı partikül çapına sahip CEC kolonlarında uygulanan voltajın lineer hız üzerindeki etkisi, 5 (Δ), 3 (o), 10 (+) μm partikül çapı (8 nm gözenek boyutu).13

Şekil 2.9. (A) Gözenekli silika mikropartiküllerin TEM görüntüsü, (B) poly(GMA-co DVB) polimerik partiküllerin SEM görüntüsü.....……18

Şekil 2.10. N-N-dimetildodesilamin ile türevlendirilmiş poli(VBC-co-DVB) katyonik açık tübüler kolonun (A) yüksek büyütme ile yüzeyi ve (B) kesit alanının SEM görüntüleri.....20

Şekil 2.11. Sol-jel yöntemi ile elde edilen silika açık tübüler kapiler kolonun SEM görüntüleri 21

Şekil 2.12. Partiküller ile dolgulu kolonları ve monolitik kolonların temsili resimleri. (A) Büyük partiküllerle doldurulmuş kolon, (B) Küçük partiküllerle doldurulmuş kolon, (C) Monolitik kolon. 22

Şekil 2.13. 100 µm çaplı kapiler kolon içerisinde hazırlanmış silika bazlı monolitin SEM fotoğrafı.....29

Şekil 2.14. Ters faz kromatografisinde pik sayısının akış hızına karşı grafiği Sistem: Agilent HPLC 1100, Mobil faz: (A) H_20 + % 0.1 TFA (B) ACN + % 0.1 TFA. 0. dk % 95 (A)- % 5 (B), 20.dk % 50 (A)- %50 (B), 22.dk %0 (A)-%100 (B) ……..29

Şekil 2.15. MPTMS sol-jel silika monolit ile nötral bileşiklerin ayrımda elde edilen elektrokromatogram . Deneysel koşullar: HP^{3D} CE sistemi, etkin uzunluk: 22.5 cm, toplam uzunluk: 31 cm, mobil faz: asetonitril/ 2.5 mM amonyum asetat tamponu (50/50 v/v), uygulanan voltaj: 25 kV, elektrokinetik enjeksiyon: 5 kV 1 s, dalga boyu: 214 nm Elüsyon sırası: (1) tiyoüre (2) dimetilfitalat (3) anisol (4) naftalin 30

Şekil 2.16. Polimer bazlı CEC monolitik kolonunun hazırlanma prosedürünün blok diagram ile gösterimi.....32

Şekil 2.17. Metakrilat bazlı monolitin SEM görüntüsü……33

Şekil 2.18. (A) Monomerin radikal varlığında polimerleşme sürecinin başlaması ve zincirin büyümesi A: Terminal grup (B) Etilen dimetakrilatın çapraz bağlanma prosedürü.....34

Şekil 2.19. Alkilbenzen türevlerinin ayrımı. Mobil faz: % 80 ACN- % 20 tampon, pH 7, UV dedektör: 215 nm, Uygulanan voltaj: 25 kV, Enjeksiyon: 5 kV 3s, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Pik sırası: (1) tiyoüre, (2) benzil alkol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen.....35

Şekil 2.20. Asidik ve bazik peptitlerin ayrımını gösteren elektrokromatogram. Kolon: 31 cm (21 cm etkin uzunluk) x 75 μm iç çap, Mobil faz: 50 mmol/L sodium klorür içeren ACN/5 mM fosfat tamponu pH 3 (25/75 v/v), Elektrokinetik enjeksiyon: 5 kV 2s, Pikler: (1) angiotensin II, (2) angiotensin I, (3) [Sar^1 Ala^8] – angiotensin II, (4) insülin.....36

Şekil 2.21. Stirenin basamaklı zincir polimerizasyonu, (B) Stiren ile divinilbenzenin çapraz bağlanması.....37

Şekil 2.22. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminde poli(sitiren-co-divilbenzen) polimerik monolit ile 16 proteinin ayrımı Sıcaklık: 80 ^oC, UV 214 nm, monolitik kolon 60-0.20 μm ID, Mobil faz: (A) %15 ACN % 0.20 TFA (B) % 60 ACN % 0.20 TFA lineer gradient 15. dk % 23-% 98 Akış hızı: 3.2 µl/dk……. 38

Şekil 2.23. Alkil fenonların izokrotik koşullarda ayrılması. Kolon: Akrilik asitle derivatize edilmiş poli(akrilamid)-poli(etilen glikol). Etkin kolon uzunluğu: 20.5 cm, Enjeksiyon: 0.5 kV 1 s, UV 260 nm, Uygulanan voltaj: 22.5 kV, Mobil faz: % 20 ACN-% 80 10 mM Tris, 15 mM borik asit tamponu, pH 8.2, Pik sırası: (1) vitamin B, (2) anilin, (3) asetofenon, (4) propiofenon, (5) bütirofenon (6) dihidroksiaseto-fenon, (7) dihidroksipropiofenon.....39

Şekil 2.24. (A) Persülfat radikallerinin oluşumu (B) Akrilamidin polimerizasyonu (C) Akrilamid ile N,N metilenbis(akrilamid)'in çapraz bağlanması……...40

Şekil 2.25. Monolilit yapının şematik olarak gösterimi ve d_p, ε_z, ε_p'nin fiziksel anlamı….....41

Şekil 2.26. Polimerizasyon sonrasında monolitlerin fonsiyonelleştirilmesi için sıklıkla kullanılan reaktifler 46

Şekil 2.27. Farklı gözenek boyutlarına sahip monolitik kolonların SEM fotoğrafları..... 48

Şekil 2.28. Gözenek boyutunun kolon boyunca mobil faz akış hızı üzerine etkisi 49

Şekil 2.29. Polimer bazlı monolitik kapilerlerde AMPS derişimi ve gözenek çapının elektrokromatografik performans üzerine etkisi. Kolon: 100 μm iç çap x 30 cm etkin uzunluk.....50

Şekil 3.1. Silika duvardaki hidroksil ve trimetoksisilil grupları arasında gerçekleşen reaksiyon.....55

Şekil 3.2. Monolit sentezinde kullanılan (A) HPMA-Cl monomerinin ve (B) GDMA (C) EDMA (D) BDDA çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları……...56

Şekil 3.3. HPMA-Cl bazlı monolitlerin (A) $NaHSO_3$ ve (B) PEI ile bağlanma reaksiyonu.....60

Şekil 3.4. Monolitlerin mobil faz geçirgenliğinin incelenmesi için kullanılan Ultimate 3000 Nano-LC sistemi.....61

Şekil 3.5. Kapiler monolitlerin karakterizasyonunda kullanılan (A) Quanta 200 FEG SEM, (B) Quantachrome Nova 2200 BET, (C) Perkin Elmer 2400 elementel analiz cihazları.....63

Şekil 3.6. Elektrokromatografik analizlerin yapıldığı PRINCE CEC-760 sistemi… 64

Şekil 3.7. Kromatografik ayrımda kullanılan analit grupları: (A) Alkilbenzen türevleri, (B) Fenol türevleri, (C) Çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve (D) nükleosid ve nükleotit karışımı (E) nükleosidlerin kimyasal yapıları……..66

Şekil 3.8. Kromatografik analiz sonucu elde edilen ardışık iki pik için çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan parametrelerin gösterimi……..68

Şekil 4.1. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 25.0, (B) 31.25, (C) 50.0. HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000……73

Şekil 4.2. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 37.5, (B) 50.0, (C) 62.5, HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.....74

Şekil 4.3. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 37.5, (B) 43.75, (C) 56.25, HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.....75

Şekil 4.4. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....78

Şekil 4.5. İso-PrOH derişiminin (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınçları üzerindeki etkisi. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Akış hızı: 3 μl/dk, HPMA-Cl derişimi (% v/v): 10. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap..... 79

Şekil 4.6. Farklı monomer oranları ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. % 30, % 40, % 50 HPMA-Cl (v/v) derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 55, % 60 HPMA-Cl derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 30, Monomer karışımı içerisindeki HPMA-Cl derişimi (% hacim): (A) 30.0, (B) 40.00, (C) 50.0, (D) 60.00, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.....81

Şekil 4.7. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap..... 83

Şekil 4.8. Monomer derişiminin poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınçları üzerindeki etkisi. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Akış hızı: 15 μl/dk, Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....84

Şekil 4.9 Sülfonik asit ile türevlendirilen farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA) (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), monolitler ile elde edilen geri basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....88

Şekil 4.10. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen HPMA-Cl monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin pH ile değişimi..... 90

Şekil 4.11. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA), ve poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin ACN derişimi ile değişimi.....90

Şekil 4.12. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap..... 94

Şekil 4.13. PEI ile türevlendirilen farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin geri basınç akış hızı grafikleri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 2.5 tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 μm iç çap. 96

Şekil 4.14. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin pH ile değişimi..... 97

Şekil 4.15. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerinin ACN derişimi ile değişimi.....97

Şekil 4.16. Farklı HPMA-Cl derişimleri (% hacim): (A) 5, (B) 10, (C) 20 ile elde edilerek $NaHSO_3$ ile sülfolanma işlemi uygulanan ve (D) % 10 HPMA-Cl derişimi ile hazırlanmış, fakat sülfolanma işlemi uygulanmamış poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar ile elde edilen elektrokromatogramlar. İso-PrOH derişimi: % 50 v/v, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 50/50, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen……..102

Şekil 4.17. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit kullanılarak farklı ACN/5mM pH 7 tamponu oranları kullanılarak elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektro-

kromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen (9) pentilbenzen…… 104

Şekil 4.18. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....107

Şekil 4.19. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap..... 109

Şekil 4.20. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....110

Şekil 4.21. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı HPMA-Cl bazlı monolitlerde (A) teorik tabaka sayısının (B) tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre..... 111

Şekil 4.22. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 7 tampon oranları kullanılarak elde edilen fenol karışımına ait elektro-kromatogramlar. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20

kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol..... 113

Şekil 4.23. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....116

Şekil 4.24. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....118

Şekil 4.25. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap.....119

Şekil 4.26. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonları kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen…….....122

Şekil 4.27. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkilbenzen karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap..... 125

Şekil 4.28. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkilbenzen karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.....126

Şekil 4.29. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı HPMA-Cl bazlı monolitlerde (A) teorik tabaka sayısının (B) tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. Analit: tiyoüre..... 127

Şekil 4.30. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. Mobil faz: (A) 35/65 (B) 30/70 (C) 20/80 ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.....129

Şekil 4.31. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 35/65, (B) 30/70, (C) 20/80, Uygulanan voltaj: değişken, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol..... 132

Şekil 4.32. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 35/65 (B) 30/70 (C) 20/80, Uygulanan voltaj: değişken, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol..... 133

Şekil 4.33. Farklı HPMA-Cl derişimleri (% hacim): (A) 30, (B) 40, (C) 50, (D) 60 ile sentezlenen ve PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, Uygulanan voltaj: -20 kV, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (5) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen..... 139

Şekil 4.34. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/5mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.....141

Şekil 4.35. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap. 144

Şekil 4.36. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 146

Şekil 4.37. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 147

Şekil 4.38. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 fosfat tampon oranları kullanılarak elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol..... 149

Şekil 4.39. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 152

Şekil 4.40. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 153

Şekil 4.41. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 154

Şekil 4.42. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/5mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren..... 156

Şekil 4.43. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 159

Şekil 4.44. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 161

Şekil 4.45. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 162

Şekil 4.46. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin...164

Şekil 4.47. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleotid ve nükleosid karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 166

Şekil 4.48. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid-nükleotit karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....168

Şekil 4.49. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid-nükleotit karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap. 169

Şekil 4.50. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 tampon oranlarında elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/pH 2.5 tampon oranı (mL/mL): (A) 20/80, (B) 25/75, (C) 30/70. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B)

60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.....171

Şekil 4.51. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....172

Şekil 4.52. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının (A) teorik tabaka sayısı (B) tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....173

Şekil 4.53. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65 Enjeksiyon koşulları: -10 kV 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.....176

Şekil 4.54. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....178

Şekil 4.55. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 179

Şekil 4.56. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.....181

Şekil 4.57. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....183

Şekil 4.58. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....184

Şekil 4.59. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren.....186

Şekil 4.60. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 188

Şekil 4.61. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 189

Şekil 4.62. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleosid-nükleotit karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin..... 191

Şekil 4.63. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleotid-nükleosid karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 193

Şekil 4.64. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleotid-nükleosid karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap..... 194

Şekil 4.65. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.....195

Şekil 4.66. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının (A) teorik tabaka sayısı (B) tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.....197

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔP	Basınç düşmesi
μEOF	Elektroozmotik mobilite
δ	Elektriksel Çifte Tabaka Kalınlığı
r	Kolon iç çapı
d_p	Partikül çapı
E	Elektrik alan kuvveti
ε_0	Elektriksel geçirgenlik
ε_r	Elektrolit çözeltisinin dielektrik sabiti
ε_t	Toplam gözeneklilik
ε_z	Boşluk hacim kesri
η	Mobil faz vizkositesi
h	Teorik tabaka yüksekliği
I	Elektrolit çözeltisinin iyonik gücü
k	Alıkonma faktörü
L_e	Kolon uzunluğu
L_t	Kolon toplam uzunluğu
N	Teorik tabaka sayısı
σ	Özgül yüzey alanı
υEOF	Elektroozmotik akış hızı
R	Pik çözünürlüğü
R*	Gaz sabiti
V	Voltaj
ζ	Zeta potansiyeli
ρ_{app}	Görünen yoğunluk
σ	Yüzeydeki yük miktarı
T	Sıcaklık
t_r	Herhangi bir bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süre

t_m	Elektroforetik hıza bağlı olan göç süresi
t_o	Referans bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süre
t_{eof}	EOF'in etkisi ile hareket eden analitin kolon içerisinde geçirdiği süre
L	Kolon uzunluğu
w	Pik taban genişliği
$w_{1/2}$	Pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini
F_M	Hareketli fazın akış hızı
RT_i	i nolu alıkonma süresi
RT_n	Ortalama alıkonma süresi
N_i	Analiz sayısı

Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
AETA	2-[(Akriloksi)]etiltirimetilamonyum metil sülfat
AIBN	2,2'-Azobisizobutironitril
AMPS	2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit
BDDA	1,4-Bütandiol dimetakrilat
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BMA	Bütil metakrilat
BSS	Bağıl standart sapma
CE	Kapiler Elektroforez
CEC	Kapiler Elektrokromatografi
Dec-OH	Dekanol
DMAEMA	2-(N,N-dimetilamino)etil metakrilat
DVB	Divinilbenzen
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
GC	Gaz Kromatografisi
GMA	Glisidil metakrilat
GDMA	Gliserol dimetakrilat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPMA-Cl	3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat

ISEC	Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi
İso-PrOH	İsopronanol
K_o	Geçirgenlik
μ-LC	Mikro sıvı kromatografisi
Nano-LC	Nano sıvı Kromatografisi
$NaHSO_3$	Sodyum bisülfit
NAPM	2-naftil metakrilat
NaOH	Sodyum hidroksit
ODA	Oktadesil akrilat
OMA	Oktadesil metakrilat
OTC	Açık tübüler kolonlar
OT-LC	Açık tübüler sıvı kromatografisi
OT-CEC	Açık tübüler kapiler elektrokromatografi
ÖYA	Özgül yüzey alanı
PAH	Çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar
PDA	1,4-fenilen diakrilat
PEDAS	Pentaeritrol diakrilat
PEI	Polietilenimin
PETA	Pentaeritrol triakrilat
SD	Standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPMA	3-sülfopropil metakrilat
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TFEM	Trifloro etilmetakrilat
THF	Tetrahidrofuran
TMSPM	3-trimetoksisililpropil metakrilat
TRIM	Trimetilolpropantrimetakrilat
UV	Ultraviole

1. GİRİŞ

Kapiler elektrokromatografi (Capillary Electrochromatography, CEC), hareketli fazı ve analitleri bir kolon içerisinde hareket ettirmek için elektrik alanını sürücü kuvvet olarak kullanan bir mikrokolon ayırma tekniğidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) seçiciliğini ve kapiler elektroforez (Capillary Electrophoresis, CE) sisteminin yüksek ayırma verimini birleştiren bir teknolojidir. Etkin ve seçici ayırma kapasitesine sahip olan bu birleşik teknik son yıllarda yaygın kullanımı ile büyük önem kazanmıştır. CEC sisteminde, mobil faz akışı HPLC sistemindeki gibi basınç uygulanarak değil, kolon boyunca elektriksel alan uygulanarak sağlanmaktadır. Dolayısıyla CEC ile CE'de yığın akışı sağlayan sürücü kuvvet elektroforetik mobilitedir. Ancak CEC sisteminde analitlerin ayrımı CE'de olduğu gibi yalnızca elektroforetik mobiliteye bağlı değildir. Ayrım sırasında analitlerin hareketli faz ve sabit faz arasındaki etkileşimi de önem taşımaktadır [1,2].

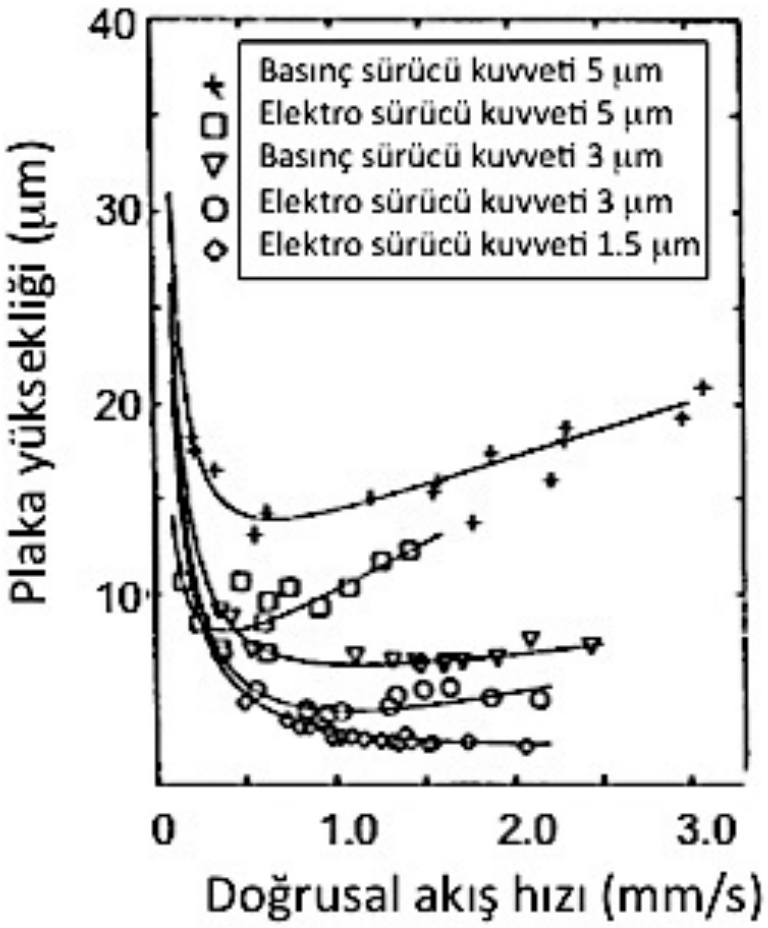
Literatürde CEC sistemindeki kromatografik uygulamalarda akrilat-metakrilat bazlı [3-5], akrilamid bazlı [6] ve stiren bazlı [7] olmak üzere üç farklı tipte organik polimer bazlı monolitik yapılar kullanılmaktadır. Bu sabit fazlar arasında çalışmalar genellikle akrilat [8-11] ve metakrilat [12,13] bazlı monolitik kolonlara odaklanmıştır. Çünkü elde edilen polimerik yapılar geniş pH aralığında, yüksek kimyasal kararlılığa ve mükemmel mekanik dayanıma sahiptirler [14-15]. Akrilat/metakrilat bazlı monolitlerin sentezinde en sık kullanılan çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilattır (EDMA) [16]. Ancak nötral ve yüklü analitlerin ayrımı için stearil akrilat ve naftil metakrilat bazlı monolitik kolonlar ile yüksek ayırma verimi ve uygun alıkonma zamanlarına ulaşabilmek amacıyla daha uzun alkil zincirine sahip çapraz bağlayıcılarla da çalışmalar yapılmıştır [17-20]. Farklı fonksiyonel gruplara sahip (bütil, lauril, oktadesil ve isobornil) poliakrilat bazlı kapiler monolitlerin sentez koşullarının kromatografik performans üzerine etkisi Buszewski and Szumski tarafından çalışılmıştır [22]. Farklı alkil zincir uzunluklarına sahip metakrilat ester monomerlerin sentezi de başka bir çalışma grubu tarafından araştırılmıştır [22].

Kapiler elektrokromatografi sisteminde kromatografik ayırma verimini artırmak amacıyla gözenek yapıcı solvent etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır [23]. Nötral monomer, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve hidroksil gruplu polar çapraz bağlayıcı, pentaeritrol triakrilat (PETA), siklohekzanol ve dodekanolden oluşan gözenek yapıcı sistem varlığında kopolimerize edilerek monolitik sabit fazlar sentezlenmiştir [24]. Bir başka çalışmada, polimerizasyon karışımında farklı oranlarda 1,4 bütandiol ve 1-propanol gözenek yapıcı solvent kullanılarak akrilat ester bazlı monolitik kolonlar hazırlanmış ve bitkisel yağlarda bulunan gliserin türevlerinin ayrımı çalışılmıştır [25]. Son zamanlarda, CEC sisteminde hidrofilik ve iyon-değişim kromatografisi için farklı türde polimer bazlı monolitler geliştirilmiştir [26-28]. Glisidil metakrilat (GMA) bazlı polimerik sabit fazlar CEC uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [29-32]. GMA birimlerindeki epoksipropil grubu birçok kromatografik ligandın sabit faz üzerine basit tek basamaklı reaksiyonlar ile kovalent bağlanmasını sağlamaktadır [29-32]. Tez çalışmasında GMA'ya alternatif yeni bir reaktif yapı önerilmiştir. Bu amaçla, kapiler monolitik kolon sentezi için 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl) monomeri seçilmiş ve elde edilen monolitik sabit fazlar ''kloropropil'' grubunun reaktif özelliği kullanılarak basit ve tek basamaklı reaksiyonlar ile -GMA bazlı sabit fazlar gibi- farklı kromatografik ligandları içeren formlara kolayca dönüştürülmüştür. Polimerizasyon gözenek yapıcı solvent olarak kullanılan isopropanol/dekanol (İso-PrOH/Dec-OH) varlığında gerçekleştirilmiştir. Sentez sonrası elde edilen kapiler monolitik kolonlar, sırasıyla sodyum bisülfit ve polietilenimin ile etkileştirilerek yüzeyde anyonik sülfonik asit grupları ve katyonik kuaterner amonyum gruplarının oluşumu sağlanmıştır. Anyonik ligand bağlı monolitik kolonlar ile farklı zincir uzunluğu ve polariteye sahip çapraz bağlayıcılar ve farklı gözenek yapıcı solvent bileşimleri kullanılarak, polarite değişiminin ve gözenek yapıcı solvent oranının elektrokromatografik performans üzerine etkisi araştırılmıştır. Katyonik ligand bağlı monolitik kolonlar, HPMA-Cl derişimi değiştirilerek farklı reaktif kloropropil içeriklerine sahip olacak şekilde sentezlenmiş ve böylece farklı ligand içeriğine sahip kolonların kromatografik ayrım davranışı incelenmiştir. Özetle tez çalışması ile CEC için hem anyonik, hem de katyonik formda sabit faz sentezine imkan veren yeni bir "kimyasal yöntem" üretilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

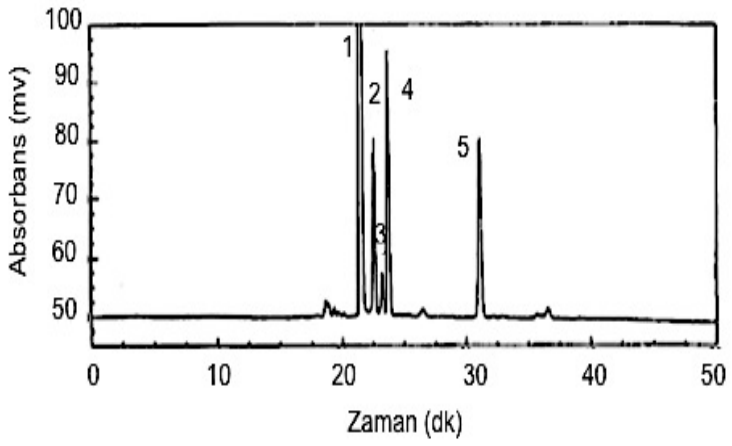
2.1. CEC Sisteminin Tarihsel Gelişimi

CE ve HPLC'nin bir birleşimi olan CEC sisteminde elektroozmotik akış'ın (electroosmotic flow, EOF) kullanılabilirliği ilk olarak 1939 yılında Stain tarafından boya maddelerinin ayrımı yapılarak gösterilmiştir [33]. Strain çalışmasında adsorpsiyon kromatografisi tekniği ile alümina kolona elektriksel alan uygulayarak elektriksel kuvvet (elektroozmoz) sayesinde analitlerin hareket edebileceklerini göstermiştir [33]. 1954 yılında, Mould ve Syinge kolloid membran üzerinde elektriksel kuvvet ile hareket eden bazı polisakkaritlerin bazı polisakkaritleri ayırma çalışmasında ilk defa EOF oluştuğunu gözlemlemiştir [34]. Farklı geometrilerilere sahip kolonlar üretilerek protein analizleri yapılmıştır [35,36]. Bu çalışmalardan yaklaşık 20 yıl sonra Pretorius ve arkadaşları, elektriksel ve hidrodinamik kuvvetlerin birlikte kullanılması yerine alternatif olarak sadece EOF kullanarak mobil faz akışının gerçekleştiğini fark etmiş ve CEC için büyük bir adım atılmasını sağlamışlardır [37]. 1981 yılında Jorgensen ve Lukacs, CEC'in yüksek verimliliğini, 10 µm boyutlu silika partikül dolgulu, 170 µm'lik iç çap değerine sahip kapiler kolonda göstermiş ve elektroozmoz sayesinde verimliliğinin arttığı görüşünü ortaya atmıştır [38]. Tsuda, CEC sisteminde açık tübüler kolonlarında kullanımının mümkün olduğunu göstermiş ve EOF'u olumsuz etkileyen koşullar üzerinde çalışmıştır. 1987 ve 1991 tarihleri arasında EOF'u etkileyen parametreler üzerinde yapılan ayrıntılı çalışmalarda, Knox ve Grant, 1.5 µm'den düşük partikül boyutu ile çalışarak, 30-200 µm iç çap aralığında ve 1 m uzunluğunda kolonlar kullanarak teorik tabaka yüksekliğini düşürmeyi başarmışlardır [39]. Sürücü güç olarak önce basınç sonra da elektriksel kuvvet kullanılarak elde edilen kromatografik analiz sonuçlarına göre çizilen Van-Deemter grafiği Şekil 2.1.'de verilmiştir. Grafik sonuçlarına göre elektriksel kuvvet uygulandığında kolonun teorik tabaka yüksekliğinin düştüğü, yani kolon verimliliğinin arttığı ortaya çıkmıştır [39].



Şekil 2.1. Farklı partikül çapına sahip kolonlarda sürücü güç olarak basınç ve elektriksel kuvvet uygulandığında elde edilen teorik tabaka yüksekliklerinin karşılaştırılması [39].

Smith ve Evan, 1994 yılında, ilaç endüstrisine yönelik karışımların CEC sisteminde ayrılmasına yönelik çalışmalar yapmıştır. C18 sabit fazı kullanılarak yüksek çözünürlüğe sahip pikler elde edilmiştir. Kromatografik analiz sonuçları Şekil 2. 2.'de verilmiştir [40]. Aynı çalışma grubu, ilaçların ayrımı için dar piklerin elde edildiği güçlü katyon değiştirici sabit fazlar ile de çalışmıştır [41]. CEC'in tarihsel gelişimindeki dönüm noktaları Çizelge 2.1.'de verilmiştir. CEC 1990'lı yıllardan itibaren yüksek verimliliği ve eşsiz seçiciliği ile yeni bir sıvı-faz ayırma tekniği olarak literatürde gelişimini sürdürmüştür [42-45].



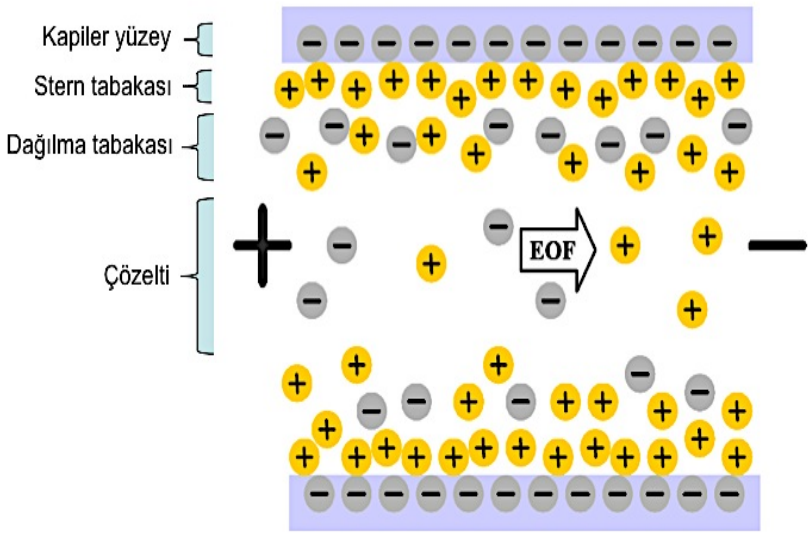
Şekil 2.2. CEC sisteminde flutikazon propiyonat (1) ve ona bağlı safsızlıkların (2-5) ayrımı sonucu elde edilen kromatografik analiz sonuçları [40].

Çizelge 2.1. CEC'in tarihsel gelişimindeki dönüm noktaları

Olay	Tarih	Referans
EOF'in kromatografik sistemlerde kullanılabileceği ortaya çıktı.	1939	[33]
EOF uygulanarak kolloidal membran boyunca polisakkaritlerin ayrımı gerçekleştirildi.	1954	[34]
Kolon kromatografisinde EOF kullanıldı.	1974	[37]
Kapiler kolonda gerçekleşen elektroozmozun tanımı yapıldı.	1981	[38]
CEC sisteminde açık tübüler kolonlar kullanıldı.	1987	[39]
CEC sisteminin teorisi ve tekniği geliştirildi.	1987,1991	[40]
CEC sisteminin ilaç sanayisinde kullanımına başlandı.	1994	[41]

2.2. Elektroozmoz, Elektriksel Çifte Tabaka ve Elektroozmotik Akış

CEC'de kullanılan kapiler kolonlar sabit faz ile dolgulanmıştır. Kapiler duvar ve sabit fazın her ikisi de yüklü haldedir. Elektroozmoz, yüzeyi yüklü olan sabit faz ile etkileşim halindeki hareketli fazın uygulanan elektrik alanı altında hareket etmesi esasına dayanır. Silika kolon içerisinde, yüzeyde bulunan silanol gruplarının iyonlaşmasıyla negatif yüklenen yüzey, mobil faz içerisinde yakınında bulunan iyonların çözeltideki dağılımını etkiler. Aynı yüklü iyonlar negatif yüklü yüzey tarafından itilirken, farklı yüklü iyonlar yüzeyde yük dengesinin korunabilmesi için yüzeye doğru çekilirler [39]. Bunun sonucunda sabit faz ve mobil faz arasında oluşan elektrik yüklü elektriksel çifte tabaka oluşur, bu oluşum Şekil 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Silika kapiler kolon yüzeyinin yakınında oluşan elektriksel çifte tabakanın gösterimi [46].

Elektriksel çifte tabaka, sıkı ve dağınık olmak üzere iki kısma sahiptir. pH 3.5 değerinin üzerinde, silika kapiler yüzeyinde silanol grupları, negatif yüklü silanat gruplarına dönüşür ve mobil faz içerisindeki pozitif yüklü iyonları çekerek ''Stern tabakası'' adı verilen sıkı ve hareketsiz bölgeyi oluştururlar. Elektrolit çözeltisi içerisinde bulunan pozitif iyonların çoğu (fazla yükler) ikinci bir dağılma tabakasında bulunur. Sıkı olmayan bu dağınık bölgeye ise "Gouy Tabakası

(Dağılma tabakası)" adı verilir (Şekil 2.3.). Negatif yüklü kapiler kolon duvarındaki yük konsantrasyonu, dolgu malzemesinin yüzeyinden uzaklaştıkça düşer ve yüklerin difüzlendiği dağınık bölgede üstel biçimde azalarak sıfıra yaklaşır. Yük yoğunluğu ile doğru orantılı olan elektriksel potansiyelde de azalma meydana gelir. Şekil 2.4.'de, kapiler kolon boyunca yük dağılımı ve potansiyelin değişimi verilmiştir. Stern tabakası ve elektriksel çifte tabakanın dağılmış kısmı arasındaki sınırda bulunan elektrik potansiyeline "Zeta Potansiyeli, ζ, denir. Zeta potansiyeli, 0 ve 100 mV arasında bir değere sahiptir ve Eşitlik 2.1. ile hesaplanır. Büyüklüğü; elektriksel çifte tabakanın kalınlığına, δ, ve yüzeydeki yük miktarına, σ, göre değişim gösterir.

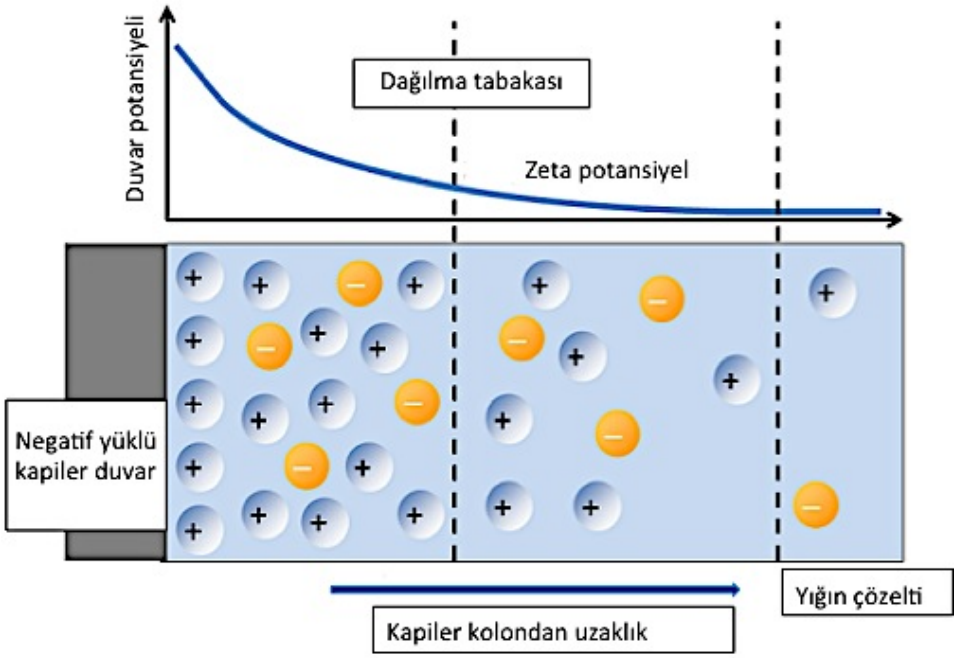
$$Zeta\ potansiyeli,\ \zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \qquad (2.1.)$$

Burada ε_0, elektriksel geçirgenliği ve ε_r, elektrolit çözeltisinin dielektrik sabitini göstermektedir. Elektriksel çifte tabaka kalınlığı ise elektriksel geçirgenlik (ε_r) ve elektrolit çözeltisinin iyonik gücüne, I, bağlıdır ve Eşitlik 2.2. ile hesaplanır.

$$Elektriksel\ çifte\ tabaka\ kalınlığı,\ \delta = \left(\frac{\varepsilon_0\varepsilon_r R^* T}{2F^2 I}\right)^{0.5} \qquad (2.2.)$$

Bu eşitlikte, F, R* ve T sırasıyla Faraday sabiti, gaz sabiti ve sıcaklığı ifade etmektedir. I ise çözeltinin iyonik gücüdür. Çizelge 2.1.'de farklı iyonik güce sahip çözeltilerin elektriksel çifte tabaka kalınlığı üzerindeki etkisi verilmiştir. Çözeltinin iyonik gücü arttıkça, elektriksel çifte tabaka kalınlığı azalmaktadır [47].

$$Elektroozmotik\ akış,\ \mu_{\mathrm{EOF}} = \frac{\varepsilon_0\varepsilon_r\zeta}{\eta} \qquad (2.3.)$$

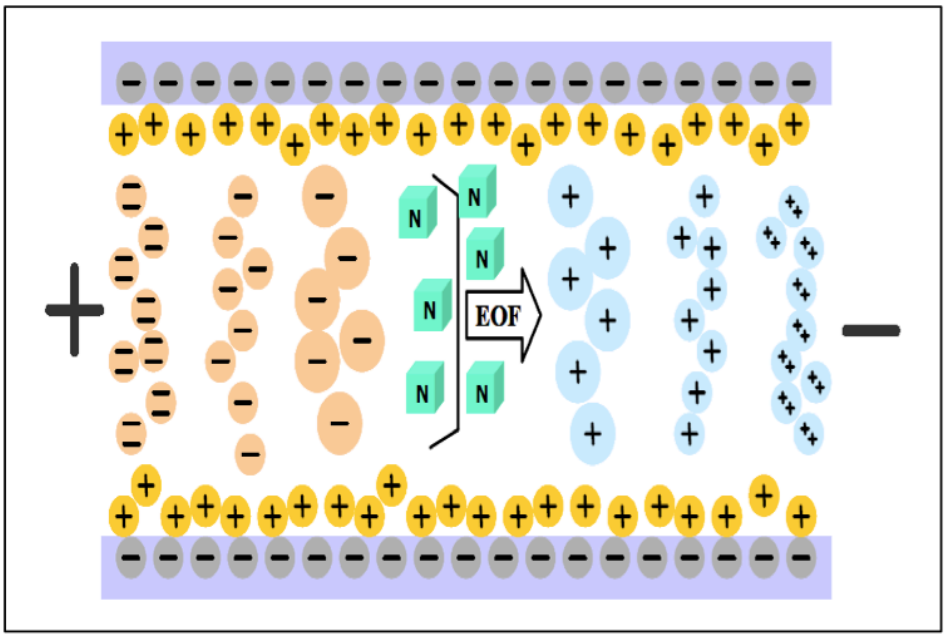


Şekil 2.4. Kapiler kolon boyunca yük dağılımı ve zeta potansiyelin değişimi [40].

Çizelge 2.1. Farklı iyonik güce sahip çözeltilerinin elektriksel çifte tabaka kalınlığı [47].

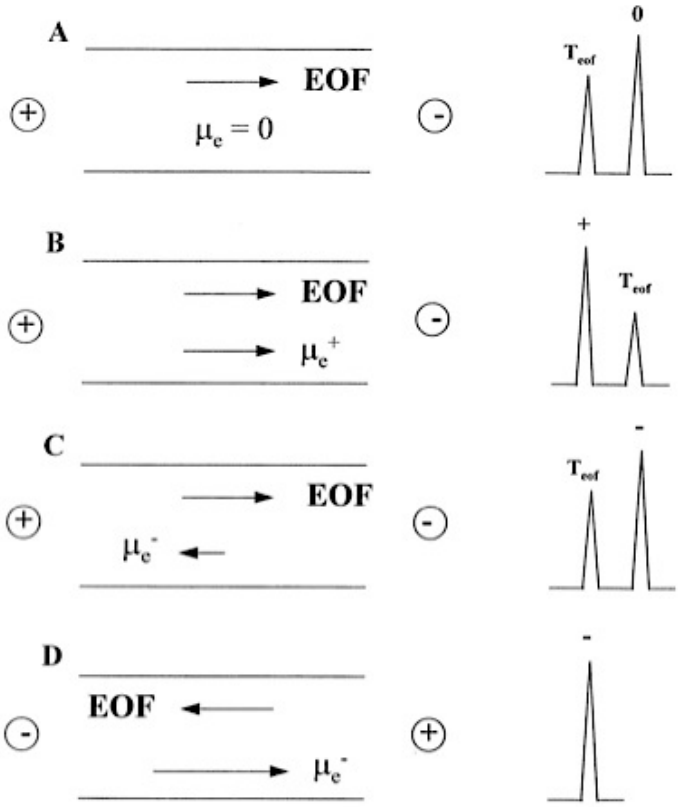
Elektriksel çifte tabaka	I (mM)					
kalınlığı (nm)	1.0	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0
δ (sulu çözelti)	9.6	6.1	4.3	3.0	2.5	2.2
δ (ACN/tampon 70:30)	7.6	4.8	3.4	2.4	2.0	1.7

Kapiler kolon boyunca potansiyel farkı uygulandığında dağınık bölgede (Gouy Tabakası) bulunan katyonlar, mobil faz moleküllerini de birlikte sürükleyerek katoda doğru ilerlerler. Böylece EOF oluşur. Oluşan EOF Eşitlik 2.3. ile hesaplanır. Burada, mobil fazin vizkositesi η, elektriksel geçirgenliği, ε_0, elektrolit çözeltisinin dielektrik sabiti ise ε_r ile ifade edilmiştir.



Şekil 2.5. Kapiler kolon içerisinde anyonik, katyonik ve nötral analitlerin EOF ile hareketi [46].

Elektriksel alan uygulanmış bir kapiler kolondaki iyonların durumu Şekil 2.5.'de gösterilmiştir. İyonlar kendi hareketleri ve EOF'nin etkisi ile kolon boyunca ilerlerler. Kapiler elektroforez (CE) ile uygulanan elektriksel alan, iyonlaşmış analitlerin kolon boyunca farklı hızlarda ilerlemesini ve ayrılmasını sağlar. HPLC ve CEC sistemlerinde ise nötral analitler mobil faz ile aynı yönde hareket ederler ve sabit faz ile olan etkileşimlerine göre kolonu farklı zamanlarda terkederler. Bu durum Şekil 2.6. (A)'da gösterilmiştir. Ancak analitler yüklü ise, elektroozmotik mobiliteye ve elektroforetik göçün yönü ve büyüklüğüne göre analitlerin kolon içerisinde geçirdikleri süre farklılık göstermektedir (Şekil 2.6). EOF ile elektroforetik göç aynı yönde ise; yüklü analitlerin göç hızı EOF işaretleyicisinden daima daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu durumda, yüklü analitler kolonu daha erken terkeder (Şekil 2.6. (B)). EOF ile elektroforetik göç hızı zıt yönde ve EOF, elektroforetik hızdan daha yüksek ise sırasıyla önce EOF işaretleyicisi sonra da yüklü analit kolonu terkeder (Şekil 2.6. (C)). EOF ile elektroforetik göç hızı zıt yönde ve EOF elektroforetik hızdan daha düşük ise sadece yüklü analitin tayini yapılabilir. EOF işaretleyicisi kolonu terk edemez.



Şekil 2.6. Kapiler elektrokromatografi sisteminde farklı yüklere sahip analitlerin hareketi [48].

CEC kolonunda analitlerin ayrımı, sabit faz ile analitlerin etkileşimine ve elektroforetik göç hızına bağlıdır. Alıkonma faktörü Eşitlik 2.4. ile ifade edilmektedir [49].

$$k_c = k + kk_e + k_e \qquad (2.4.)$$

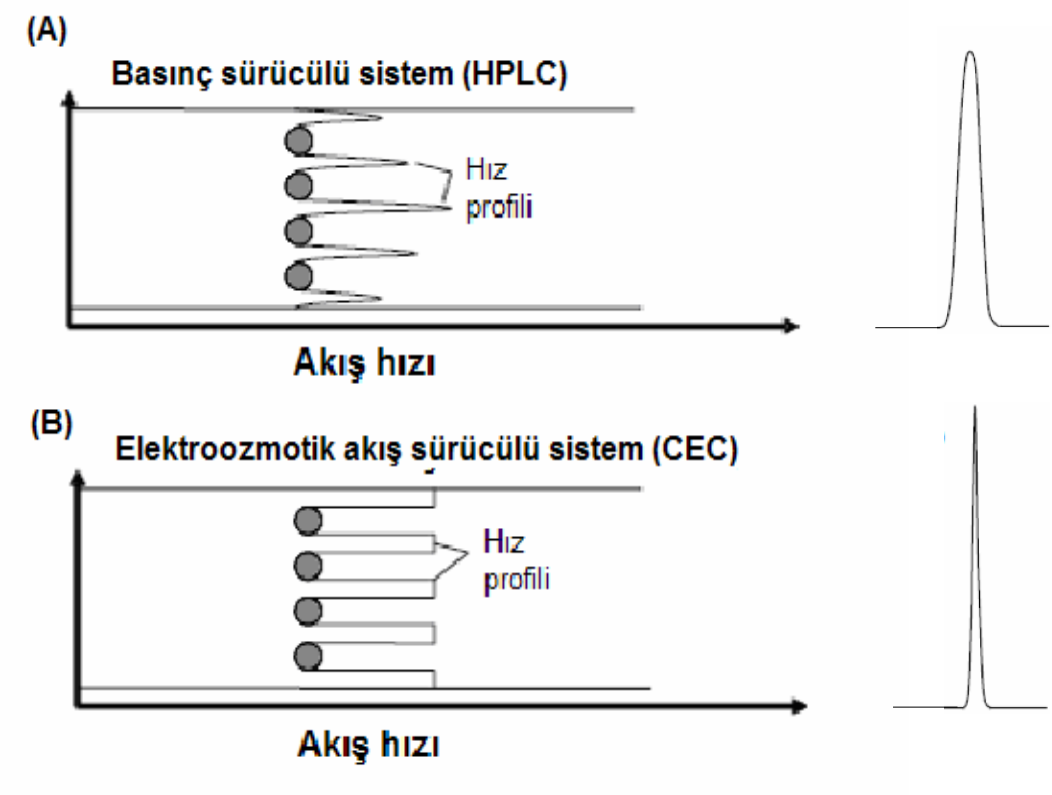
HPLC için alıkonma faktörü:

$$k = (t_r - t_0)/ t_0 \qquad (2.5.)$$

CE için ise:

$$k_e = (t_{eof} - t_m)/ t_m \qquad (2.6.)$$

şeklinde ifade edilmektedir. Eşitlik 2.5. ve 2.6.'daki t_r ve t_m, sırasıyla herhangi bir mobil faz ile birlikte kolon içerisinde hareket eden herhangi bir bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süreyi ve elektroforetik hıza bağlı olan göç süresini ifade etmektedir. t_o, referans bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süreyi t_{eof}, sadece EOF'in etkisi ile hareket eden analitin kolon içerisinde geçirdiği süreyi göstermektedir [49].



Şekil 2.7. (A) HPLC ve (B) CEC sistemlerinde elde edilen akış profilleri ve analit pikleri [40].

Şekil 2.5'den görüldüğü gibi, sürücü güç olarak HPLC sisteminde yüksek basınç kullanılması parabolik akış oluşmasına neden olurken, CEC sisteminde ise elektriksel alan uygulaması ile tıpa tipi (plug flow) akış profiline sahip EOF meydana gelir. Bu durum ise, daha yüksek verimle kromatografik ayrımın gerçekleşmesini sağlar.

Şekil 2.7., HPLC ve CEC sistemlerinde elde edilen akış profillerini ve analit piklerini göstermektedir. HPLC sisteminde hidrolik basıncın yarattığı parabolik akış, düşük ayırma gücü ve bant genişlemesine neden olmaktadır. CEC sisteminde ise tabaka bir bütün halinde hareket ettiği ve kayma gözlenmediği için HPLC sistemindeki dezavantajlar ortadan kalkmaktadır. CEC sisteminde elde edilen tıpa tipi akış, yüksek verimin ve daha keskin piklerin elde edilmesini sağlamıştır [40]. Kromatografik bir kolonun ayırma gücünü gösteren teorik tabaka sayısı elde edilen farklı akış profillleri sayesinde HPLC'de 50.000 tabaka/m değerine kadar çıkarken CEC'de 500.000 tabaka/m değerine ulaşmaktadır.

2.3. Elektroozmotik Akışı Etkileyen Faktörler

2.3.1. Dolgulu ve Boş Kısımların Katkısı

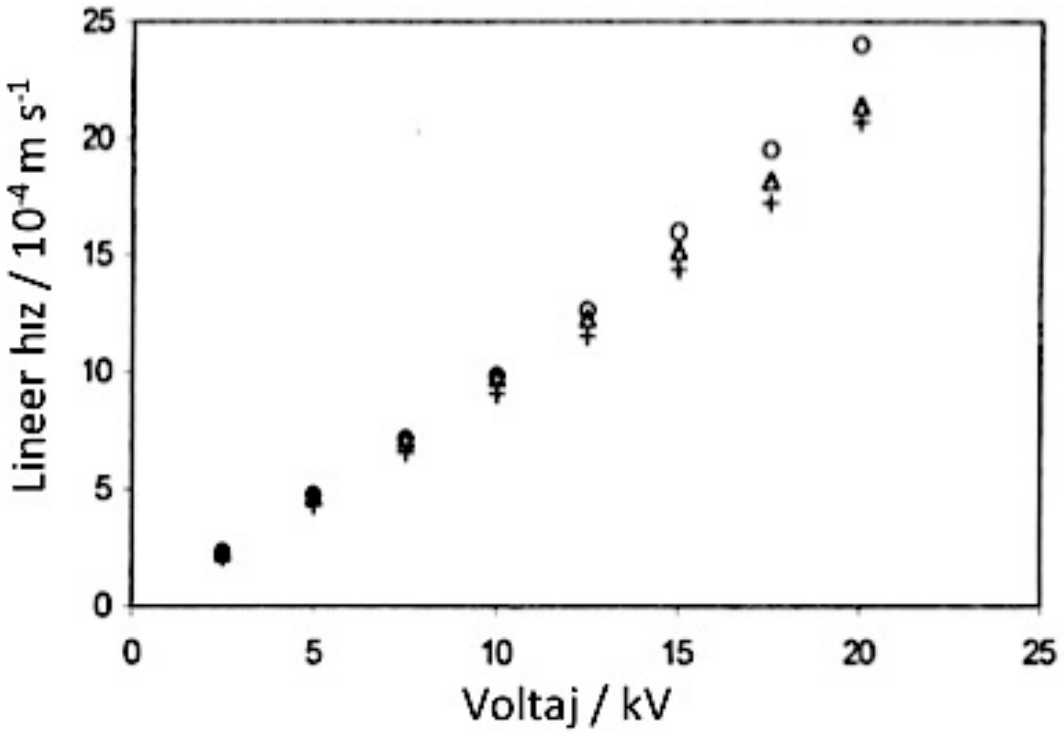
Kapiler kolon dolgu materyali, EOF'un oluşmasından sorumlu başlıca etkenlerden biridir. Silika kapiler kolonun gözenek ve yığın kısımlarının EOF oluşumundaki katkılarına dair yaygın kabul gören teoriler bulunmamaktadır. Ancak elektriksel iletkenlik ölçümlerine dayalı araştırmalar, her kısımda voltaj düşüşlerinin ölçülmesini ve farklı kısımların toplam EOF'a olan katkıların anlaşılmasını sağlamıştır. Ölçümlerde, kolonun yığın ve gözenek kısımlarının seri bağlı iki direnç gibi olduğu düşünülmüştür. CEC sistemi boyunca ölçülen akımlar tüm kolon boyunca ve kısmi olarak ölçülmüştür. Sonuçlar, mobil fazın yüksek pH değerleri için elektriksel alanının yığın kısımda daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Ancak nötral pH değerinde (pH 7.5) elektriksel alan iki kısımda da benzerlik göstermiştir [48].

2.3.2. Uygulanan Voltaj

Kapiler kolon uzunluğu (L) sabit tutulduğunda EOF'ın, elektriksel alan kuvveti (E) ya da uygulanan voltaj (V) ile doğru orantılı olarak değiştiği Eşitlik (2.7.)'de görülmektedir.

$$E = \frac{V}{L} \qquad (2.7.)$$

Ancak yüksek elektrik alan varlığında, ohmik ısınma sonucu viskozitedeki düşüş EOF hızının artmasına neden olmaktadır. Bu durum, EOF'a karşı voltaj değişimini gösteren grafikte sapmalara yol açmaktadır. Şekil 2.8.'de verildiği gibi, belirlenen elektriksel alan (E) değerine karşılık gelen EOF değerleri, değişik çap değerlerine sahip parçacıklar için benzerlik gösterirken, yüksek elektrik alan uygulandığında ohmik ısınma sonucu viskozite değişimi ile ortaya çıkan ısı saçılmaları partikül çapına bağlı olarak değişmektedir. EOF değeri E'ye bağlı olduğundan kolon boyundaki artış, voltaj değerindeki artışı da beraberinde getirmektedir. Birçok CEC deneyinde 30 kV voltaj değerlerine kadar çıkılarak kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir [48]. Literatürde 90 kV voltaj değerlerine kadar çalışılmasına olanak veren cihazlar da bulunmaktadır.



Şekil 2.8. Farklı partikül çapına sahip CEC kolonlarında uygulanan voltajın lineer hız üzerindeki etkisi, 5 (Δ), 3 (o), 10 (+) μm partikül çapı (8 nm gözenek boyutu) [47].

2.3.3. Mobil Fazın pH Değeri

EOF'ın mobil faz özellikleri ile ilişkilendirilmesi silika bazlı CEC kolonları ve açık-tübüler CE kolonları ile karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır. Yapılan araştırmalarda, düşük pH değerlerinde EOF'da meydana gelen azalma, düşük pH değerlerinde silanol gruplarının iyonlaşması ile açıklanmıştır. Zeta potansiyeli yüzey yüküne bağlıdır ve EOF'de zeta potansiyeline göre değişim göstermektedir. Hareketli fazın pH'ının değiştirilmesi durumunda, çözeltinin iyonik gücündeki değişim de EOF üzerinde etkili olmaktadır. Düşük pH değerine sahip tamponlar iyonik gücü arttırıcı yüksek pH tamponlarına asit eklenerek hazırlanır. Böylece mobil fazın iyonik gücü arttırılmış olur. Bu durum CEC'deki birçok uygulamalarda asidik bileşiklerin düşük pH değerinde ayrımına izin vermektedir [48].

2.3.4. Dolgu Materyalinin Çapı

CEC sisteminde mobil faz hızı partikül çapından (d_p) etkilenmemektedir. Fakat hidrolik basınç farkı ile çalışan HPLC sisteminde d_p'deki küçük bir değişim, ΔP'de büyük bir artışa neden olmaktadır. Bu durum yapılan çalışmalarda HPLC sisteminde kullanılan partiküllerin çap değerlerine bazı kısıtlamalar getirilmesini gerektirmiştir [48]. Birçok çalışma grubu, CEC sisteminde küçük çaplı partiküler ile dolgulanmış kolonda rahatlıkla çalışılabildiğini göstermiştir. [51,52]

2.3.5. Dolgu Malzemesine Bağlı Organik Grupların Varlığı

CEC sisteminde yaygın olarak kullanılan sabit fazlar, genellikle alkil grupları bağlı silika partiküllerdir. Mobil fazda bulunan pozitif iyonların, silika duvarına ve partiküllere bağlı olmayan Si- O- gruplarına doğru akışı, anoda doğru hareketin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Birçok silika bazlı kolonlar ile CEC ayrımları yapılmaktadır. Ancak bu dolgu malzemeleri üzerlerinde yük taşımazlarsa EOF hızında farkedilebilir bir etki gözlemlenemez [53,54].

Kolonların kromatografik davranışı üzerindeki çalışmalarda birçok gelişme olmaktadır. Örneğin fenil bağlı silikanın, bazik analitlerin ayrımında pik kuyruklanmasını (tailing) azalttığı gösterilmiştir [55]. EOF'ı arttırmak için, sabit faz olarak özellikle sülfonik asit ve alkil gruplarının beraber kullanıldığı güçlü katyon değiştiriciler ile çok sayıda kromatografik ayrım yapılmış ve başarıya ulaşılmıştır [54, 55].

2.3.6. Mobil Fazın Kompozisyonu

Mobil fazdaki organik çözücü tipinin ve hacimce yüzdesinin EOF hareketliliğini etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple geçirgenliğin viskozite ile oranı ε_r/η, hesaplanarak uygun mobil faz kullanımı ile ilişkilendirme yapılmıştır. Bu oranın yüksek olması EOF'ında yüksek olması anlamına gelmektedir (Eşitlik (2.3.)). CEC sistemlerinde genellikle mobil faz olarak ACN/tampon çözeltisi kullanılmaktadır. ACN oranı çözeltinin polaritesini değiştirdiği için EOF'da etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda aseton, ACN ve metanol organik fazları kullanılarak, ε_r/η oranları hesaplanmıştır. Sonucunda aseton, ACN ve metanol gibi organik çözücülerin mobil faz içerisinde %50-70 arasında olduğu durumlarda EOF'nin minimum değerlerde olduğu görülmüştür. ACN oranı arttıkça EOF'ta bariz bir artış gözlenmektedir [56].

2.4. Kolon Teknolojisi

CEC sistemde kullanılan kolonlar iki önemli işleve sahip olmalıdır. Ayırmaya ek olarak, sabit fazın EOF üretmesi gerekmektedir. EOF'nin oluşabilmesi için sabit fazın iyonlaşabilen gruplar içermesi zorunludur. Silika yüzeyde bulunan ayrışmış silanol grupları sürücü gücün varolması için gerekli negatif yükü sağlamaktadır [57-59]. HPLC ve µ-HPLC sistemlerinde kullanılan sabit fazlarda çeşitli yüzey modifikasyonlarının yapılması silanol gruplarının derişiminin düşmesine neden olmaktadır. Yüksek EOF oluşturamamaları nedeniyle bu sabit fazları CEC sisteminde kullanmak için iyi bir tercih değildir [60-62]. Silika bazlı sabit fazların meydana getirdiği EOF, ortam pH'ına bağlıdır [61, 63, 64]. Düşük pH değerlerinde

silanol grupları prontonlanıp, EOF azalırken, yüksek pH değerlerinde sabit faz kararsız durumda kalmaktadır [57]. Buna ek olarak, polar analitlerin aktif silanol grupları üzerine adsorplanması pik genişliğinde artışa ve buna bağlı olarak verimlilikte azalmaya neden olabilmektedir [65, 66]. Polimerik dolgu materyalleri sabit EOF sağlama avantajına sahiptir. Bu kolonlar kalıcı iyonlaşma özelliği gösterdikleri için pH'dan etkilenmezler ve polimer yüzeyindeki yük yoğunluğunun kontrolü, EOF'nin de istenildiği gibi ayarlanabilmesini sağlar [67-69].

2.4.1. CEC için Kolon Çeşitleri

Literatürdeki CEC kolonları üçe ayrılır.

I. Partikül dolgulu,
II. Açık tübüler,
III. Monolitik,

Analizlerde kullanılan kolon boyutlarına; ısı yayılımı, cihaz dizaynı vb. durumlar değerlendirilerek karar verilmektedir. Knox bu durum ile ilgili çalışmalar yapmış ve birim hacimde ortaya çıkan ısının, HPLC sisteminde viskoz sürüklenme nedeniyle ortaya çıkan ısıdan 1000 kat daha fazla olduğunu göstermiştir [70, 71]. Sabit fazın yüksek iyonik güce sahip olması, Joule ısınmasına sebep olmakta ve bu durum uygulanan elektrik alanında da bazı kısıtlamaları beraberinde getirmektedir. 50-100 μm iç çaplı kapiler kolonlar, bu ısınmayı en aza indirecek uygun yüzey alanı/hacim oranına sahiptir. Bu çaptaki kolonlar, ticari olarak yaygın kullanılmaktadır. Ancak bu kolonlar için tasarlanan ve sentezlenen sabit fazlar sınırlıdır. Bu nedenle literatürde sabit faz tasarımı ve sentezine yönelik çalışmalar büyük ilgi görmektedir.

2.4.1.1. Partikül Dolgulu Kolonlar

Partikül dolgulu kolonlar, kolon dolgu malzemesinin (sabit fazın) yüksek basınç yardımı ile kolona doldurup, fritlerle iki ucunun kapatılması ile hazırlanan kolon

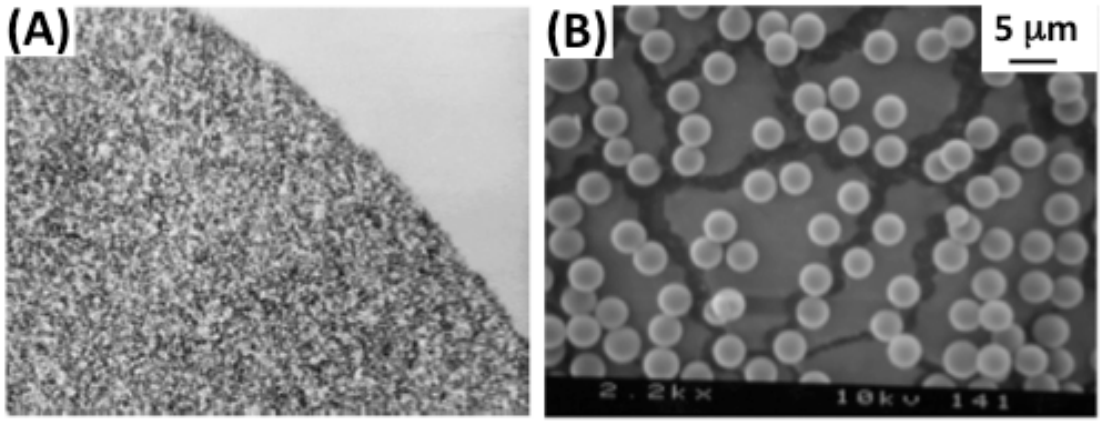
türleridir. Kolonlar gözenekli (porous), çekirdek-kabuk (core-shell) ve gözeneksiz (nonporous) olmak üzere üç farklı türde partikül ile dolgulanabilir [72]. Partikül dolgulu kolonlar aşağıdaki sıraya göre hazırlanmaktadır:

i) kolon dolgu malzemesinin seçimi ve sentezi
ii) yüzey türevlendirme ya da modifikasyon
iii) boyut analizi
iv) kolon dolumu
v) fritlerin hazırlanması
vi) kolon testi ve yöntem validasyonu

CEC sisteminde sürücü güç olan EOF'ı sağlayacak, yüklü veya iyonlaşabilir gruplara sahip dolgu malzemesinin seçilmesi önemlidir. Çünkü partikül boyutu EOF oluşumunu sağlayan elektriksel çifte tabaka kalınlığı ile uygunluk gösterirse yeterli EOF oluşamamakta ve EOF'nin önemli ölçüde düşmesine yol açmaktadır. Kolon dolgu materyali olarak silika ve polimerik bazlı malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Silika partikül bazlı ters-faz dolgu malzemeleri CEC'de en çok kullanılan dolgu malzemesi türüdür. Silika yüzeyinde bulunan karbon zincirleri analitler için alıkonmayı ve seçicilği sağlamaktadır. Silanol grupları ise mobil fazın pH'nın 2.3'den büyük olduğu durumlarda EOF'nin oluşmasını sağlamaktadır. Ancak pH'nın 5'ten küçük olduğu değerlerde yeterli EOF oluşmadığı ve pH'nın 10'dan yüksek olduğu değerlerde de kolon daha kolay kırılgan hale geldiği için ters faz sistemlerde kullanılan silika bazlı dolgu materyalleri için en uygun çalışma aralığı 5 ile 10 arasında olduğu belirlenmiştir [73]. Şekil 2.9.'da silika mikro-partiküllerin geçirgen elektron mikroskop (Transmission Electron Microscope,TEM) görüntüsü ve poly(GMA-co-DVB) polimerik partiküllerin taramalı elektron mikroskop (Scanning Electron Microscope, SEM) görüntüsü yer almaktadır [74, 75]. Poly(GMA-co-DVB) partiküller sentezlendikten sonra kolon içerisine doldurulmaktadır [75].

Partikül dolgulu kolonlarda bir karışımın kimyasal yapısı ve bileşimine göre seçici bir biçimde ayrımı ve alıkonması için partiküllerin yeterli yüzey alanına, boyuta ve gözenek yapısına sahip olması gerekmektedir [76-78]. HPLC sistemindeki hidrolik

basınç yerine, CEC'de oluşan EOF ile yüksek verimlilik elde edebilmek için çok küçük çaplı partiküller kullanılabilmektedir. Partikül çapı elektriksel çifte tabaka'nın kalınlığı (δ) ile çakışmadığı sürece azaltılabilir. Partikül çapı 20δ'dan büyük olduğu sürece bu çakışma gerçekleşmez ve EOF'da herhangi bir düşüş gözlenmez. Ayrıca partikül gözenek çapının 0.02-0.2 μm arasında olması durumunda daha iyi kromatografik ayrım elde edilmektedir. Bunun nedeni çok düşük gözenek boyutlarında yeterli EOF oluşmaması, çok yüksek gözenek boyutlarında da yüzey alanının azalmasından dolayı analitlerin alıkonma ve çözünürlük değerlerinde ciddi bir azalışın görülmesidir [73].



Şekil 2.9. (A) Gözenekli silika mikropartiküllerin TEM görüntüsü [74], (B) poly(GMA-co-DVB) polimerik partiküllerin SEM görüntüsü [75].

Partikül dolgulu kolonların homojen bir şekilde doldurulması için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar aşağıda sıralanmaktadır.

1. Çözücü kullanılarak süspansiyon şeklinde doldurma
2. Süper kritik CO_2 ile süspansiyon şeklinde doldurma
3. Elektrokinetik doldurma
4. Merkezkaç kuvvet yardımı ile doldurma
5. Vakum uygulayarak doldurma

Çözücü ile süspansiyon halinde doldurma en yaygın kullanılan yöntemdir [1]. Fritler (giriş ve çıkış fritleri) dolgu malzemesinin kolon içerisinde tutulmasını

sağlamaktadır. Kolon ömrü, fritlerin mekanik dayanımından etkilendiği için fritlerin yapımı kolon doldurma işleminden sonraki en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Aynı zamanda sabit faz ve frit yüzeyleri arasındaki kimyasal farklılıklar nedeni ile kolonun dolu kısmından boş kısmına doğru geçişte gözlemlenen EOF'daki değişim baloncuk oluşumuna neden olmaktadır [1,79]. Dört farklı frit oluşturma metodu vardır. Bunlar,

1. Kolon duvarına sabitlenmiş silikat/silika jel,
2. Dolgu malzemesinin sinterlenmesi,
3. Sol-jel ile yapıştırılmış dolgu malzemeleri,
4. Kolon duvarına sabitlenmiş gözenekli polimerik malzeme

Bunlar içerisinde en yaygın kulanılan yöntem dolgu malzemesinin sinterlenmesidir. Ancak bu yöntemin dezavantajları, işlemin yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesi, baloncuk oluşumu ve sabit fazların her biri için farklı sinterlenme yöntemlerinin uygulanması gerekliliğidir [80].

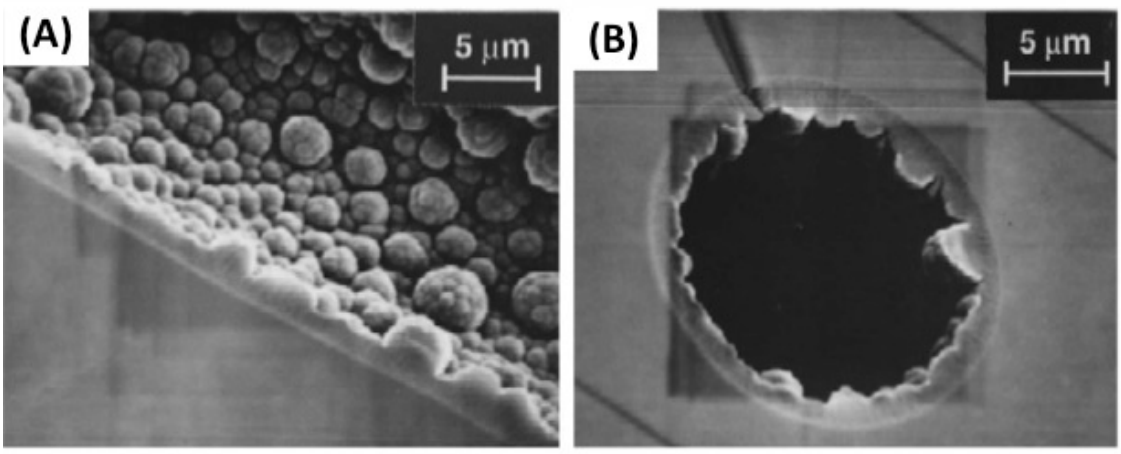
2.4.1.2. Açık-Tübüler Kolonlar (OTC)

Açık-tübüler kolonlar üzerinde yüklü ve ayırma grupları içeren sabit fazla kaplanmış kolon duvarına sahip kolonlar olup ilk olarak gaz kromatografisinde kullanılmıştır [81]. Ayrım, analit yüküne bağlı olarak kolon boyunca gerçekleşen kromatografik etkileşimlere dayanmaktadır. Bu tür kolonlar genellikle kapiler içerisinde hazırlanmaktadır. Sabit faz silika kapiler kolonun yüzeyinde oluşturulmakta ve mobil faz iç kısımdaki boşluktan ilerlemektedir. Kolon yüzeyindeki kaplama ya da hazırlanan sabit fazın kararlı olması önemlidir. Açık tübüler silika kolonun yüzey alanının gözenekli dolgu materyallerinden daha az olması örnek kapasitesinin de düşük olmasını gerektirmektedir. Bu durum, eser miktardaki analitlerin analizini güçleştirmektedir. Kolon yüzeyinin gözenekli bir malzeme ile kaplanması, kimyasal olarak bağlanmış moleküler tek-tabaka yerine kolon duvarının polimerik bir sabit fazla kaplanması yüzey alanını arttırmak için önerilen yöntemlerdir [75]. Partikül dolgulu kolonlar ile karşılaştırıldığında, frit

fabrikasyonu gerekmediğinden, baloncuk oluşumu gözlenmez ve analitlerin alıkonma faktörleri de partikül dolgulu kolonlar için hesaplanan değerlerden daha düşüktür [82].

2.4.1.2.1. Açık Tübüler Kapiler Elektrokromatografi (Open Tubular Capillary Electrochromatography, OT-CEC)

OT-CEC, biyoayırmada son yıllarda sıklıkla kulanılan bir kromatografik teknik olup, analiz, 50 µm veya daha düşük çaplı silika kapiler kolonlar kullanılarak yapılmaktadır [83-87]. Düşük miktarlarda kimyasal malzeme kullanımının yanı sıra etkin ayrım yapılabilmesi bu tekniğin önemli avantajları arasındadır. OT-CEC sistemi için hazırlanan kolonun iç yüzeyinde olması gereken yüklü veya ayırma grupları adsorbsiyon, kovalent bağlanma, gözenekli silika tabaka oluşturulması, kimyasal bağlanma, sol-jel dönüşümü veya moleküler baskılama gibi farklı yöntemlerle kolonun yüzeyinde oluşturulabilmektedir.



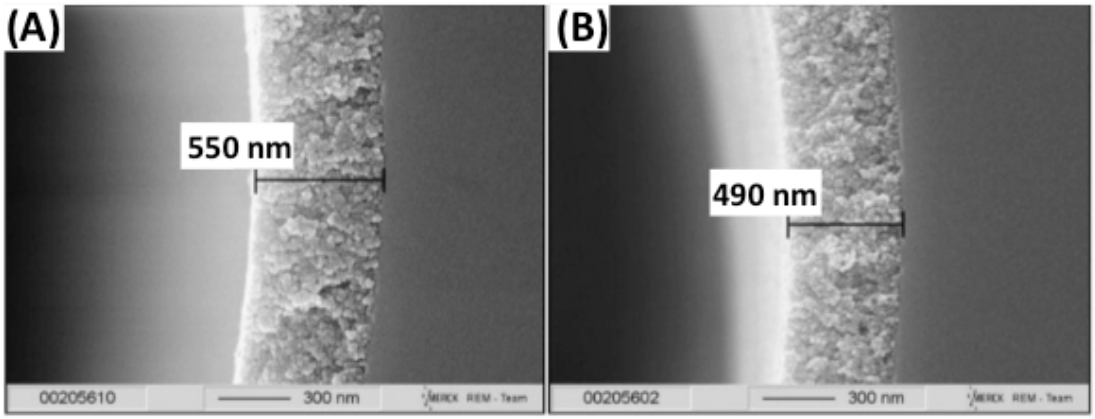
Şekil 2.10. N-N-dimetildodesilamin ile türevlendirilmiş poli(VBC-co-DVB) katyonik açık tübüler kolonun (A) yüksek büyütme ile yüzeyi ve (B) kesit alanının SEM görüntüleri [88].

N-N-dimetildodesilamin ile türevlendirilmiş poli(vinilbenzilklorür-co-divinilbenzen), poli(VBC-co-DVB), açık tübüler kolonun SEM görüntüsü Şekil 2.10'da verilmiştir. Kromatografik performansları yüksek olan gözenek tabakalı açık tübüler kolonlar

(PLOT) hazırlanmış ve CEC sisteminde protein ve peptit analizleri yapılmıştır [88].

2.4.1.2.2. Açık Tübüler Sıvı Kromatografisi (OT-LC)

İlk olarak gaz kromatografisinde kullanılan açık tübüler kolonlar, yaklaşık 20 yıl sonra sıvı kromatografi sistemleri için de geliştirilmiştir [89]. Blok polimerizasyonu ile kolon yüzeyinde gözenekli yapının oluşumu sağlanmaktadır. Polimerizasyon çözeltisi yüksek oranda monomer içermektedir. Polimerizasyon sıcaklığı ve süresi bu tür kolonların performansını önemli ölçüde etkilemektedir. Kromatografik performansı gösteren alıkonma faktörü, kolonun iç yüzey kalınlığına bağlıdır. Sıvı kromatografisi için hazırlanmış kolonun SEM görüntüsü Şekil 2.11'de verilmiştir. Özellikle proteomiks çalışmaları için kolonlar hazırlanmış ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi birleşik sistemlerde kullanılmıştır [90].



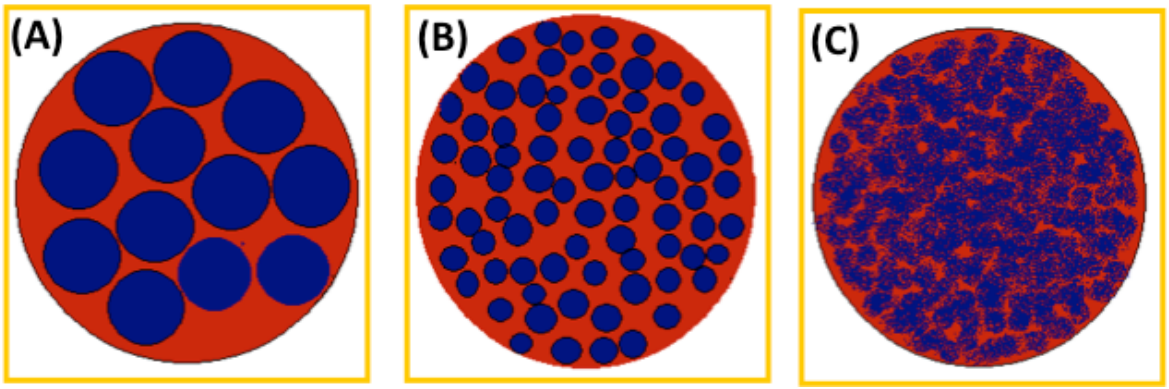
Şekil 2.11. Sol-jel yöntemi ile elde edilen silika açık tübüler kapiler kolonun SEM görüntüleri [80].

2.4.1.3. Monolitik Kolonlar

Monolitler tek bir gözenekli partikül veya birbirine bağlı kanallardan oluşan sürekli faz olarak düşünülebilir. Monolitik kolonlar partikül dolgulu kolonlarla kıyaslandığında, gözenekli polimer veya gözenekli silikadan yapılmış tek bir parçayı temsil etmektedir. Monolitler ince kapilerlerde gözenekli çubuk halinde farklı bir formatta elde edilmektedir. Uzun zamandır kullanılan partikül dolgulu

kolonlara alternatif olarak ortaya çıkmışlardır. Monolitik kolonlar, monomerlerin başlatıcı ve gözenek yapıcı varlığında polimerleşmesi ile hazırlanmaktadır. Polimerizasyon koşullarına göre farklı gözeneklilik özelliklerine sahip monolitler elde edilmektedir [74].

Partikül dolgulu kolonlar 100 yıllık bir geçmişe ve gelişmiş bir teknolojiye sahip olmalarına rağmen bazı dezavantajlara sahiptir. Partiküller arası boşluk, kütle transferinin yavaş gerçekleşmesi, kolon geri-basıncının yüksek olması ve fritlerin kullanılması sonucu baloncuk oluşumu bazı kısıtlamaları beraberinde getirmiştir. Monodispers partiküllerden oluşmuş ve çok sıkı doldurulmuş bir kolonda bile yaklaşık %30'luk bir partiküller arası boşluk hacmi vardır. Bu oran, kolonun büyük bir kısmının kromatografik ayrımda kullanılamadığının göstergesidir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Partiküller ile dolgulu kolonları ve monolitik kolonların temsili resimleri. (A) Büyük partiküllerle doldurulmuş kolon, (B) Küçük partiküllerle doldurulmuş kolon, (C) Monolitik kolon.

Partiküller arası boşlukların varlığı kütle transferinde de önemli bir sorun teşkil etmektedir. Mobil faz gözenekli dolgu malzemesi içinden geçirilmeye başlandığında, akışkan direncin minimum olduğu partiküller arası boşluktan akmaya başlarken gözenekler arasındaki akışkan ise durgun kalmaktadır. Mobil faz içerisindeki örneğin sisteme enjeksiyonu ile örnek iç yüzeydeki kromatografik liganda difüzyon ile ulaşmaktadır. Küçük moleküllü gazların, küçük organik moleküllerin ve iyonların kütle transferi difüzyon kısıtlamalarından çok etkilememektedir. Ancak protein, nükleik asit veya sentetik polimer gibi büyük

moleküllerin difüzyon katsayıları küçük moleküllere oranla çok daha düşük olduğu için kütle transferi, bu tür moleküller ile daha güç gerçekleşmektedir. Bu yüksek-hızlı kromatografi gibi proseslerde genel hızın kütle transferi tarafından kısıtlanmasına yol açmaktadır [91,92].

Gaz kromatografisi için geliştirilen açık tübüler kolonlar ile kütle transfer kısıtlamasına çözümler getirilmeye çalışılmıştır. İnert bir gaz, mobil faz olarak kullanılarak yüksek kromatografik verim sağlayabilen hızlı kütle transferi başarıyla elde edilmiştir. Fakat bu sırada boşluklardan akan çözelti ile gözeneklerdeki durgun akışkan arasındaki konsantrasyon farkı difüzyonun yavaş gerçekleşmesine sebep olmuştur. Bu durumu iyileştirebilmek için küçük çap değerine sahip kolonlar ve sabit fazlar (0.2 μm) tercih edilmiştir. Sabit faz miktarının azalması, örnek kapasitesinin azalmasına; bu da kolondan çıkan örneğin tayininin zorlaşmasına neden olmuştur [91,92].

Gözenekli partiküllerde kütle transfer kısıtlamasını azaltmak için ortalama partikül çapının küçültülmesi ve difüzyon yollarının kısaltılması amaçlanmıştır. Fakat partikül çapının ve partiküller arası boşlukların azalması geri basıncın artmasına ve geçirgenlikte düşmeye sebep olmaktadır. Alternatif olarak kolonda mezogözenek ve makrogözenek olmak üzere iki farklı gözenek türüne sahip partikül kullanımı denenmiştir. Mezogözenekler yeterli yüzey alanı sağlarken makrogözenekler kütle transfer kinetiğini arttırmıştır. Ancak; böyle bir kolonda bile konvektif akış, 80 nm'den büyük porlarla sağlanabilmektedir [74].

Monolitik dolgu malzemesi ise bu gözenekli partiküllerin bir araya gelmesiyle oluşmuş sürekli bir fazdan meydana gelmektedir. Monolitik kolonların kolon geçirgenliği ve kütle transferi makrogözenek yapısı nedeniyle yüksektir. Kütle transfer prosesi, partikül bazlı sabit faz içeren kolonlara göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu sayede hidrodinamik akışa karşı en düşük dirence sahip yüksek verimli kromatografik ayrım yapılabilmektedir [91,92].

2.4.2. Monolitik Kolonların Tarihsel Gelişimi

Sürekli bir ortam oluşturabilmek için ilk denemeler 1967 yılında Kubin tarafından yapılmıştır. İlk çalışmasında 2-hidroksietil metakrilat hidrojellerden oluşan çok düşük geçirgenlikte bir monolit üretmiştir [93]. Buna karşılık, çapraz bağlı poliüretan köpüklerden büyüklükçe ayırma kromatografisi ve gaz kromatografisinde kullanılmak üzere hazırladığı monolitler ile daha başarılı sonuçlar elde etmiştir. Daha sonra üretilen bu poliüretan köpükler Ross ve arkadaşları tarafından ilk kez 1970 yılında HPLC ve GC sistemlerinde kullanılmış fakat köpüklerin geçirgenliğinin düşük olduğu anlaşılmıştır [94]. Pretorious 1979 yılında ilk kez sürekli ve gözenekli silika bazlı köpükleri hazırlamıştır. Fakat bu köpüklerin sentezinde kullanılan yüzey aktif madde tanımlanamadığı için kromatografik uygulamalarda kullanımı pek tercih edilmemiştir. 1989 yılında, Hjerten ve arkadaşları, biopolimerlerin ayrımı için poliakrilamid bazlı monolitin sentezini gerçekleştirmişlerdir [95,96]. Bu çalışmada, N,N-metilenbisakrilamid ve akrilik asit, amonyum sülfat tuzu varlığında polimerleştirilmiş ve sürekli yatak adını verdikleri; şişmiş, çapraz bağlı, jel yapılı, yumuşak köpük yapısında bir monolit elde edilmiştir. Fakat hazırlanan monolit yüksek basınca karşı dayanıksız olduğu için hızlı analiz yapılmasına imkan sağlamamıştır. 1990 yılının başlarında Svec ve Frechet, CEC sisteminde kullanılmak üzere sıkı yapıda polimerik monolitler sentezleyerek bu sorunun üstesinden gelmişlerdir [95,96]. 1991 yılında Nakanishi ve Soga, çapraz bağlı polimerlere paralel olarak, HPLC sistemi için yüksek geçirgenliğe sahip silika monolit eldesi için çalışmıştır [95,96]. Bu konuda önemli bir buluş olan mikro ve mezo gözenekli, iki dağılımlı monolitik yapıyı elde etmişlerdir. Ancak monolit çok dar bir gözenek dağılımına sahip olduğu için kromatografik ayrımlar sırasında zorluklar yaşanmıştır. Bu nedenle 1996 yılında Fields, silika bazlı monolitler için yeni bir teknik geliştirse de bu monolitlerin de heterojen yapıda olmaları kullanımlarını kısıtlamıştır [95, 96]. Tennikova ve Svec, makrogözenekli polimer membranı adını verdikleri poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) monolitik kolonunu, Svec ve Frechet ise poli(stiren-co-divinilbenzen) monolitik kolonunu sentezleyerek sürekli polimer yatakları ailesini genişletmişlerdir [74]. Premstaller nükleik asitlerin ayrımı için polimerik kapiler kolonların sentezini geliştirmiştir [74]. Buchmeiser serbest radikal polimerizasyonuna alternatif olarak

por yapısı ve yüzey fonksiyonlarının kontrolünü sağlayan halka açılım (ring-opening) polimerizasyonunu önermiştir [74]. Yapılan çalışmalar sonrasında Merck KGaA, Darmstadt, Almanya, sentezlenen monolitik kolonları ticari olarak uygun hale getirmiş ve 100 μm iç çapında monolitik kolonlar üretmeye başlamışlardır. Monolit teknolojisine duyulan ilgi, giderek artmaya devam etmiş ve yeni teknikler geliştirilmiştir [74].

2.4.2.1. Monolitik Kolonların Hidrodinamik Özellikleri

Tüm mobil fazın kolonu dolduran malzeme içerisinden bütünüyle geçmesi için sabit fazın uygun büyüklükte gözeneklere sahip olması gerekmektedir. Nanometre büyüklüğünde gözeneklere sahip monolitik kolon yüksek basınç altında parçalanabilir. Bu nedenle dolgu malzemesinin gözeneklerine bağlı olan geçirgenliği büyük önem taşımaktadır. Monolitlerde yüksek akış hızlarına maruz kalındığında bile düşük geri basınç oluşturabilmek için polimerizasyon koşulları optimize edilmektedir. Böylece birbiri ile bağlantılı, düşük mikrometre ölçülerinde gözeneklere sahip monolitik kolonlar sentezlenebilmektedir [97].

Monolitlerin önemli başka bir özelliği ise % 80'lere kadar çıkabilen gözeneklilikleridir. Bu durum, kolonun yalnızca % 20'sinin dolu olduğunun bir göstergesidir. Partikül ile dolgulu bir kolonda ise bu değer % 60 civarındadır. Monolitik kolonlarda mobil faz büyük çaplı gözeneklerden ilerlemekte, böylece geri basınç büyük ölçüde azalmaktadır. Partikül dolgulu kolonlarda ise akış küçük gözenekler ile sağlanmaktadır. Monolitik kolonlarda konveksiyonla olan kütle aktarımı, partikül dolgulu kolonlarda difüzyonla olmaktadır. Bu durum monolitlerdeki kütle aktarım hızını arttırmaktadır. Monolitlerin ölçeklendirilmesi, dinamik davranışı ve tasarımını konu alan bir matematiksel model ortaya konmuştur [97].

2.4.2.2. Monolitik Kolonlar ile Kapiler Elektrokromatografi

Yapılan ilk çalışmalarda, monolitik kolonlar, başarılı ayrımlarına ve ticari uygunluklarına rağmen, 4-10 mm iç çapa sahip partikül dolgulu kolonların gölgesinde kalmışlardır. 1990'lı yıllarda ortaya çıkan kapiler elektrokromatografi

geleneksel sıvı kromatografisine oranla sahip olduğu yüksek verimlilik, pik kapasiteleri ve hızlı analizleri sayesinde minyatirüze ayırma tekniği olarak önem kazanmıştır. Fakat HPLC ve CE'den CEC'e geçen araştırmacılar partikül ile doldurulmuş olan kolonlar için frit yapma ve kolon doldurma işleminin zorlukları ile karşılaşmışlardır. Dolayısıyla çalışmalar monolitler üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Hazırlanışlarındaki kolaylık ve eşsiz gözenek özellikleri sayesinde monolitler CEC'te büyük ilgi görmüştür [74].

Monolitik CEC kolonlarının hazırlanışında, polimerizasyon öncesi kapiler kolonun iç yüzeyi, [3-(trimetoksisilil)propil] metaktrilat ile etkileştirilerek tepkiyen yüzeydeki silanol grupları sayesinde monolitin duvara yapışması için gereken gruplar oluşturulmakta ve böylece monolit kovalent olarak duvara bağlanmaktadır. Küçük çaplı kapiler form silika bazlı monolitlerin eldesine olanak tanımaktadır [74].

Yapılan çalışmalarda kapiler kolonlar ile teorik tabaka sayısı 100.000 m^{-1} değerine kadar ulaşmıştır [74]. İlk olarak benzen türevleri gibi basit organik bileşiklerden oluşan bir karışımın analizi gerçekleştirilmiştir [74]. Ancak daha sonra büyük moleküllerin, proteinlerin ve peptitlerin ayrımları başarıyla yapılmıştır [74]. Fakat bu moleküllerin iyonlaşabilmesinden dolayı bazı güçlükler ile karşılaşılmıştır. Protein ve peptitler, benzen türevleri gibi nötral moleküller olmadıkları için sadece elektroozmotik akış ile hareket etmemektedir. Yüklü moleküllerin kolon boyunca hareketi, elektroforetik mobiliteye de bağlılık göstermektedir. Elektroforetik mobilite ise, mobil fazın pH'ına göre, elektroozmotik akışla aynı veya ters yönlü olabilmektedir. Ayrıca pozitif yüklü moleküller, yüzeydeki negatif yüklü monolitik sabit faz ile etkileşime girebilir bu durumda kalıcı adsorpsiyon bile gözlenebilmektedir [74]. El Rassi ve grubu, yeterli EOF'ı sağlayan ve herhangi bir elektrostatik etkileşimin olmadığı apolar poli(pentaeritritol-diakrilat-monosteerat) bazlı CEC kolonları ile çalışmalar yapmışlardır [18]. Mobil faz elektroliti ile yeterli sayıda iyonu polimer yüzeyine adsorplanması, sabit faza bu yeteneği sağlamıştır. Adsorplanan iyonlar nötr monolite EOF için ve kütle transferi için gerekli olan zeta potansiyelini oluşturmuştur. Yine de sabit yükler, pH 7 de hızlı ve başarılı protein ve peptit ayrımını sağlamıştır [18].

2.4.3. CEC Sisteminde Monolitik Kolonlar

2.4.3.1. Monolitik Silika Kolonlar

1996 yılında Tanaka ve arkadaşları, ilk kez ters faz sıvı kromatografisi için gözenekli silika monolitleri sentezlemiştir [2].

CEC sistemi için kullanılan monolitik silika kolonların çoğu sol-jel teknolojisi ile elde edilmektedir. Bu proseste öncelikle sol çözeltisi hazırlanır ve daha sonra bu çözelti jelleşip sürekli sıvı fazda bir ağ oluşturur. Monolitlerin sentezinde metal oksitler, suyla reaksiyona girip bu senteze öncülük etmektedir. Genellikle öncü madde (prekürsor) olarak tetrametoksisilan ve tetrahidroksisilan kullanılmaktadır. Üç genel raksiyon sol-gel prosesini açıklamak için kullanılabilir:

1. Hidroliz

$$\equiv Si\text{-}OR + H_2O \rightarrow \equiv Si\text{-}OH + ROH$$

2. Alkol kondenzasyonu

$$\equiv Si\text{-}OH + RO\text{-}Si\equiv \rightarrow \equiv Si\text{-}O\text{-}Si\equiv + ROH$$

3. Hidroksil kondenzasyonu

$$\equiv Si\text{-}OH + HO\text{-}Si\equiv \rightarrow \equiv Si\text{-}O\text{-}Si\equiv + H_2O$$

İlk reaksiyonda alkoksisilikatların hidrolizi yani silanol gruplarının oluşumu (Si-OH) daha sonra alkoksisilan ile silanol grupları arasındaki kondenzasyon reaksiyonu (Si-O-Si) ve arkasından suyun silanol grupları ile kondenzasyon reaksiyonu gerçekleşmektedir. Sol-jel yöntemi ile düşük sıcaklıkta ve atmosferik basınçta gözenekli silika cam yapısı oluşmaktadır [2].

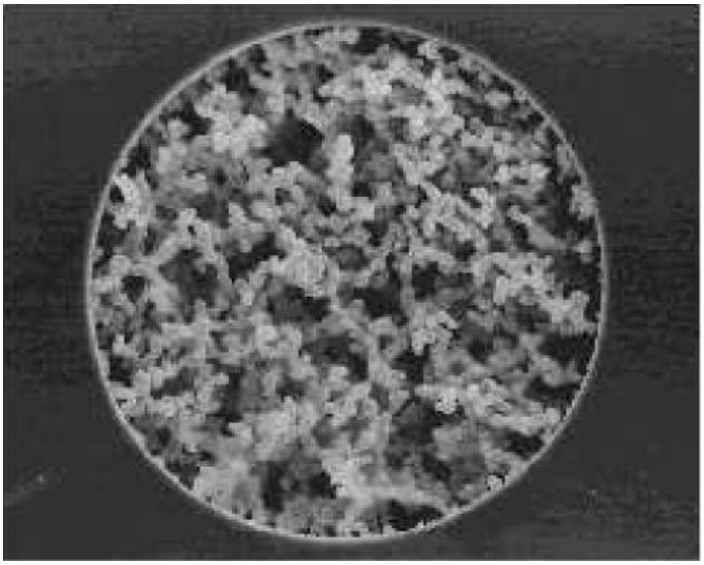
Sıcaklık, pH, katalizor tipi, reaksiyon süresi, reaktif konsantrasyonu gibi birçok parametre jel matriksinin yapısını farklı şekilde etkilemektedir. Örneğin su miktarı azaltıldığında ikinci basamak olan alkol yoğunlaşma basamağı baskın duruma

gelir ve jelleşme zamanı uzar. Böylelikle daha mikrogözenekli yapıda monolitler elde edilmiş olur [2].

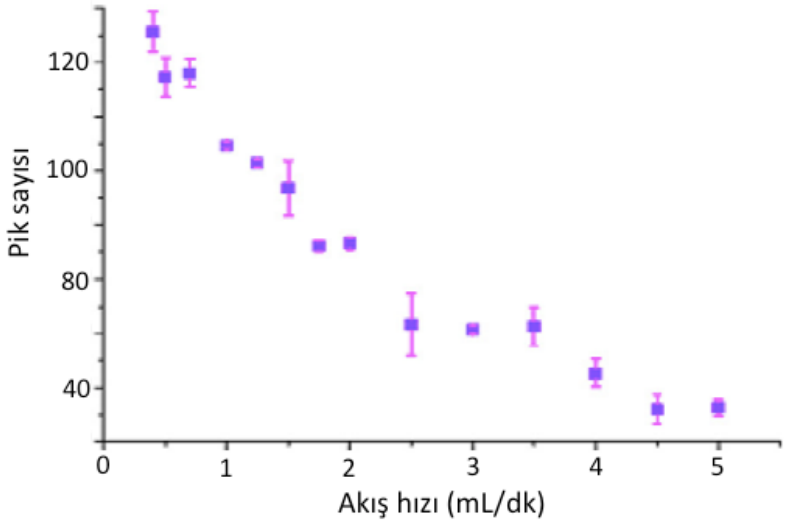
Başarılı kromatografik ayrımlara ulaşabilmek için monolitik yapıdaki kütle transferinin yüksek olması gerekmektedir. Dolayısıyla monolitik silika kolonlarda kolon performansını arttırmak için konveksiyondan yararlanılır. Konveksiyon, kolon performansı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kütle aktarım prosesi monolitik kolonlarda dolgulu kolonlara oranla daha fazla olduğundan hızlı ve yüksek verim ile kromatografik ayrım mümkün olmaktadır. Ayrıca silika monolitlerin geçirgenlikleri fazla olduğundan yüksek akış hızlarında kolaylıkla çalışma imkanı vardır [98]. Silika monolitlerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), iletimli elektron mikroskobu (TEM), civa porozimetresi, Brunauer-Emmet-Teller (BET) ile yapılmaktadır [99].

2.4.3.1.1. Monolitik Silika Kolonların Kromatografik Performansları

Monolitik silika kolonların kromatografik performansları; monolitik yapının yüksek gözeneklilik özelliğine sahip olmasıyla yani yüksek geçirgenliğin oluşmasıyla artmaktadır. Gözenekli yapı, birim basınç düşmesi başına teorik tabaka sayısını arttırmaktadır. Büyük gözeneklerin varlığı sayesinde geçirgenlik artmakta ve difüzyon yol uzunluğu azalmaktadır. Bu özelliklere sahip monolitik silika yapıda, partikül dolgulu kolonlara göre basınç düşmesi ve teorik tabaka yüksekliği daha az olmakta ve hızlı bir analiz gerçekleştirilebilmektedir. Şekil 2.13.'de silika bazlı monolitik kolonun SEM görüntüsü Şekil 2.14.'de ise monolitik silika kolonun ters faz kromatografisi kullanılarak gradyent koşullarda ayırma potansiyeli, verilmiştir. Şekil 2.14'deki pik sayısı Agilent'ın yazılımına göre hesaplanmış ve pik çözünürlüğü ile orantılı olarak kabul edilmiştir [99].

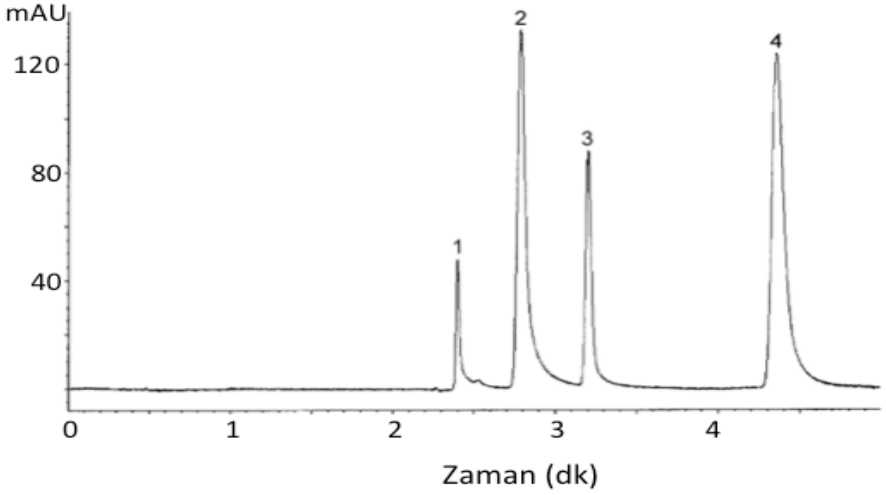


Şekil 2.13. 100 µm çaplı kapiler kolon içerisinde hazırlanmış silika bazlı monolitin SEM fotoğrafı [100].



Şekil 2.14. Ters faz kromatografisinde pik sayısının akış hızına karşı grafiği Sistem: Agilent HPLC 1100, Mobil faz: (A) H_20 + % 0.1 TFA (B) ACN + % 0.1 TFA. 0. dk % 95 (A)- % 5 (B), 20.dk % 50 (A)- %50 (B), 22.dk %0 (A)-%100 (B) [99].

Metakriloksipropiltrimetoksisilan (MPTMS) ve hidroklorik asit'ten oluşan karışım ile elde edilen sol-jel silika monolit CEC analizlerinde kullanılmıştır [101]. Silika bazlı monolitik kolon ile, aromatik hidrokarbonlar, ketonlar ve steroidler başarılı şekilde ayrılmıştır. MPTMS sol-jel monolit ile nötral bileşiklerin elektrokromatografik ayrımı Şekil 2.15.'de verilmiştir. [101].



Şekil 2.15. MPTMS sol-jel silika monolit ile nötral bileşiklerin ayrımda elde edilen elektrokromatogram . Deneysel koşullar: HP^{3D} CE sistemi, etkin uzunluk: 22.5 cm, toplam uzunluk: 31 cm, mobil faz: asetonitril/ 2.5 mM amonyum asetat tamponu (50/50 v/v), uygulanan voltaj: 25 kV, elektrokinetik enjeksiyon: 5 kV 1 s, dalga boyu: 214 nm Elüsyon sırası: (1) tiyoüre (2) dimetilfitalat (3) anisol (4) naftalin [101].

Silika bazlı monolitler için yapılan çalışmalar devam etmektedir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda organik polimer bazlı monolitler ile elde edilen kromatografik performansa halen ulaşılamamaktadır [102].

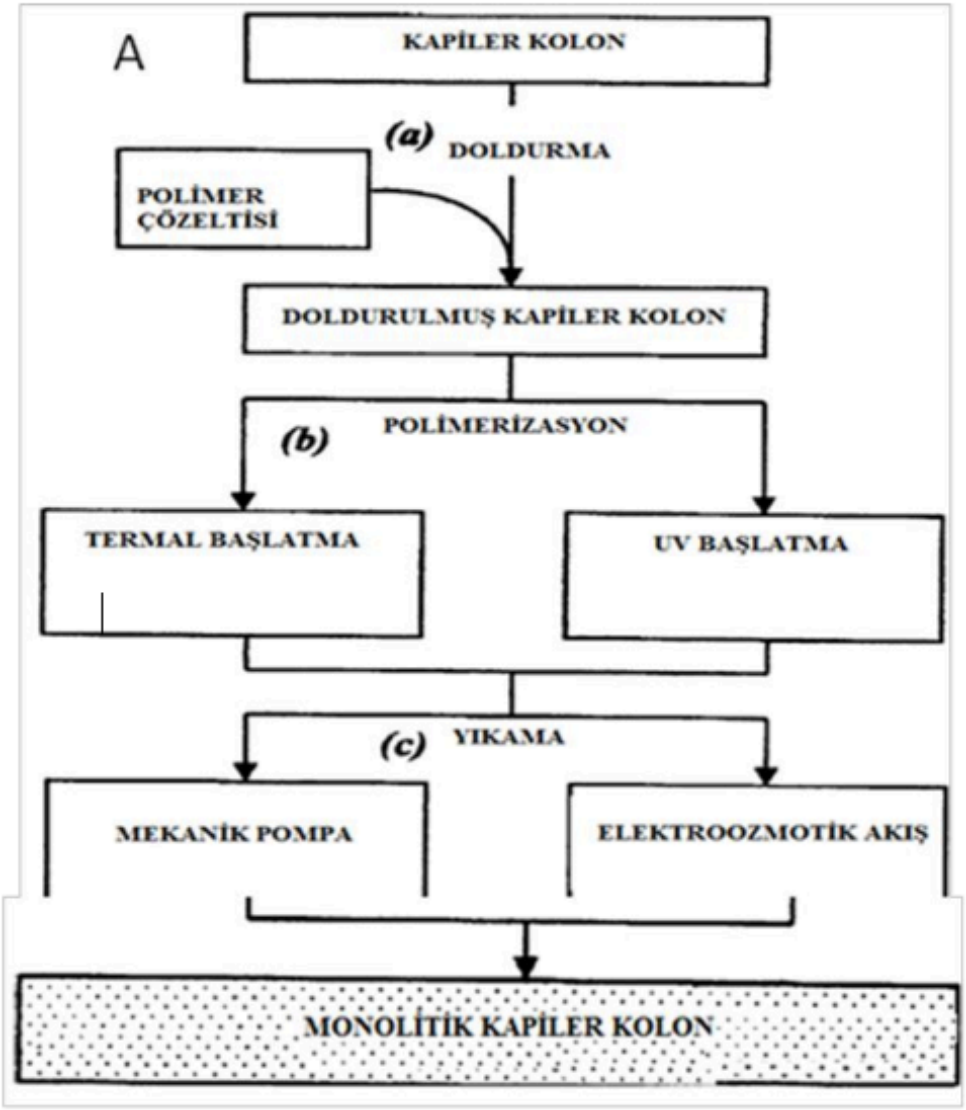
2.4.3.2. Polimer Bazlı Monolitik Kolonlar

Polimer bazlı monolitik kolonların sentezi için monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek yapıcılardan oluşan ortam gerekmektedir [99]. Kapiler içerisindeki polimer ağı, basamaklı zincir polimerizasyonu ile meydana gelmektedir. Farklı monomerler kullanılarak çok çeşitli monolitler elde edilmektedir. Aynı şekilde, gözenekliliği ayarlayan çapraz bağlayıcının konsantrasyonu değiştirilerek çapraz bağlanma derecesinde farklılıklar oluşturulabilmektedir [103]. Basamaklı zincir polimerizasyonunda genellikle başlatıcı olarak AIBN kullanılmaktadır. Monolitin oluşumu ön işlemden geçmiş yani monolitin iç duvara tutunmasını sağlayacak fonksiyonel grupları içeren silika kapilerlerde gerçekleşmektedir. Bu durum monolitin yüksek basınca dayanması sağlamaktadır [2]. Genellikle polimerik

monolitik kolonların gözenek yapıları mikroküreciklerin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Yapıdaki boşluklar makrogözenek yapısının oluşmasını sağlar ve bu gözeneklerin gözenek çapları 100 nm'den daha yüksektir [104]. Mezogözenekler ve mikrogözeneklerin varlığı çözücü bileşimine ve malzemenin şişme özelliklerine göre değişim gösterir [105]. Polimer bazlı kolonların monolitik silika kolonlara göre yüzey alanı daha düşüktür. Ayrıca polimer bazlı monolitik kolonların silika bazlı kolonlara göre en temel avantajı yüzey özelliklerinin yardımcı monomer (çapraz bağlayıcı) ile kontrol edilebilmesidir [106]. Yüzey özelliklerine göre monolitler 5 grupta toplanmaktadır [107].

1. Hidrofobik monolit
2. Hidrofilik monolit
3. İyon değiştirici monolit
4. Affinite monoliti
5. Kiral organik polimerik monolit

Şekil 2.16.'da CEC sisteminde kullanılmak üzere hazırlanan organik polimer bazlı monolitik kolonun hazırlanma prosedürü gösterilmiştir. Polimerizasyon karışımı silika kolonlara doldurulduktan sonra polimerizasyon, karışımın sıcaklık veya UV ile etkileştirilmesiyle başlamaktadır. Hazırlanan monolitik kolon, kolon içinde dönüşmeyen monomerlerin ve gözenek yapıcı sistemdeki çözücülerin kolondan uzaklaştırılması amacıyla genellikle etanol veya methanol ile yıkanmaktadır [108].

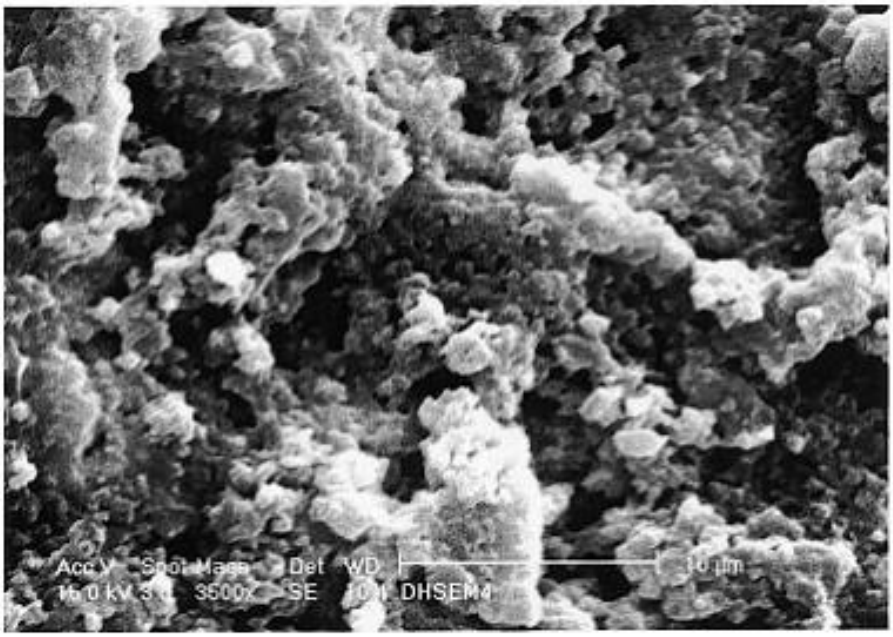


Şekil 2.16. Polimer bazlı CEC monolitik kolonunun hazırlanma prosedürünün blok diagram ile gösterimi [98].

2.4.3.2.1. Akrilat-Metakrilat Bazlı Polimerik Monolitler

HPLC analizlerinde kullanılan metakrilat bazlı kolonlar Svec ve Frechet tarafından 1990'lı yılların başında üretilmiştir [2]. Çalışmalar sonucunda çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilatın (EDMA) polimerizasyon çözeltisinde derişimi arttırıldığında polimerin özgül yüzey alanının arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla EDMA miktarı değiştirilerek birçok farklı türde polimerik monolit elde edilebileceği ortaya çıkmıştır [109]. Silika bazlı monolitik kolonlar ile geniş pH aralığında çalışılamazken (pH 2-

12), metakrilat bazlı kolonlar bu aralıkta kararlı bir davranış sergilemişlerdir. Bu durum silika bazlı monolitlere kıyasla büyük bir avantajdır. Monomer olarak glisidil metakrilat kullanıldığında epoksi gruplarının kolayca türevlendirilebilmesi ve kolonların sentezinin basit olması metakrilat bazlı monolitlerin ayrıca tercih edilme sebebidir [2].

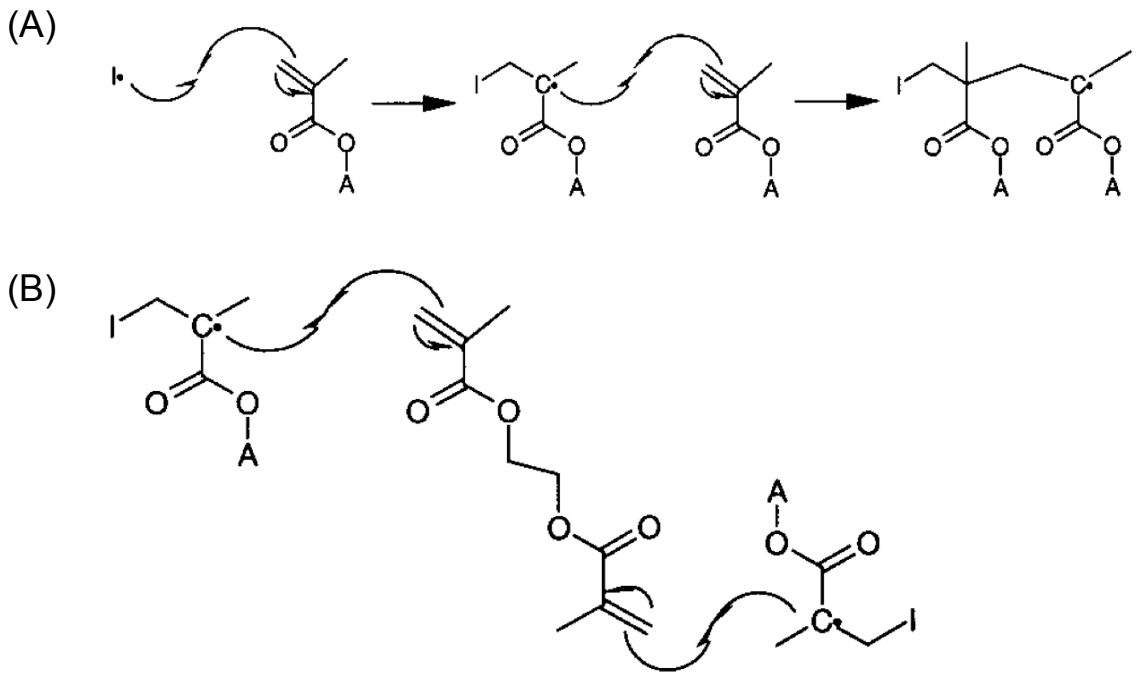


Şekil 2.17. Metakrilat bazlı monolitin SEM görüntüsü [2].

Metakrilat bazlı monolitik kolonların üretimi oldukça kolaydır. Silika kolon, herhangi bir silanizasyon işlemine tabi tutulmadan da kullanılabilir. Ancak monolitin duvara tutunma özelliğinin arttırılması için silanizasyon işlemi genelde uygulanır [110]. Metakrilat bazlı CEC kolonunda genelde monomer olarak glisidil metakrilat (GMA) ve çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA) kullanılmaktadır. Gözenek yapıcı sistem olarak siklohekzanol, dodekanol, propanol, metanol veya asetonitril tercih edilmektedir. Serbest radikal başlatıcı olarak ısı veya UV ışığı ile aktive olan 2,2 azobisizobütilonitril (AIBN) kullanılmaktadır [2].

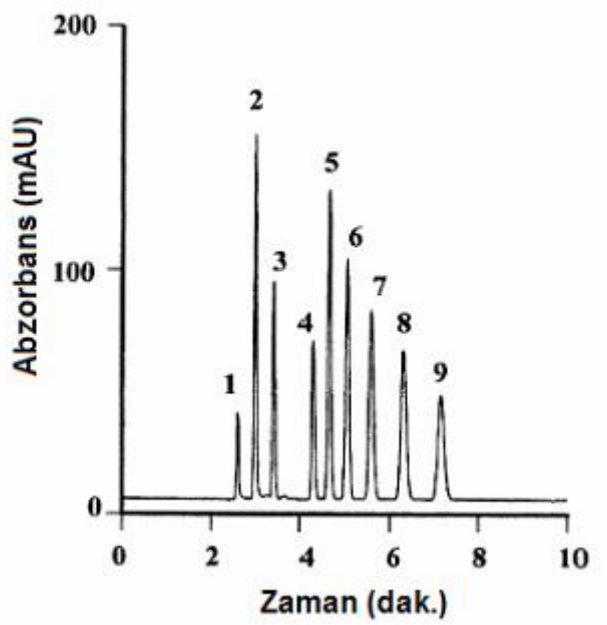
Glisidil metakrilat bazlı monolitler içerdiği reaktif epoksi grupları sayesinde kolayca türevlendirilebilir. Ayrıca amino gruplarına ek olarak anyon ve katyon değiştirici yüklü gruplarda yapıya bağlanabilir. Monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek yapıcı içeren karışım kapilere doldurulduktan sonra polimerizasyon

başlatılmaktadır. Daha sonra reaksiyon serbest radikal polimerizasyonu ile ilerleyip tamamlanmakta ve sıkı makrogözenekli monolitik polimer elde edilmektedir [2]. Metakrilatın polimerleşmesi ve çapraz bağlanma prosedürü için reaksiyon mekanizması sırasıyla Şekil 2.18. (A) ve Şekil 2.18. (B)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. (A) Monomerin radikal varlığında polimerleşme sürecinin başlaması ve zincirin büyümesi A: Terminal grup (B) Etilen dimetakrilatın çapraz bağlanma prosedürü [2].

Metakrilat bazlı polimerler birçok analit grubunun ayrımı için elektrokromatografik sistemlerde başarıyla kullanılır. Bu kolonlarda teorik tabaka sayısı 250.000 m^{-1} değerine ulaşmıştır [16]. Şekil 2.19'da n-propanol ve 1,4-bütandiol gözenek yapıcı sistem kullanılarak sentezlenen poli(bütil metakrilat-co-etilen dimetakriklat) kolonun pH 7'de benzen türevlerini kısa bir sürede ayırabildiği görülmektedir [69].

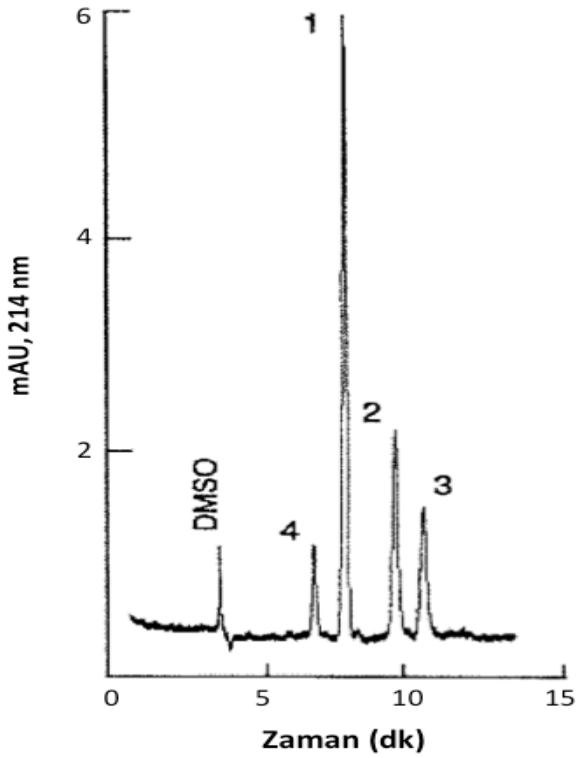


Şekil 2.19. Alkilbenzen türevlerinin ayrımı. Mobil faz: % 80 ACN- % 20 tampon, pH 7, UV dedektör: 215 nm, Uygulanan voltaj: 25 kV, Enjeksiyon: 5 kV 3s, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Pik sırası: (1) tiyoüre, (2) benzil alkol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen [69].

2.4.3.2.2. Stiren Bazlı Polimerik Monolitler

Stiren-divinilbenzen kopolimer ağları; büyüklükçe ayırma kromatografisinde sabit faz olarak, iyon değişim kromatografisinde sabit fazın sentezi için başlangıç materyali olarak kullanılmakta olup, geniş ve farklı uygulama alanlarına sahiptir. Yapısındaki fenil grubu varlığı monolite hidrofobik özelliği vermektedir. 1990'ların başında Svec ve Frechet, ters faz sıvı kromatografisinde proteinlerin ayrımı için gözenekli yapıda stiren bazlı monolitik ortamı sentezlemişlerdir. Bu çalışmada gözenek yapıcı olarak toluen, monomer ve çapraz bağlayıcı olarak da sırasıyla stiren ve divinilbenzen kullanılmıştır. Polimerizasyon karışımı kapiler kolon içerisinde 70^{o}C'de 24 saat bekletilmiştir [2]. Gusev ve grubu, methanol, etanol, propanol, toluen ve formamid gibi farklı çözücüler varlığında poli(stiren) bazlı kolonlar elde etmişlerdir. Reaktif klorometil grupları N,N-dimetiloktilamin ile türevlendirilerek kolonda pozitif yüklü yüzey oluşturulmuş, asidik/bazik yapılı peptitlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2.20.'de peptitlerin başarılı ayrımınına ait elektrokromatogram verilmiştir. Analitlerin kolondaki göçü elektroforetik mobilite ile sağlanmıştır [111].

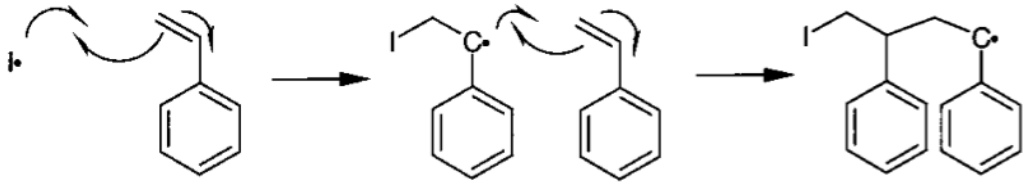


Şekil 2.20. Asidik ve bazik peptitlerin ayrımını gösteren elektrokromatogram. Kolon: 31 cm (21 cm etkin uzunluk) x 75 μm iç çap, Mobil faz: 50 mmol/L sodium klorür içeren ACN/5 mM fosfat tamponu pH 3 (25/75 v/v), Elektrokinetik enjeksiyon: 5 kV 2s, Pikler: (1) angiotensin II, (2) angiotensin I, (3) [Sar^1 Ala^8] – angiotensin II, (4) insülin [111].

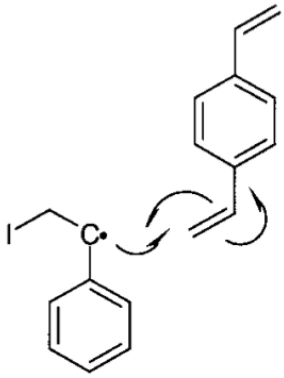
Poli(stiren-divinilbenzen) polimerleri geniş pH (1-14) aralıklarında kararlı bir yapıya sahiptir. Yüksek hidrofobisitelerine rağmen ters faz kromatografisinde sabit faz olarak türevlendirilmeden direkt olarak kullanılabilmektedir. Kromatografik etkileşimi arttırabilmek için yüzey alkil grupları ile kolaylıkla modifiye edilebilmektedir. Alkil gruplarını yüzeye bağlamak için iki yöntem kullanılmaktadır. İlk yöntemde polimerizasyon karışımına gözenek yapıcı ortamda çözünebilen bir monomer (örneğin alkilstiren) eklenmekte ve polimerazyon gerçekleşmektedir. İkinci metotda ise polimer oluştuktan sonra alkil grubu, yüzeye katalizör yardımıyla bağlanmaktadır [112]. Poli(stiren-divinilbenzen) polimerik yapıları, gözenek yapıcı solventin monomer ve çapraz bağlayıcı da çözünürlüğüne göre farklı şekillerde

hazırlanabilmektedir. Çözünen göznek yapıcı varlığında makrogözenekli polimerler, divinilbenzen konsantrasyonu yüksek, stiren konsantrasyonu düşük olduğu durumda sentezlenebilir. Çözünmeyen gözenek yapıcii varlığında ise düşük konsantrasyonda stiren ve divinil-benzen kullanılarak makrogözenekli monolitik yapılar hazırlanabilmektedir. Stiren bazlı monolitin, polimerleşmesi ve çapraz bağlanma prosedürü için reaksiyon mekanizması sırasıyla Şekil 2.21. (A) ve Şekil 2.21. (B)'de verilmiştir.

(A)

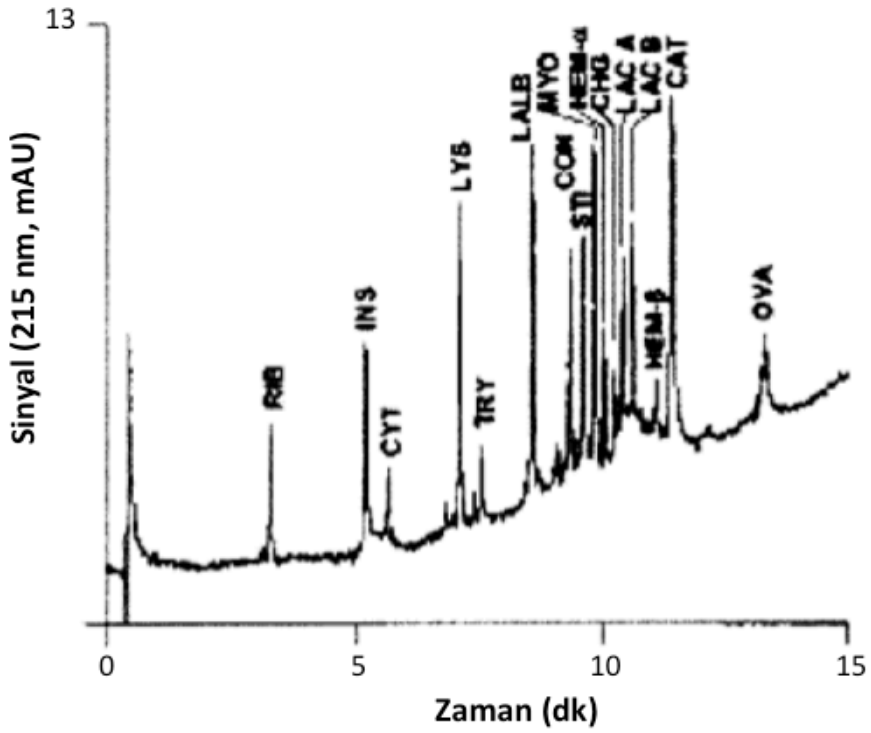


(B)



Şekil 2.21. Stirenin basamaklı zincir polimerizasyonu, (B) Stiren ile divinilbenzenin çapraz bağlanması [2].

2000 yılında Premsteller ve grubu, porojen sistemi THF ve dekanolden oluşan polimer bazlı monolit ile başarılı kromatografik ayrımlar yapmıştır [2]. Analizde mezogözenekler proteinlerin ayrımını, makrogözenekler ise analizin hızlı bir şekilde olmasını sağlamıştır. Hazırlanan bu kolon ile 16 protein 15 dakikadan az bir sürede ayrılmıştır. Şekil 2.22.'de 16 proteinin yüksek verimle ayrımı örneklenmiştir [2].

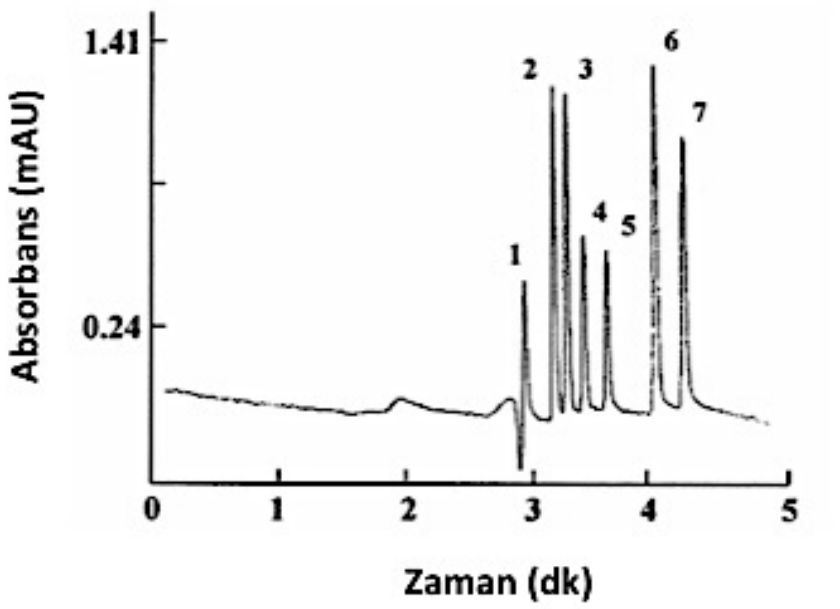


Şekil 2.22. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminde poli(sitiren-co-divilbenzen) polimerik monolit ile 16 proteinin ayrımı Sıcaklık: 80 ^{o}C, UV 214 nm, monolitik kolon 60-0.20 μm ID, Mobil faz: (A) %15 ACN % 0.20 TFA (B) % 60 ACN % 0.20 TFA lineer gradient 15. dk % 23-% 98 Akış hızı: 3.2 μl/dk [2].

2.4.3.2.3. Akrilamid Bazlı Polimerik Monolitler

Akrilamid jeller su geçirgenlikleri olmadığı için sıvı kromatografisi sistemlerinde kullanılamamalarına rağmen yıllardır elektroforez için ayırma ortamı olarak kullanılmaktadır [13]. 1996 yılında Hjerten ve araştırma grubu tarafından, vinil-sülfonik asit, piperazin diakrilamid ve sulu akrilamid çözeltisi kullanılarak CEC için akrilamid bazlı monolitik kolonlar üretilmiştir [2]. Stearil metakrilat veya bütil metakrilat da hidrofobik ligand olarak kullanılmıştır. Polimer karışımına, amonyum sülfatın parçalanması ve persülfat radikallerinin oluşması amacıyla katalizör-başlatıcı sistem olan N,N,N,N-tetrametilendiamin (TEMED) eklenmiş ve akrilamid bazlı monolitler sentezlenmiştir. Polimerizasyon, 24 saat oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [2].

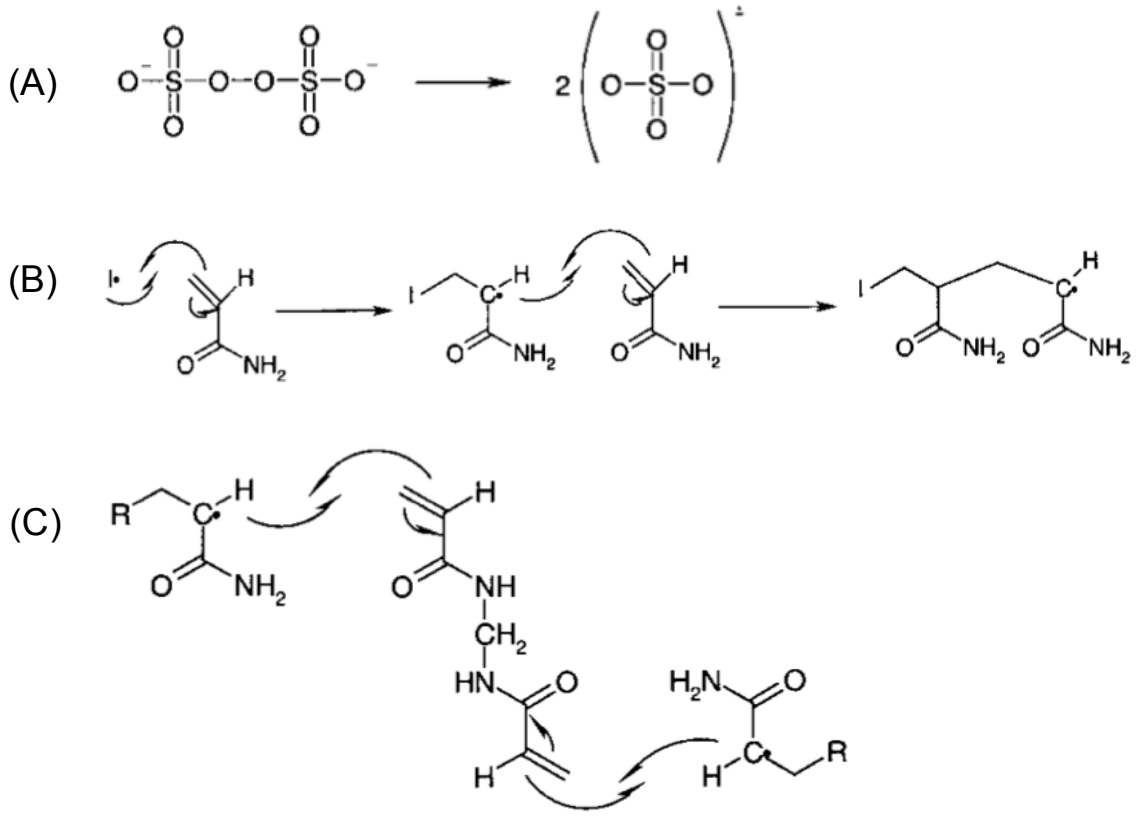
Başka bir çalışmada, akrilamid bazlı matrislere hidrofobik ligandlar bağlanıp bu kolonların tekrarlanabilirliğini test edilmiştir [113]. Tuz çözeltisi ve N-metilformamid kullanarak akrilamid, metilen bisakrilamid, akrilik asit ve C4, C6, C12 alkil akrilat içeren kolonlar sentezlenip, ters-faz kromatografisinde kullanılmıştır. Fenilketonlar için 300.000-400.000 m^{-1} civarında teorik tabaka sayılarına ulaşılmıştır. Şekil 2.23.'de Palm ve Novotny'in sentezlediği poli(akrilamid)-poli(etilen glikol) kolonla gerçekleştirilen alkil fenon türevlerinin ayrımı için örnek bir kromatogram verilmiştir [113].



Şekil 2.23. Alkil fenonların izokrotik koşullarda ayrılması. Kolon: Akrilik asitle derivatize edilmiş poli(akrilamid)-poli(etilen glikol). Etkin kolon uzunluğu: 20.5 cm, Enjeksiyon: 0.5 kV 1 s, UV 260 nm, Uygulanan voltaj: 22.5 kV, Mobil faz: % 20 ACN-% 80 10 mM Tris, 15 mM borik asit tamponu, pH 8.2, Pik sırası: (1) vitamin B, (2) anilin, (3) asetofenon, (4) propiofenon, (5) bütirofenon (6) dihidroksiaseto-fenon, (7) dihidroksipropiofenon [113].

Poli(akrilamid) bazlı kolonların yüzey fonksiyonel grupları kolaylıkla değiştiri-lebilmekte ve yüksek verimli kromtografik ayrımlar elde edilebilmektedir. Geniş pH aralıklarında kararlılık gösterebilen bu kolonlar ayrıca iyon değişim, hidrofobik etkileşim, ters faz, normal faz ve kiral kromatografi de kullanılmaktadır [2].

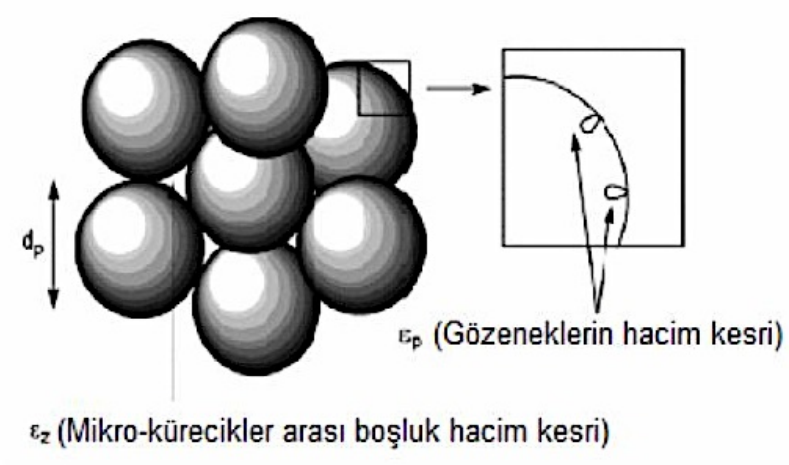
Çapraz bağlı poliakrilamid monolitik kolonların sentezi tek basamaklı bir prosestir. Kapiler kolon duvarı, öncelikle 3-(tri-metoksisilil)propil metakrilat (TPSPM) ile etkileştirilir ve yüzeyde çifte bağ oluşturulur. Akrilamid bazlı monolit, TEMED katalizor varlığında ve amonyum persülfat kullanılarak serbest radikal zincir polimerizasyonu ile elde edilmektedir. Monomer olarak akrilamid, piperazin diakrilamid, metakrilamid, çapraz bağlayıcı olarak ise N,N metilenbis(akrilamid) kullanılmaktadır. Akrilamid bazlı monolit için polimerizasyon reaksiyonları Şekil 2.24.'de gösterilmiştir [2].



Şekil 2.24. (A) Persülfat radikallerinin oluşumu (B) Akrilamidin polimerizasyonu (C) Akrilamid ile N,N metilenbis(akrilamid)'in çapraz bağlanması [2].

2.5. Monolitik Yapının Oluşmasına Etki Eden Parametreler

Monolitik yapı, ortalama bir çapa (dp) sahip mikroküreciklerin birbirlerine bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bu mikrokürecikler, monolit sentezi sırasında çok sayıda büyüyen çekirdekçiklerin birbirlerine kimyasal olarak bağlanması sonucu büyürler. Küçük boyutta çok sayıda çekirdekçik olması düşük gözenek hacminin dolayısıyla da küçük gözeneklerin oluşmasını sağlar. Toplam gözeneklilik değeri, boşluk hacim kesrinin (ε_z) ve gözenek hacim kesrinin (ε_p) toplamına eşittir ($\varepsilon_t = \varepsilon_z + \varepsilon_p$) (Şekil 2.25.). Tüm bu parametreler ve bunlara ek olarak özgül yüzey alanı, (σ) ve görünen yoğunluk, (ρ_{app}); polimerizasyon sıcaklığına, başlatıcının derişimine, monomer ve çapraz bağlayıcıların yapısına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sürekli ve gözenekli bir monolit yapısı oluşturabilmek için en az bir tip çapraz bağlayıcı ile en az iki tip gözenek yapıcıya (mikro ve makro) ihtiyaç duyulmaktadır. Gözenek yapısının oluşumuna yardımcı olması için ek monomer kullanımı kontrolü kolaylaştırmaktadır [114].



Şekil 2.25. Monolilit yapının şematik olarak gösterimi ve d_p, ε_z, ε_p'nin fiziksel anlamı [103].

2.5.1. Polimerizasyon Sıcaklığının Etkisi

Polimerizasyon sıcaklığı, polimerizasyon kinetiğini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Başlatıcı olarak kullanılan AIBN'nin stiren içindeki yarı ömrü 70 ^{o}C'de 5.7

saat iken bu süre 110 ^{o}C'de 3.2 dakikadır. Başlatıcının bozunma hızının yüksek olması, büyüyen polimer zincir sayısının daha fazla olmasına yani daha fazla faz ayrım prosesi sonucu büyüyen çekirdekçik sayısının artmasına olanak sağlamaktadır. Faz ayrım prosesi, kullanılan gözenek yapıcıların yapısına ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. "İyi" polimer çözücüler mikroporojen yapıcı; "zayıf" polimer çözücüler ise makroporojen yapıcı olarak adlandırılmaktadırlar [115].

2.5.2. Gözenek Yapıcı Sistemin Etkisi

Faz ayrımı, polimerizasyonun erken veya geç aşamalarında gözenek yapıcı bileşimine bağlı olarak tetiklenebilir. Buna göre çapraz bağlayıcı ve makrogözenek yapıcı yokluğunda polimerizasyon sonrası camsı, şeffaf bir yapı oluşabilmektedir. Gözenek yapıcı sistem, sentez için kullanılan monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların polaritesine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin apolar yapıdaki bütil metakrilat (BMA)/etilen glikol dimetakrilat (EDMA) bazlı monolitlerin hazırlanmasında siklohekzanol/dodekanol, Pr-OH/1.4-butandiol (BD) veya metanol/tetrahidrofuran (THF) gözenek yapıcı sistemler kullanılmaktadır. Bu karışımlarda alkol oranının artması monolitin makrogözenek yapısının büyümesi ile sonuçlanır. Apolar yapıdaki stiren/divinilbenzen (DVB) bazlı monolitler için de dodekanol/ THF, dodekanol/toluen veya saf dodekanol kullanılmaktadır [116]. Akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid'den türetilmiş monolitler, dimetil sülfoksit (mikro-gözenek yapıcı) ve 2-heptanol (makro-gözenek yapıcı) ile hazırlanabilmektedir [117]. Alternatif olarak EDMA veya trimetilolpropan trimetakrilat türevli sistemlerde, bu organik çözücülere ek olarak süperkritik CO_2 kullanılmaktadır. Bu yöntemde faz ayrımı monomer konsantrasyonuna bağlıdır ve monolitlerin yüzey alanları uygulanan CO_2 basıncına bağlı olarak değişim göstermektedir [13,118, 119].

2.5.3. Yapı Oluşumu

Monolitlerin sentezinde kullanılan polimerizasyon yöntemi, 'Dispersiyon polimerizasyonu' olarak geçmektedir. Polimerizasyon çöktürücü görevi gören gözenek

yapıcı varlığında başladıktan sonra oluşan polimer karışımdan ayrılır ve çözünmeyen formda çekirdekçikler oluşturur. Çapraz bağlanma prosesinin veya polimerin gözenek yapıcı karışımda çözünürlüğünün olmaması bu sonucu ortaya çıkarmaktadır. Polimerizasyonun son safhasında bile büyüyen polimer zincirlerine karşı, reaksiyona girmemiş monomer ve çapraz bağlayıcıların ilgisi gözenek yapıcılara göre daha yüksektir. Sonuçta, polimerizasyon süresi boyunca monomer ve çapraz bağlayıcılar çözeltiden çekirdekçiklerin büyüdüğü yere doğru hareket etmekte ve böylece çekirdekçiklerin büyümesini sağlamaktadır. Monomer konsantrasyonunun yüksek olması nedeniyle polimerizasyon işlemi çekirdekçiğin içinde, çözeltinin içinde olduğundan daha hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Karışım içindeki dallanmış veya çapraz bağlanmış polimer zincirleri, çekirdekçik tarafından alıkonur ve böylece çekirdekçik boyutunu arttırmış olur. Çekirdekçikler yüzeylerine yerleşmiş olan reaktif gruplar sayesinde bir araya gelmektedir (kopolimerizasyon). Polimerizasyon işleminin sonuna doğru küçük agregat yapılar, mikroküreciklerin birbirleriyle kimyasal olarak bağlanması sonucu sürekli ve birbirine bağlı bir faz meydana getirmek için yeterli büyüklüğe ulaşmaktadır. Sonunda büyük çaplı mikroküreciklerden oluşan ve geniş boşluk hacmine sahip bir monolitik sistem meydana gelmektedir. Bu sistemde boşluk hacim kesri yaklaşık olarak başlangıç karışımındaki gözenek yapıcının hacim kesrine eşittir. Monomer dönüşümünün kantitatif olmadığı durumlarda sapmalar gözlenebilmektedir [120]. Gözenek oluşumu büyüyen polimer zincirlerinin çözücü içindeki çözünürlüğünün sonucu olarak meydana geldiğinden, benzer monomerlerin gözenek oluşumunda aynı etkiyi göstermesi şaşırtıcı değildir. Çözünürlük ve faz ayrımının gözenek yapıcı sistem üzerine etkileri tanımlanmış olmasına rağmen gözenek boy dağılımının hala tesadüf sonucu elde edildiği düşünülmektedir [121].

2.5.4. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü

Serbest radikal polimerizasyon sonucu sentezlenen monolitin gözeneklilik özelliklerinin kontrol edilmesini sağlayan en önemli faktör polimerizasyon sıcaklığıdır. Polimerizasyon sıcaklığının artması ile küçük gözeneklerin oluşumu artmaktadır. Bu genelleme stiren ve metakrilat bazlı bazlı monolitler için geçerlidir. Bu durum, artan sıcaklık ile büyüyen polimer zincirlerinin dolayısıyla çözünmeyen formda

çekirdekçiklerin artmasının bir sonucudur. Çekirdekçiklerin sayılarındaki artış, boyutlarının küçülmesine yol açmaktadır. Böylece bu çekirdekçiklerden meydana gelen mikroküreciklerin gözenek çapları daha küçük boyutta olmaktadır. Buna ek olarak, gözenek yapıcı çözeltinin bileşimi de gözeneklilik kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Çözeltide makrogözenek yapıcının fazla oranda bulunması ortalama gözenek çapını arttırmaktadır. Bu durum sıcaklık artışı ile dengelenmekte ve böylece gözenek çapı küçültülmektedir. Gözeneklilik kontro-lünde kullanılan bir başka faktörde monomer/çapraz bağlayıcı oranıdır. Çapraz bağlayıcı miktarının artması ile polimerizasyonun ilk safhalarında çapraz bağlanma oranında artış ve erken faz ayrımı gözlenmektedir. Bu durum, küçük çekirdeklerin çözücü ve/veya monomer ile şişme kapasitesinde azalma olması ve küçük gözenekli mikro-küreciklerin oluşması ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla, yüksek mikrogö-zenek yapısına ve 800 m^2/g'a kadar çıkan yüksek yüzey alanına sahip yapıların oluşmasını sağlanır [122].

2.5.5. Fonksiyonel Grupların Bağlanması

Saf hidrokarbon ve akrilat bazlı monolitler ile başarılı kromatografik ayrımlar elde edilmesine rağmen, ayırma ve heterojen katalizleme gibi özel uygulamalarda fonksiyonel grupların varlığı büyük önem taşımaktadır. Genel olarak fonksiyonel grupların bağlanması için 3 farklı yol izlenmektedir. Bunlar; (i) fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonu, (ii) polimerizasyon sonrası fonksiyonel grupların bağlanması, (iii) moleküler baskılama yöntemidir [103].

2.5.5.1. Fonksiyonel Monomerlerin Kopolimerizasyonu

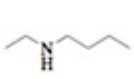
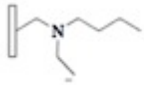
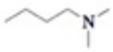
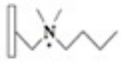
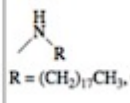
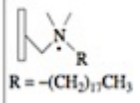
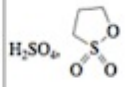
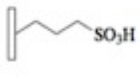
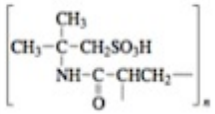
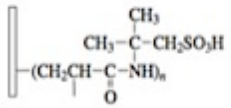
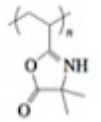
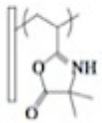
Fonksiyonel grupları, monolit yüzeyinde oluşturmanın en kolay yöntemi, fonksiyonel monomerlerin kopolimerleştirilmesi ile elde edilmektedir. Bu yöntemde; AMPS, vinilsülfonik asit, zwitteriyonik sülfobetainler, 2-vinil-4,4-dimetilazlakton, kiral kinidin bazlı monomerler, dimetilaminoetil metakrilat veya C-18 silika bazlı malzemelerin taklidi için oktilmetakrilat kullanılmaktadır. Zwitteriyonik fazlar, hem asidik hem de bazik metakrilik monomerlerin kullanımı ile elde edilebilmektedir. Divinilbenzen türevli monolitik yapılarda, vinilpiridin komonomer olarak kullanıl-

maktadır. Basitliğine rağmen, bu yöntem bazı dezavantajları beraberinde getirmektedir. Bunlardan ilki, gözeneklilik bakımından istenilen yapı oluşturulurken polaritedeki değişim nedeniyle kullanılan monomerlerin farklılaşması yüzünden monolit sentezinde yeniden düzenleme yapılması gerekliliğidir. İkincisi, fonksiyonel monomerlerin önemli bir kısmının çoğunlukla gözeneksiz mikroküreciklер içerisine birikmesidir. Bunun sonucunda gradient koşullarda çalışılırken istenmeyen şişmeler ortaya çıkabilmektedir [123].

2.5.5.2. Polimerizasyon Sonrası Fonksiyonel Grupların Bağlanması

Reaktif polimerik monolitler, uygun ligandlar kullanılarak afinite kromatografisi, proteomiks çalışmaları, immobilize enzim reaktörlerinin hazırlanması, enzim aktivitesinin incelenmesi, kiral analizler ve daha pek çok uygulamalarda kullanılmaktadır [124]. Şekil 2.26.'da bu amaçla sıklıkla kullanılan fonksiyonel gruplar gösterilmiştir. Çeşitli fonksiyonlaştırma reaksiyonlarına olanak sağlaması ve reaktif epoksi halkasına sahip olmasından dolayı modifikasyon için monolitik kolon hazırlamada en yaygın kullanılan monomer glisidil metakrilat (GMA) monomeridir. Bu monomer ile anyonik ve katyonik sabit fazlar hazırlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, glisidil metakrilat, metil metakrilat ve etilen dimetakrilat ile polimerleştirilip, N-etilbütilamin ile fonksiyonelleştirilmiş ve yüzeyde tersiyer amin gruplarının oluşması sağlanmıştır. Hazırlanan monolitik kolonlar ile protein karışımının ve angiotensinlerin analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir [29]. Fonksiyonel grup bağlanmış polistiren bazlı monolitik kolonlar ile de literatürde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Stiren bazlı monolitlerde 4-klorometilstiren, polimerizasyon sonrası fonksiyonel grupların bağlanmasında en çok kullanılan monomerdir. Örneğin bir çalışmada, vinilbenzil klorür ve divinilbenzen kopolimerleştirilmiş ve ardından sabit fazın yüzeyindeki vinilbenzil gruplarına N,N-dimetiloktilamin bağlanmıştır [111]. Aynı şekilde, poli(vinilbütilkloroetilenglikol dimetakrilat) monolit, N,N-dimetiloktilamin ile fonksiyonelleştirilmiş ve sentetik peptitlerin ve proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir [125]. Fonksiyonel grupların bağlanmasında alternatif olarak kullanılan diğer bir yöntem de aşılamadır. Bu yöntemin en önemli avantajı monolitin tek bir monomer/çapraz bağlayıcı/gözenek yapıcı sistem kullanılarak hazırlanmasıdır. Ayrıca, aşılama prosedürü boyunca

monolitin polaritesinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır. Bu da özellikle ayırma prosesleri için önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada, poli(bütil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(BMA-co-EDMA), bazlı monolitler, 2-vinil-4,4-dimetilazlakton ile fonksiyonelleştirilmiş ve tripsin'in immobilizasyonu incelenmiştir [126]. Başka bir çalışmada, poli(BMA-co-EDMA) monolitik kolonun yüzey aşılanması için foto-aşılanma yöntemi, monolit üzerinde iyonlaşabilen ve EOF oluşmasını sağlayan bir monomer olan AMPS kullanılarak gerçekleştirilmiştir Daha sonra oluşan bu tabakanın üzerine ikinci tabakanın oluşması için hidrofobik bir monomer olan bütilakrilat aşılanmıştır. Bu tabaka, iyonik analitlerin iyonik tabakalar ile etkileşimi engellemiştir. Böylece bu analitler ile çok kısa sürelerde analizler gerçekleştirilmiştir [127]. Aşılama yöntemi ile yapılan başka başarı bir çalışmada, 2-akrilamid-2-metil-1-propan-sülfonik asit ve 4,4-dimetil-2-vinilazolakton kullanılmış ve monolitin EOF davranışı test edilmiştir [128].

Reaktif	Reaktifin yapısı	Fonksiyonelleştirme sonrası monolit yüzeyi	Referans
N-Etilbütilamin			[29]
N,N,-Dimetiloktilamin			[111]
N,N,-Dimetilbütilamin			[120]
N-Metiloktadesilamin-Iyodometan			[75]
1-Hidroksipropan-3-sulfonik asit lakton			[127]
Poli(2-akrilamid-2-metil-1-propan-sülfonik asit)			[128]
Poli(4,4-dimetil-2-vinilazlakton)			[128]

Şekil 2.26. Polimerizasyon sonrasında monolitlerin fonsiyonelleştirilmesi için sıklıkla kullanılan reaktifler [129].

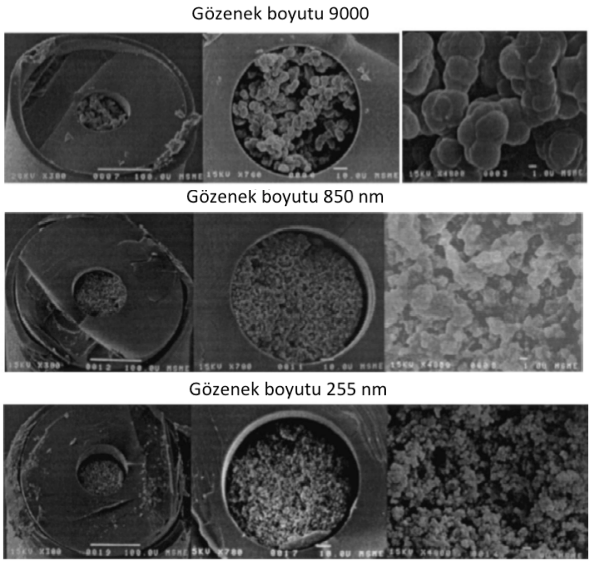
2.5.5.3. Baskılama Yöntemi

Bakılama yöntemi 2-triflorometilakrilik asit/etilen dimetakrilat bazlı monolitlerde uygulanmaktadır. Bu monolitik yapıda makrogözenek yapıcı olarak 1-dodekanol, mikrogözenek yapıcı olarak ise siklohekzanol kullanılmaktadır. Akrilik asit/etilen dimetakrilat bazlı monolitlerde kiral aminler kullanılarak baskılama yöntemi yapılmıştır. Böylece enantiyomer ayrımına olanak sağlayan ve seçicilik faktörü 1.4 ve 1.7 arasında değişen sabit faz elde edilmiştir [130].

2.6. Monolit Özelliklerinin CEC'de Ayırma Üzerine Etkisi

2.6.1. Gözenek Boyutu ve Verimlilik

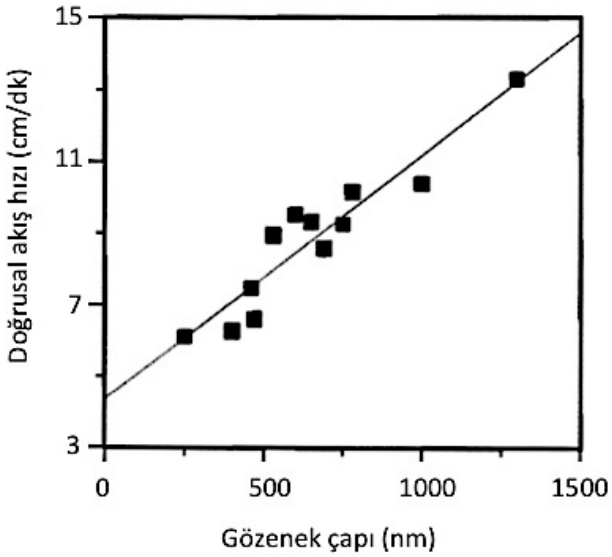
Bölüm 2.2., Eşitlik 2.3.'de görüldüğü gibi, EOF hızı ile dolgu malzemesinin boyutu veya gözenek çapı arasında bağlantı yoktur. CEC ve HPLC sisteminde partikül dolgulu kolonlarda, kolon verimliliği, partikül boyutu ile ters orantılı olarak değişmektedir. Monolitik kolonlarda partikül çapından bahsedilemediği için, gözenek kontrolünde partikül boyutu yerine polimerizasyon koşullarının optimizasyonu önem taşımaktadır. Polimerizasyon koşulları kolon verimliliğini önemli ölçüde etkilemektedir [128]. Şekil 2.27.'de farklı gözenek boyutlarına sahip monolitik kolonların SEM fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 2.27. Farklı gözenek boyutlarına sahip monolitik kolonların SEM fotoğrafları [98].

2.6.2. Monolitik Kolon Boyunca Çözelti Akışı

Bölüm 2.2.'de verilen Eşitlik 2.3.'den anlaşılacağı üzere EOF, partikül çapından ve partiküller arası boşluklardan bağımsızdır. Fakat literatürde belirtilen bu genel yaklaşım bazen yanıltıcı olabilmektedir. Bunun nedenlerinden biri CEC sistemi ile yapılan ilk çalışmalarda akışa karşı oluşan direnç ile ilgili herhangi bilginin olmamasıdır. Çünkü çok küçük gözenekli ve gözeneksiz silika bazlı monolitlerde direnç ölçümü zordur. Sabit fazın partikül boyutundaki azalma partikül yüzey alanının artmasına, bu da yüzeydeki toplam silanol gruplarının sayısındaki artışa sebep olmaktadır. Yüzeydeki silanol gruplarının sayısındaki artış EOF hızını da artırmaktadır. Partikül boyutundaki azalmanın neden olduğu akışa karşı oluşan direnç, artan EOF hızı ile dengelenmektedir. Ancak yine de partikül dolgulu kolonlarda monolitik kolonlara göre EOF'de %60'lık bir düşüş gözlenmektedir [131]. Metakrilat ester bazlı monolitik kolonlarda gözenek çapı ve fonksiyonel grup derişimi kontrolünün kolay yapılabilmesi, taşınımın gerçekleştiği kanal büyüklüklerinin akış hızı üzerindeki etkisinin gözlenmesine imkan sağlamaktadır. Şekil 2.28.'de gözenek boyutunun 250 nm'den 1300 nm'ye çıkarılması ile akış hızında 2 kat artışın olduğu açıkça görülmektedir [98].

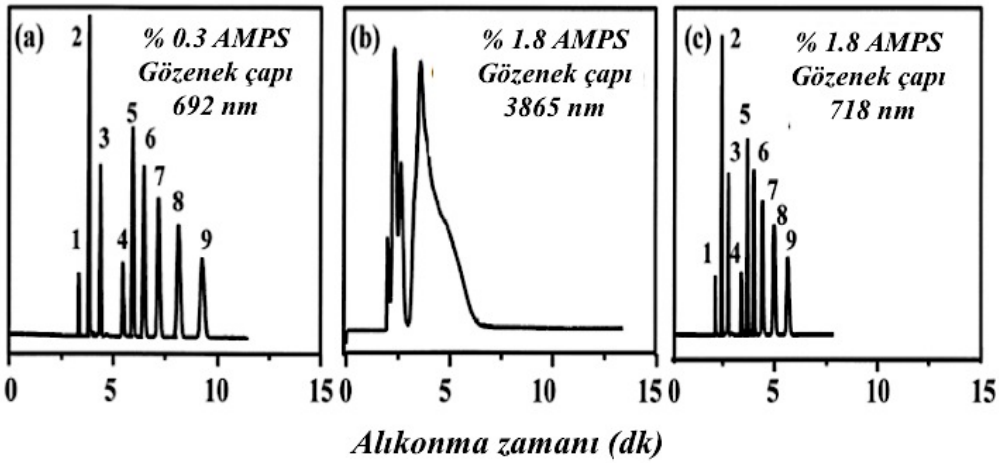


Şekil 2.28. Gözenek boyutunun kolon boyunca mobil faz akış hızı üzerine etkisi [98].

2.6.3. Yüzey Kimyasının Kontrolü

2.6.3.1. Yüklü Grupların Fonksiyonel Forma Dönüştürülmesi

EOF, elektrokinetik yük yoğunluğunun bir fonksiyonu olan zeta potansiyeli ile doğru orantılı olarak değişmektedir [69]. Yüzeydeki yük yoğunluğu, kullanılan mobil fazın pH'ından etkilenmektedir. Silika bazlı monolitik kolonlar, pH değişimi ile kararlılıklarını koruyamamaktadır. Yüksek pH (pH>8) değerleri ile çalışıldığında başlangıçta EOF artsa bile bir süre sonra hidroliz gerçekleşmekte ve kromatografik ortam bozulmaktadır. Bunların aksine, EOF'i destekleyen yüzeydeki yük yoğunluğunun kolay ayarlanabilmesi polimer bazlı monolitik kolonların temel avantajlarından biridir. Yük yoğunluğu, iyonlaşabilen monomerin polimer çözeltisindeki miktarının değiştirilmesi ile kontrol edilmektedir. Örneğin metakrilat ester bazlı monolitlerde sülfonik asit içeriğinin artışı ile analiz süresi ve elektrokromatografik analizlerin performansı incelenmiştir. Porojen ve çapraz bağlayıcı bileşimi sabit tutularak ve farklı AMPS derişimleri kullanılarak (% 0.3, 0.6, 1.2, 1.8) hazırlanan monolitik kolonlar ile yapılan analizlerin sonucunda AMPS derişimi arttıkça analiz süresi kısalmıştır [69].



Şekil 2.29. Polimer bazlı monolitik kapilerlerde AMPS derişimi ve gözenek çapının elektrokromatografik performans üzerine etkisi. Kolon: 100 μm iç çap x 30 cm etkin uzunluk [69].

Fakat gözenek çapının artmasından dolayı analit-sabit faz arasındaki etkileşim azaldığı için kromatografik performansında düşüş gözlenmiştir. Bunun üzerine, AMPS derişimi arttırılırken gözenek çapının aynı kalması için gözenek yapıcı derişimi değiştirilmiştir. Yeni kolon ile analiz süresinin azaldığı ve başarılı kromatografik ayrımın elde edildiği görülmüştür (Şekil 2.29.)

2.6.3.2. Alıkonma ve Seçicilik

CEC sistemlerinde ters faz modda sabit fazın hidrofobisitesi ayrımdaki seçiciliği belirlemektedir. Analitlerin alıkonma zamanı yüzeyin hidrofobisitesi ve mobil fazın bileşimi ile farklılık göstermektedir. Mobil fazın bileşimini değiştirmek daha kolay olduğundan sabit fazın yüzey kimyası ile daha az oynanmaktadır. CEC analizlerinde, yüksek dielektrik sabitine ve düşük viskoziteye sahip olmasından dolayı ACN içeren çözeltiler tercih edilmektedir [91].

2.7. CEC Uygulamaları

Son yıllarda CEC ile yapılan biyokromatografik uygulamalar giderek yaygınlaşmaktadır. Proteomiks, ilaç alanı, doğal ve kiral maddeler üzerine yapılan CEC çalışmaları üzerine ilgi artmaktadır [102,132-135].

2.7.1. Akiral Analizler

CEC sistemi yüksek verimlilik ve kısa analiz süresi gibi özellikleri ile HPLC sistemine göre üstünlük sağlamaktadır. Bu özellikler sayesinde çevresel analizlerde ilaç ve tekstil sektöründe uygulamalar giderek artmaktadır. İlk çalışmalarda CEC sisteminde sabit fazın kolayca iyonlaşmasını sağlayan ve pH değeri 8 olan mobil faz kullanımı ile kolayca ayrılabilen nötral analitlerin analizleri yapılabilmekteydi. Ancak çalışmalar ilerledikçe yüklü veya nötral tüm maddelerin ayrımı CEC sisteminde başarıyla elde edilebilmektedir [136].

Çevresel uygulamalar: CEC sisteminde çoklu halkasal aromatik hidrokarbonların (PAH), triazin herbisidlerin, benzen türevlerinin ve fitalatların ayrımları yaygın olarak yapılmaktadır [137].

İlaç Sanayisinde Kullanımı: İlaç alanında steroidlerin, diüretiklerin, sefalosporin antibiyotiklerin, prostaglandinlerin, makrositillaktonların, C- and N- korumalı peptidlerin, nükleosidlerin, fitalatların ve parabenlerin ayrımı CEC sisteminde gerçekleştirilebilmektedir. Bu ayrımlar ters faz modda çalışan monolitik kolonlar ile elde edilmiştir [138].

Diğer uygulamalar: CEC sistemi, iyonik olmayan, suda çözülebilen tekstil boyalarının ve gıda sektöründe karbohidratların, amino asitlerin, proteinlerin, vitaminlerin ve çeşitli katkı maddelerinin analizleri için de kullanılmaktadır [81,139].

Asidik analitler: Anyonik analitler EOF akışına karşı anoda doğru hareket etme eğiliminde oldukları için kolon içerisinde çok oyalanmayıp kolonu hızlıca terk ederler. Bu nedenle asidik analitlerin ayrımında mobil fazın pH değeri 2.5 civarında

olmaktadır. Böylece analitlerin mobil faz içerisinde iyonlaşmaları önlenip ayrımları gerçekleştirilmiş olur. İyonlaşma düşük pH değerlerinde daha az olduğu için EOF'un düştüğü görülmüştür. Tüm bu sonuçlar ışığında, pH 2.5 değerinde daha başarılı kromatografik analizlerin elde edildiği anlaşılmıştır [54].

Bazik analitler: Ters faz modda çalışılan kolonlar ile bazik analitlerin ayrımı zor olmaktadır. Bu nedenle bu analitlerin ayrımı için daha çok sabit faz ile çoklıu etkileşim içinde olabilen monolitik kolonlar hazırlanmaktadır. Kullanılan mobil fazın pH değeri 2.5-7.8 arasında değişmektedir [54].

2.7.2. Kiral Analizler

Farklı biyoortamlarda bulunan enantiyomerler farklı biyolojik aktiviteye sahip olmaları için CE, CEC, HPLC gibi sistemlerde yaygın olarak kiral ayırma uygulamaları yapılmıştır [140]. Bu çalışmalar genellikle uygun kiral kolon kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Kiral CEC uygulamaları, hareketsiz protein ve siklodekstrin fazların kullanımı ile yapılmaktadır.

Protein fazlar: Nötral ve katyonik enantiomerlerin ayrımında silika bazlı dolgu materyali kullanılmaktadır [54,99]. Bu amaçla sabit faz, 5 μm çapında silika üzerine alfa-1-asit glikoprotein (AGP) bağlanmasıyla sentezlenmiştir. Çalışma sonucunda CEC sistemi, HPLC sistemine göre daha verimli sonuçlar vermiştir [54,99]. Birçok sayıda nötral ve benzodiazepin analitlerin ayrımı için sabit faz 7 μm çapında silika üzerine insan serum albümini (BSA) bağlanarak elde edilmiştir. Fakat BSA kolonun verimlilik değerlerinin, AGP kolonlara göre çok düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle protein fazlı kolonlar CEC sistemlerinde yaygın olarak kullanılmamaktadır [99].

Siklodekstrin fazlar: Nötral ve bazik ilaçların enantiomerik ayrımı uygun mobil faz varlığında hidroksipropil-β-siklo-dekstrin-HPβCD kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Protein fazlı kolonlara göre daha yüksek verim değerleri elde edilmiştir. Ancak bu kolonlarda analiz süresi uzamıştır [137].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında CEC sistemi için polimerik yapıda yeni monolitik kolonlar sentezlenmiş, uygun mobil faz geçirgenliği ve gözenek özelliği sağladığı görülen kolonların kromatografik performansları değerlendirilmiştir. Bu amaçla, literatürde bulunmayan hidrofilik özellikte metakrilat bazlı monomer ve farklı molekül büyüklüğüne sahip çapraz bağlayıcılar seçilerek monolitik yapılar elde edilmiştir. Metakrilat bazlı yeni monolitler literatürde ilk kez elde edilmiş ve termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir.

Kapiler formdaki metakrilat bazlı monolitlerin sentezi için monomer olarak 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl), çapraz bağlayıcı olarak gliserol dimetakrilat (GDMA), etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve 1,4-bütandiol dimetakrilat (BDDA) kullanılmıştır. Gözenek yapıcı solvent olarak İso-PrOH/Dec-OH sistemi kullanılmıştır. Sentezlerde monomer ve çapraz bağlayıcı mol oranları sabit tutulmuş, gözenek yapıcı solvent bileşimi değiştirilmiştir. Sentez koşulları değiştirilerek elde edilen kolonların mobil faz geçirgenliği mikro sıvı kromatografisi (μ-LC) sisteminde uygun akış hızlarında test edildikten sonra monolit üzerindeki reaktif klor grubu üzerinden türevlendirme yöntemiyle sodyum bisülfit ($NaHSO_3$) ve polietilenimin (PEI) ligand olarak bağlanarak CEC sisteminde farklı ayırma ortamları elde edilmiştir. Sentezlenen sabit fazlar literatürdeki diğer kolonlarla karşılaştırılarak avantajları ortaya konmuştur.

3.1. CEC Sistemi İçin Geliştirilen Kapiler Monolitik Kolonların Hazırlanması

3.1.1. Materyal

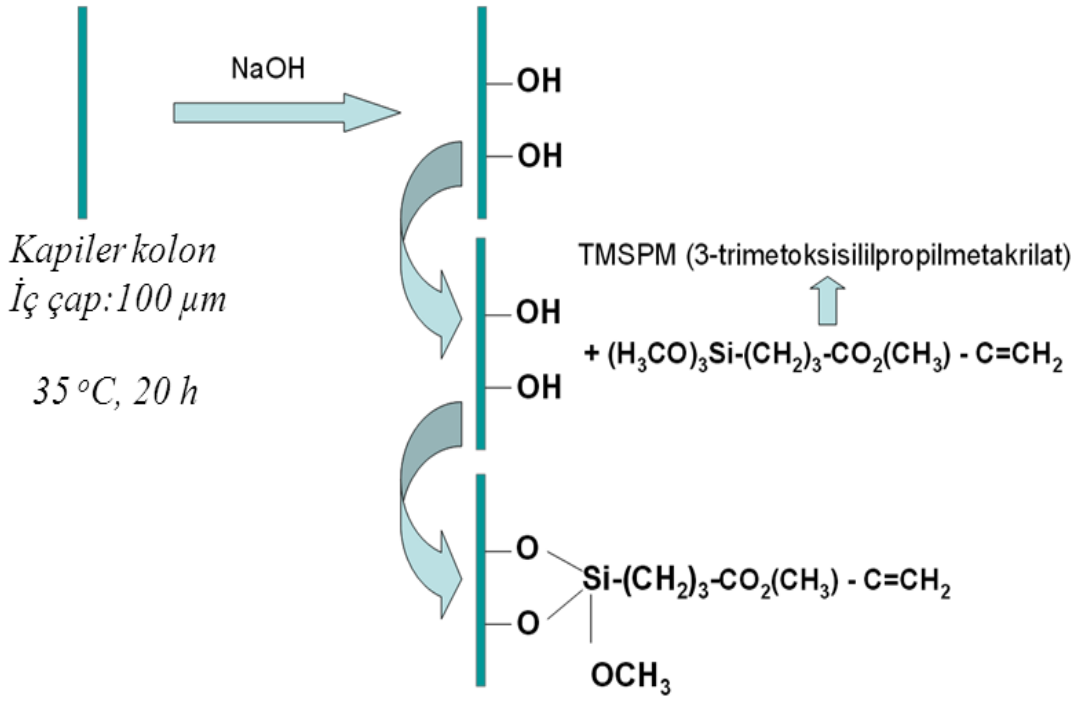
Kolonların sentezinde monomer olarak HPMA-Cl (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.), AMPS (2-akrilamido, 2-metilpropan sülfonik asit), çapraz bağlayıcı olarak EDMA, BDDA ve GDMA (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.) ve silanlama ajanı 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM) (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.) alındığı şekliyle kullanılmıştır.

Gözenek yapıcı çözelti bileşenlerinden İso-PrOH Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den ve Dec-OH, Merck AG, Almanya'dan temin edilmiştir. Monolit sentezinde başlatıcı olarak 2,2-azobisizobutironitril (AIBN) (Merck AG, Almanya) kullanılmadan önce methanol ile kristalize edilmiştir. Monolitlerin sentez sonrası yıkanması amacıyla mobil faz olarak mutlak etanol (Riedel de Haen, Almanya) ve kromatografik çalışmalarda yine aynı firmadan temin edilen yüksek saflıkta (HPLC grade) ACN kullanılmıştır. Fosfat tamponu, potasyum dihidrojen fosfat (Merck A.G. Almanya) ve potasyum hidrojen fosfat (Merck A.G. Almanya) ile hazırlanmıştır. Kromatografik çalışmalarda distile-deiyonize su kullanılmıştır. Kromatografik ayrımları gerçekleştirilen alkilbenzen türevleri (benzen, etilbenzen, propilbenzen, bütilbenzen, pentilbenzen), fenolik bileşikler (katekol, benzaldehit, fenol, katekol, p-kresol, 3-nitrofenol), nükleosid ve nükleotit karışımı (timidin, inosin, adenozin, sitidin, adenin), çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar (PAH), (fenantren, naftalin, piren) ve kolonda alıkonmayan analit olarak tiyoüre, Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den toluen ise Riedel de Haen, Almanya'dan temin edilmiştir. Polimerik malzemenin sentezlendiği 100 µm iç çapa 360 µm dış çapa sahip silika kolonlar, Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, A.B.D.)'den sağlanmıştır. Seçilen ligandlar, sodyum bisülfit ($NaHSO_3$) ve polietilenimin (PEI) Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kapiler Tüplerin Monolit Sentezine Uygun Forma Getirilmesi

Monolit sentezinin başarıyla gerçekleştirilebilmesi için monolitlerin kolon duvarına iyi bağlanması gerekmektedir. Bu nedenle kolon duvarı, monolit sentezi için uygun hale getirilmelidir. Bunun için gerçekleştirilen kolon modifikasyon işlemi silanizasyon olarak adlandırılır. Deneysel çalışmalarda kullanılan silika kapiler kolonların toplam uzunluğu 40 cm ve etkin uzunluğu (monolit içeren kısım) 30 cm olarak ayarlanmıştır. Kesilen kapiler öncelikle şırınga pompasına bağlanarak 500 µL/dk akış hızıyla, 1.5 saat süreyle 0.2 M NaOH çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından yıkama işlemi distile-deiyonize su kullanılarak yine 500 µL/dk akış hızıyla 30 dakika süreyle devam ettirilmiştir.

Takiben 500 µL/dk akış hızıyla, 30 dakika boyunca metanol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki adımda silika kapiler, saf azot tüpünün regülatörüne bağlanarak içinden 2 atm basınçta 30 dakika süreyle N_2 geçirilmiştir. Silika kapiler duvarı üzerinde kovalent bağlı metakrilat gruplarının oluşturulabilmesi amacıyla, kapiler hacimce % 50 oranında TMSPM ve % 50 oranında metanol içeren çözelti ile oda sıcaklığında 500 µL/dk akış hızıyla 30 dakika süreyle yıkanmıştır. Akış durdurularak, kapilerin her iki ucu bir septum ile kapatılmış ve içi TMSPM çözeltisi ile dolu olan kapiler 35 ^{o}C'daki su banyosu içerisine yerleştirilerek, 20 saat süreyle bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Böylece kolon iç yüzeyindeki hidroksil grupları ile TMSPM'nin 3-trimetoksisilil grupları arasında reaksiyon gerçekleşmiş, bu reaksiyon sonucu silika yüzeyinde kimyasal bağlı ve polimerleşebilir metakrilat grupları oluşması sağlanmıştır (Şekil 3.1.). Duvardaki metakrilat grupları, monolit oluşumu sırasında polimerizasyona katılmakta ve oluşan polimerik formdaki monolitin kovalent yolla kapiler duvara bağlanmasını sağlamaktadır.

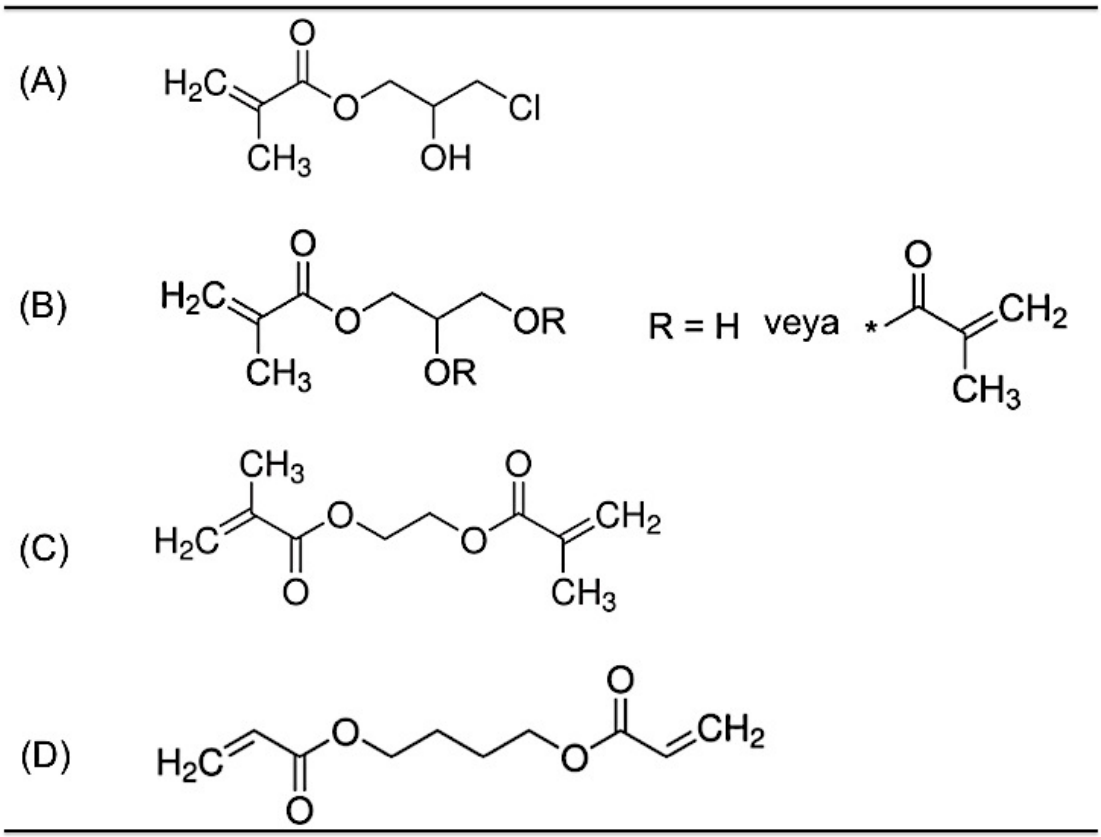


Şekil 3.1. Silika duvardaki hidroksil ve trimetoksisilil grupları arasında gerçekleşen reaksiyon.

Reaksiyon sonrasında silika kapiler, metanol ile 500 μL/dk akış hızıyla 30 dakika süreyle yıkanmış ve 30 dakika süreyle içinden 2 atm basınçta N_2 geçirilerek kurutulmuştur.

3.1.3. Monolit Sentezi

Termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen monolitler için seçilen monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Monolit sentezinde kullanılan (A) HPMA-Cl monomerinin ve (B) GDMA (C) EDMA (D) BDDA çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları [141].

Monomer (HPMA-Cl), çapraz bağlayıcı (GDMA, EDMA, BDDA), gözenek yapıcı solventler (İso-PrOH/Dec-OH) ve polimerizasyon başlatıcısı (AIBN) içeren çözelti, ultrasonik banyoda 5 dakika soniklenerek homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan döküm çözeltisi, CEC sisteminde giriş vialine konulup 20 mbar pozitif basınç

uygulanarak dik şekilde yerleştirilen silika kolondan 2-3 dk süreyle geçirilmiştir. Bu süre dolduğunda giriş vialine geri basınç uygulanarak çözeltinin belli etkin kolon uzunluğuna (30 cm) ulaşması sağlanmıştır. Bu yüksekliğe inildiğinde uygulanan basınç durdurularak kolonun iki ucu GC septumla kapatılmış ve kolon, 50 ^{o}C sıcaklık kontrollü su banyosuna 20 saat süreyle polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon sonrası monolitten dönüşmemiş monomerin ve gözenek yapıcı solventin uzaklaştırılması amacıyla, kolon Nano-LC sistemine bağlanarak uygun akış hızında etanol ile 2 saat süreyle yıkanmıştır. Ardından kolon yine aynı akış hızında 1 saat süreyle distile-deiyonize su ile yıkanmıştır. Gözetleme penceresinin oluşturulması için kapiler kolonun belirlenen yerine 2 mm'lik açıklığa sahip bir alüminyum maske yerleştirilmiş ve bu açıklık bir elektrikli ısı kaynağı ile yakılmıştır. İşlemden sonra aynı mobil faz ile monolit küllerinin kolondan atılması amacı ile yıkama işlemine 1 saat süreyle devam edilmiştir. Akrilat bazlı monolitlerin sentez koşulları Çizelge 3.1.'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi monomer ve çapraz bağlayıcı mol değerleri sabit tutulan monolitlerin, kimyasal yapılarındaki farklılık kullanılan porojen sistemlerinin mol oranlarındaki değişiklikten kaynaklanmaktadır.

Çizelge 3.1. Farklı monomer ve İso-PrOH ve Dec-OH derişimleri ile hazırlanan metakrilat bazlı monolitlerin sentez koşulları

HPMA-Cl (mL)	**GDMA (mL)**	**İso-PrOH (mL)**	**Dec-OH (mL)**	**AIBN (mg)**
0.10	0.90	1.50	2.50	10
0.10	0.90	1.25	2.75	10
0.10	0.90	1.00	3.00	10

HPMA-Cl (mL)	EDMA (mL)	İso-PrOH (mL)	Dec-OH (mL)	AIBN (mg)
0.050	0.95	2.00	2.00	10
0.100	0.90	2.00	2.00	10
0.200	0.80	2.00	2.00	10
0.400	0.60	2.20	1.80	10
0.500	0.50	2.20	1.80	10
0.600	0.40	1.20	2.80	10

HPMA-Cl (mL)	BDDA (mL)	İso-PrOH (mL)	Dec-OH (mL)	AIBN (mg)
0.10	0.90	1.50	2.50	10
0.10	0.90	1.75	2.25	10
0.10	0.90	2.25	1.75	10

HPMA-Cl: 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat, GDMA: Gliserol dimetakrilat, EDMA: Etilen dimetakrilat, BDDA: 1-4 Bütandiol dimetakrilat,AIBN: 2,2-azobisizo-butironitril, İso-PrOH: İzopropil alkol, Dec-OH: Dekanol. Sıcaklık: 50 ^{o}C, Polime-rizasyon süresi: 20 saat.

Elektriksel iletkenliği sağlayan monomerin, monolitin morfolojik yapısı üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için farklı AMPS derişimlerinde poli(AMPS-co-EDMA) monolitleri sentezlenmiştir. Bu amaçla EDMA model çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir. Sentez koşulları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi monomer ve çapraz bağlayıcı mol değerleri sabit tutulan monolitlerin kimyasal yapılarındaki farklılık, kullanılan gözenek yapıcı sistemlerin bileşimindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Çizelge 3.2. Farklı AMPS derişimleri ile hazırlanan monolitlerin sentez koşulları

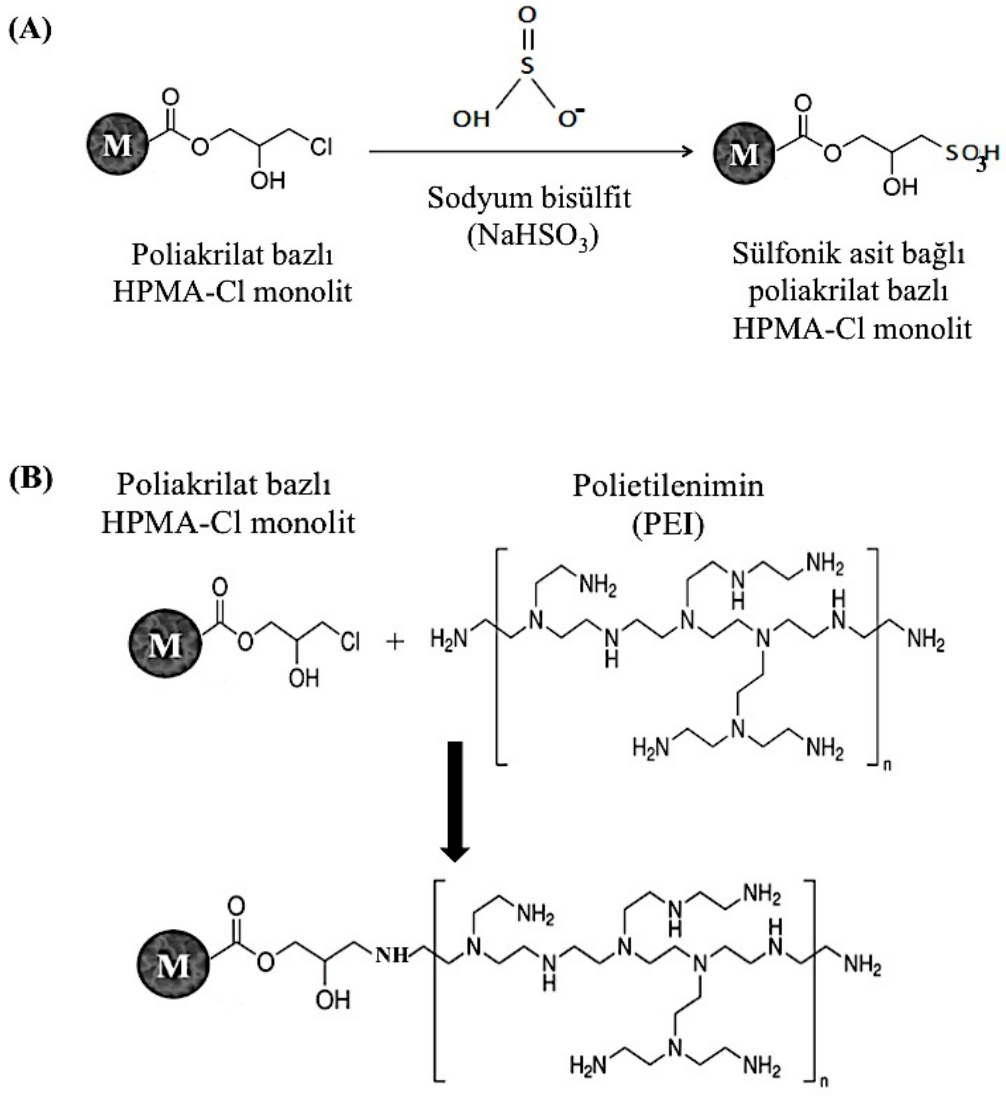
AMPS (mL)	EDMA (mL)	İso-PrOH (mL)	Dec-OH (mL)	AIBN (mg)
0.03	0.97	2.00	2.00	10
0.06	0.94	2.00	2.00	10
0.10	0.90	2.00	2.00	10
0.20	0.80	2.00	2.00	10

AMPS: 2-akrilamido, 2-metilpropan sülfonik asit, EDMA: Etilen dimetakrilat, AIBN: 2,2 azobisizobutironitril, İso-PrOH: İzopropil alkol, Dec-OH: Dekanol. Sıcaklık: 50 ^{o}C, Polimerizasyon süresi: 20 saat.

3.1.4. HPMA-Cl Bazlı Monolitlerin Sodyum Bisülfit ($NaHSO_3$) ve Polietilenimin (PEI) ile fonksiyonelleştirilmesi

Literatürde GMA bazlı monolitik kapiler kolonlar hazırlanmış ve ayrımı hedeflenen moleküllere özgü kromatografik ligandlar kullanılarak kimyasal modifikasyonları yapılmıştır [129]. Tez kapsamında literatürde ilk olarak HPMA-Cl bazlı yeni bir reaktif monolit hazırlanmış, sodyum bisülfit ($NaHSO_3$) ve polietilenimin (PEI) ile etkileştirilerek monolit yüzeyinde sırasıyla anyonik (katyon değiştirici) ve katyonik (anyon değiştirici) grupların oluşması sağlanmıştır. Kullanılan ligandların bağlanma reaksiyonu Şekil 3.3.'de gösterilmektedir. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitlerin $NaHSO_3$ ile türevlendirilmesinde, monolit HPLC pompasına bağlanmış 80 ^{o}C'de tutulan su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. % 2 $NaHSO_3$ içeren sulu çözelti (% w/w), HPLC pompası yardımıyla sıcak su banyosunda bulunan monolitten 0.025 μL/dk akış hızıyla 6 saat süreyle geçirilmiştir. Daha sonra iki ucu septum ile kapatılan kapiler monolit, 80 ^{o}C sıcaklıkta bulunan sıcak su banyosuna yerleştirilmiş ve 24 saat süreyle bekletilmiştir.

İşlem bitiminde monolit HPLC pompası kullanılarak, 0.025 mL/dk akış hızıyla distile su ile iyice yıkanmıştır. Monolitlerin PEI ile türevlendirilmesinde, monolit 75 ^{o}C'de sabit sıcaklıkta tutulan su banyosu içerisine yerleştirilmiştir. % 5 PEI içeren sulu çözelti (% w/w), HPLC pompası yardımıyla sıcak su banyosunda bulunan monolitten 0.005 mL/dk akış hızıyla 6 saat süreyle geçirilmiştir. Daha sonra iki ucu septum ile kapatılan kapiler monolit, 75 ^{o}C sıcaklıktaki sıcak su banyosuna yerleştirilmiş ve 24 saat süreyle bekletilmiştir. İşlem bitiminde monolit HPLC pompası kullanılarak, 0.005 mL/dk akış hızıyla distile su ile iyice yıkanmıştır.



Şekil 3.3. HPMA-Cl bazlı monolitlerin (A) $NaHSO_3$ ve (B) PEI ile bağlanma reaksiyonu.

3.2. Monolit Yapısının Karakterizasyonu

3.2.1. Monolitlerin Mobil Faz Geçirgenliğinin İncelenmesi

Sentezlenen monolitlerin CEC sisteminde gerçekleştirilen kromatografik analizlerde kullanılabilir olması için uygun mobil faz geçirgenliğine sahip olması gerekmektedir. Monolitlerin geri basınç akış hızı ilişkisi Şekil 3.4.'de verilen pompa, mikro akış ayarlayıcı, örnekleyici ve dedektörden oluşan Ultimate 3000 kromatografi sistemi (Dionex, Ultimate 3000, A.B.D.) ile belirlenmiştir. Hareketli faz olarak ACN/5 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu hareketli faz, CEC sistemi çalışmalarında yaygın olarak kullanılması nedeniyle seçilmiştir. Yapılan ölçümlerde hareketli faz akış hızı monolitin geri basınç davranışına göre 0.002-0.05 mL/dk aralığında değiştirilerek, her bir akış hızında sistem 15 dakika bekletilmiş ve kolona ait geri basınç değeri kaydedilmiştir.



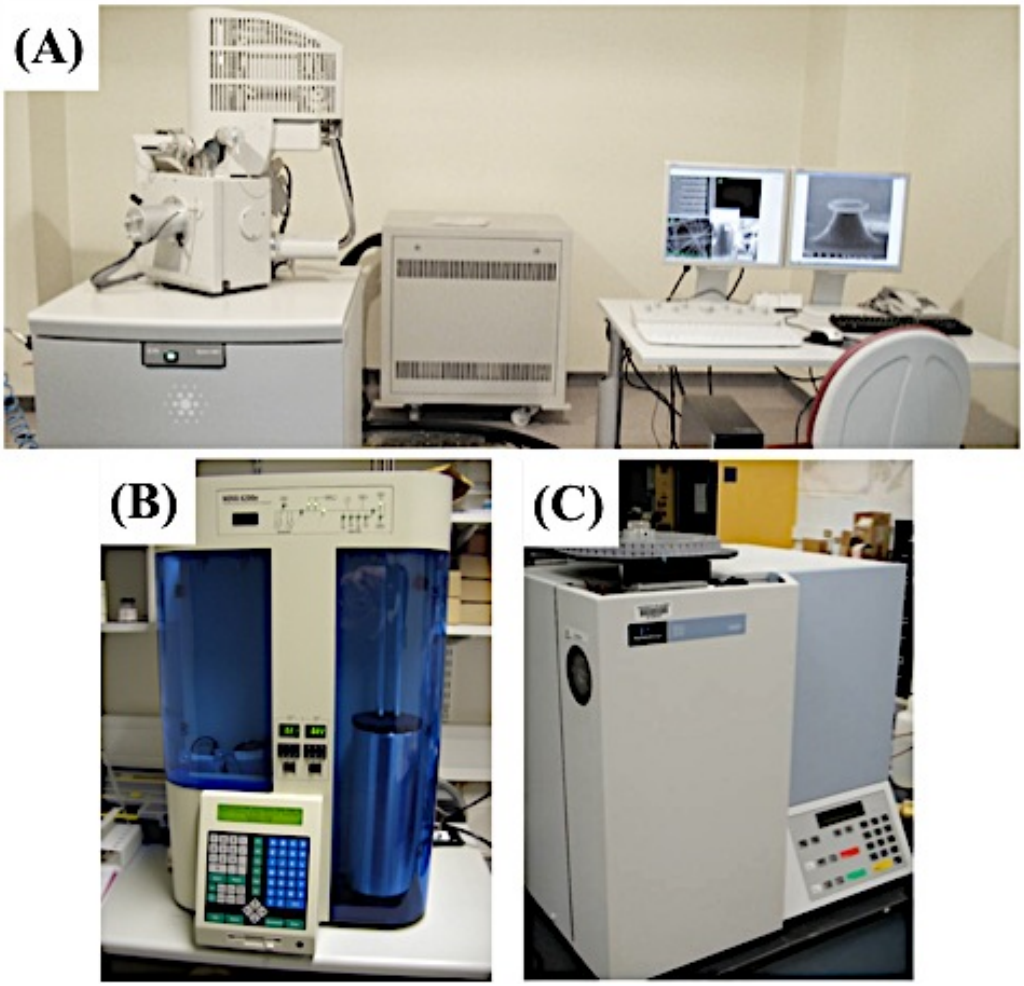
Şekil 3.4. Monolitlerin mobil faz geçirgenliğinin incelenmesi için kullanılan Ultimate 3000 Nano-LC sistemi

3.2.2. Kapiler Monolitik Kolonların Karakterizasyonu

Monolitlerin iç yapısı ve morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) ile yapılmıştır. Bu amaçla sentezlenen kapiler kolonlar dolu uçlarından 10 mm kesilmiştir. Daha iyi görüntü elde edebilmek amacıyla 150 angström kalınlığında altın ile kaplanmış ve SEM cihazı içerisine dik konumda yerleştirilmiştir. Kapiler monolitlerin kesit görüntüleri 2000X ve 6000X büyütme oranı ile alınmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri ile gözenek yapıcı solvent bileşiminin makrogözenek yapısı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Monolitlerin özgül yüzey alanı ise gözeneklilik ve yüzey alanı ölçüm sistemi (Quantachrome Nova 2200, A.B.D.) ile belirlenmiştir. Ölçümde azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi kullanılmış ve hesaplama BET yöntemi ile yapılmıştır. Bu işlem için bölüm 3.1.3'te verilen yöntem kullanılarak polimerizasyon çözeltisi hazırlanmış ve 4 mm çapındaki cam tüplere doldurulmuştur. Çözelti sıcak su banyosunda 20 saat süreyle bekletilmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra monolit cam tüpler kırılarak dışarı alınmıştır. Alınan monolit, etanol ile yıkanarak 1 gün süreyle 80 ^{o}C'deki fırında tutulmuştur. BET sisteminde 9 mm çapında 150 mm uzunluğundaki hücrelere konulan monolit (yaklaşık 0.4 g) 80 ^{o}C'de 6 saat vakum altında tutulduktan sonra monolitin yüzey alanı analizi yapılmıştır.

Metakrilat bazlı monolitler için $NaHSO_3$ ve PEI bağlanma miktarları, elementel analiz (Thermo-Scientific, Flash 2000, A.B.D.) ile tespit edilmiştir. $NaHSO_3$ bağlanma miktarı için kükürt, PEI bağlanma miktarı için de azot miktarı saptanmıştır. Elementel analiz örnekleri, monolit çözeltisinin 4 mm çapındaki cam tüplerde polimerleştirilmesi ve ligand bağlanması ile hazırlanmıştır. $NaHSO_3$ bağlı monolitlerin elementel analiz örneklerinin hazırlanması için polimerizasyon işlemi tamamlanan monolitler etanol ve su ile yıkanmış, 4 saat 80^{o}C'de vakum uygulanarak kurutulmuştur. Ağırlıkça % 2 $NaHSO_3$ içeren 20 mL sulu çözelti, 0.5 gram monolit ile etkileştirilmiş ve 20 saat süreyle 80 ^{o}C'de 120 cpm çalkalama hızında karıştırılmıştır.

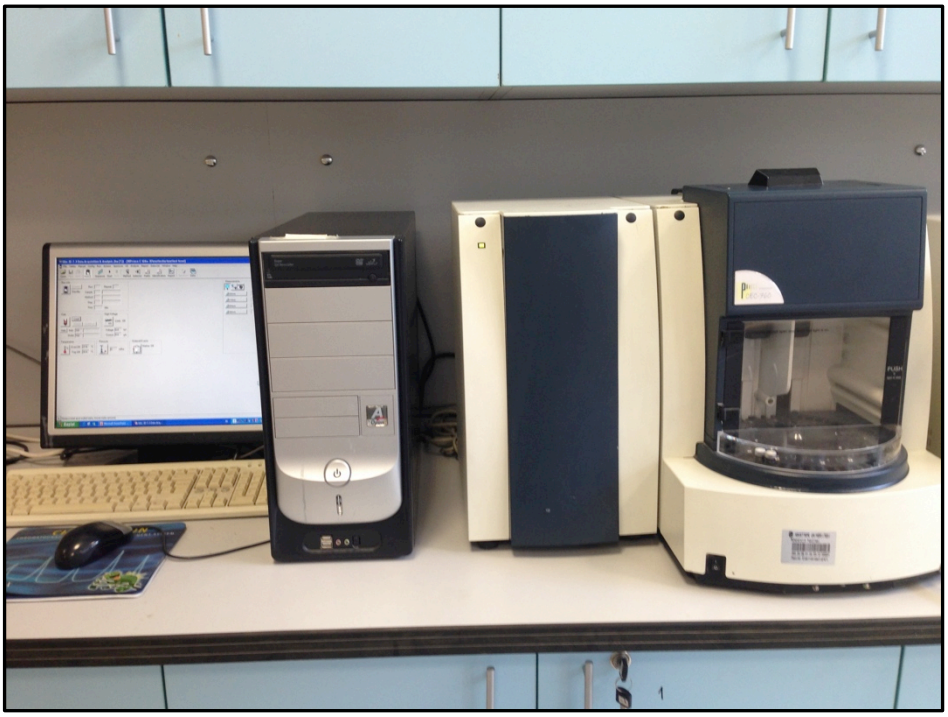


Şekil 3.5. Kapiler monolitlerin karakterizasyonunda kullanılan (A) Quanta 200 FEG SEM, (B) Quantachrome Nova 2200 BET, (C) Perkin Elmer 2400 elementel analiz cihazları.

PEI bağlı monolitlerin elemental analiz örneklerinin hazırlanması için, ağırlıkça % 5 PEI içeren 20 mL çözelti 0.5 g monolit ile etkileştirilmiş ve 20 saat süreyle 75 ^{o}C'de 120 cpm çalkalama hızında karıştırılmıştır. Sıcak su banyosundan alınan monolit, su ile yıkanmış ve 80 ^{o}C vakum uygulanarak kurutulduktan sonra ele-mentel analize hazır hale gelmiştir. Fonksiyonelleştirilmiş makroboyutlu monolitik yapılardan alınan örnekler kullanılarak elemental analiz sonuçları elde edilmiştir.

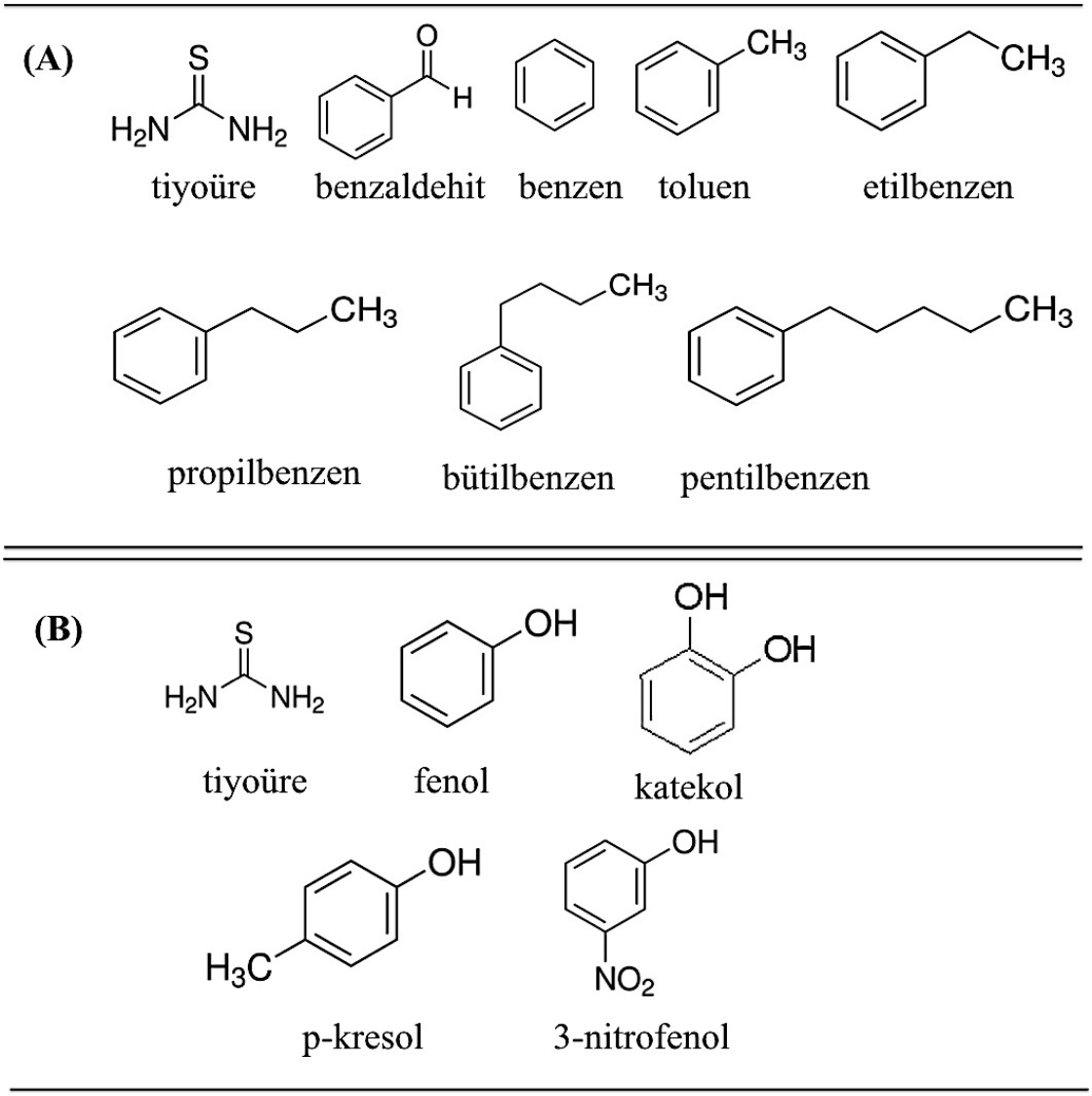
3.2.3. Kapiler Monolitik Kolonların Elektrokromatografik Performanslarının İncelenmesi

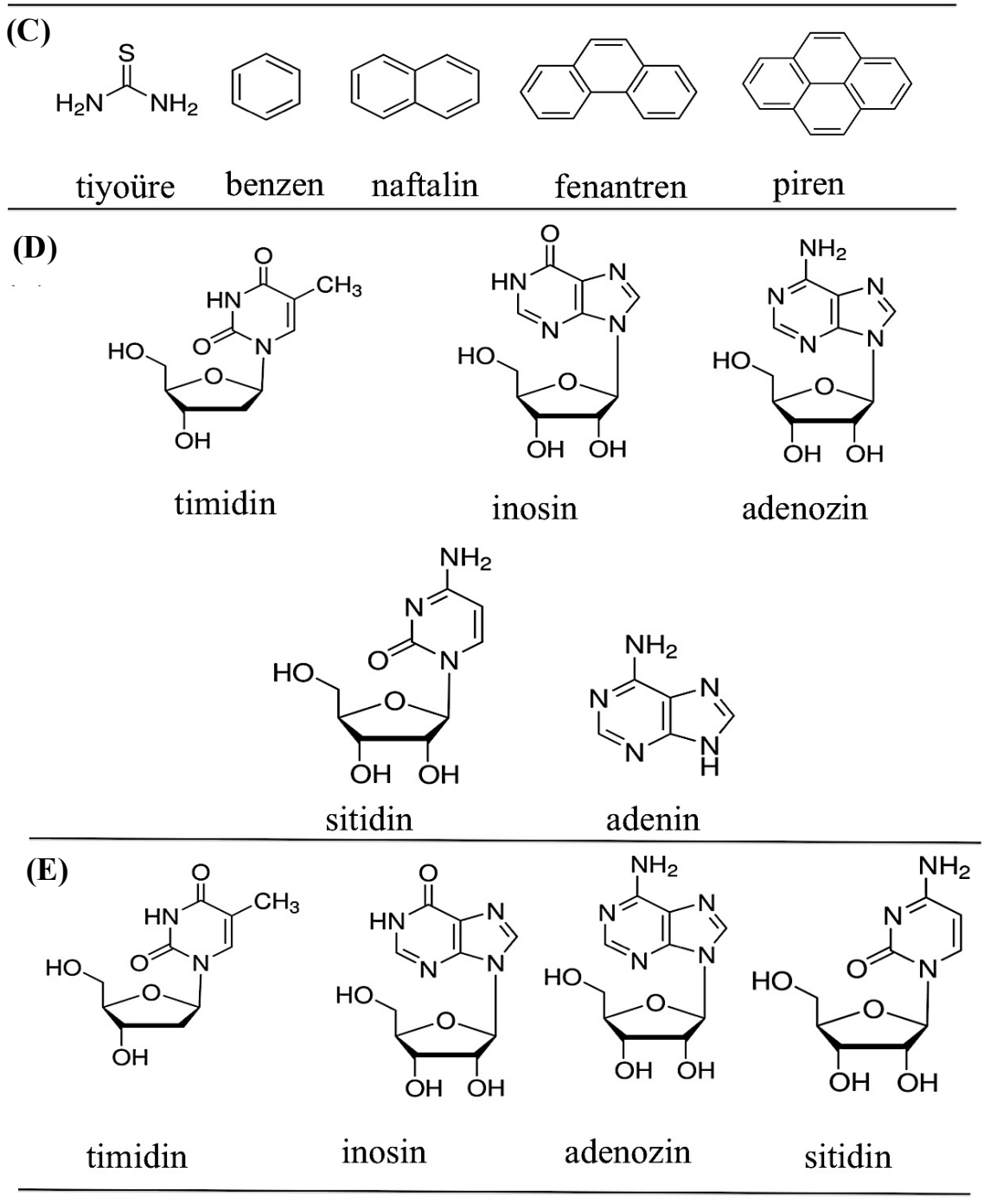
Kolonların kromatografik performansı Şekil 3.6.'da verilen PRINCE CEC-760 sisteminde doğru akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde gözetleme için yaygın olarak UV-Vis dedektör kullanılmaktadır. Sentezlenen monolitik kolonlar CEC sistemine bağlanmadan önce belirlenen ACN/fosfat tampon ile HPLC pompası kullanılarak, 0.005 mL/dk akış hızıyla 2 saat boyunca yıkanmıştır. Daha sonra CEC için uygunluğunun incelenmesi için analize başlamadan önce akım değerinin sabit olup olmadığı izlenmiştir. Bu amaçla, kolonlara belirlenen ACN/fosfat tamponu oranında 15 kV voltaj değerinde 30 dk süreyle 1.5 bar basınç uygulanmıştır. Daha sonra basınç kesilerek voltaj 20 kV'ye çıkartılıp, kolonun bu voltaj altında verdiği akım değerleri izlenmiştir. Akım sabit olduğunda kromatografik performans incelenmeye başlanmıştır. Analizde kullanılan analit karışımı, her biri hacimce % 0.85 derişimde olacak şekilde 3.5 mL'lik hacimce 80/20 ACN/ fosfat tamponu çözeltisi içinde çözülerek hazırlanmış ve enjeksiyonu 3 s, 10 kV voltaj uygulanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Elektrokromatografik analizlerin yapıldığı PRINCE CEC-760 sistemi.

Kullanılan analitlerin yapıları Şekil 3.7.'te verilmiştir. Hazırlanan alkilbenzen ve fenol türevlerinin kromatografik ayrımı 200 nm dalga boyunda, nükleik asitlerin ayrımı 260 nm dalga boyunda ve çoklu halkasal aromatik hidrokarbonların (PAH) ayrımı ise 214 nm dalga boyunda izlenmiştir. Kolonların elektrokro-matografik performansları, farklı derişimlerde ve pH'larda hazırlanan ACN/fosfat tamponu kullanılarak 10 kV'den 30 kV'ye kadar değiştirilen voltaj değerleri ile yapılan kromatografik analizlerle incelenmiştir. Elektrokromatografik performans, elektro-ozmotik mobilite, alıkonma faktörü, pik çözünürlüğü ve teorik tabaka sayısı gibi kromatografik parametrelerin hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Bu parametreler ileride bölüm 3.2.4'de anlatılan ifadeler yardımıyla hesaplanmıştır.





Şekil 3.7. Kromatografik ayrımda kullanılan analit grupları: (A) Alkilbenzen türevleri, (B) Fenol türevleri, (C) Çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve (D) nükleosid ve nükleotit karışımı (E) nükleosidlerin kimyasal yapıları [141].

3.2.4. Kromatografik Parametrelerin Tayini

3.2.4.1. Elektroozmotik Mobilite

Elektoroozmotik mobilite (EOF), CEC sisteminde monolitik kolonun mobil faz geçirgenliğinin ve analitlerin kolon boyunca transfer hızlarının göstergesi olup sisteminin temel sürücü gücünü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda EOF Eşitlik 3.1. ile hesaplanmaktadır [142].

$$\mu_{eof} = Le*Lt/V*t_R \qquad (3.1.)$$

Bu formülde μ_{eof} (m^2/V.s); elektroozmotik mobilite, L_e (m); etkin kolon uzunluğu, L_t (m); kolonun toplam uzunluğu, V; uygulanan elektrovoltaj (V) ve t_R (s); tiyoüre için alıkonma süresini göstermektedir.

3.2.4.2. Alıkonma Faktörü

Alıkonma faktörü, monolitik sabit faz ile hareketli faz içerisinde olan analitin etkileşimine dayanmaktadır. Ters farz kromatogarafisinde monolitik yapının polaritesinin bir ölçüsüdür. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde ise yine monolitik yapının hidrofobisitesini gösteren bir parametredir. Akış hızı, kolon boyutu, partikül çap ve gözenekliliğinden bağımsız, boyutsuz bir parametredir. Alıkonma faktörü Eşitlik 3.2. ile hesaplanmaktadır [109].

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \qquad (3.2.)$$

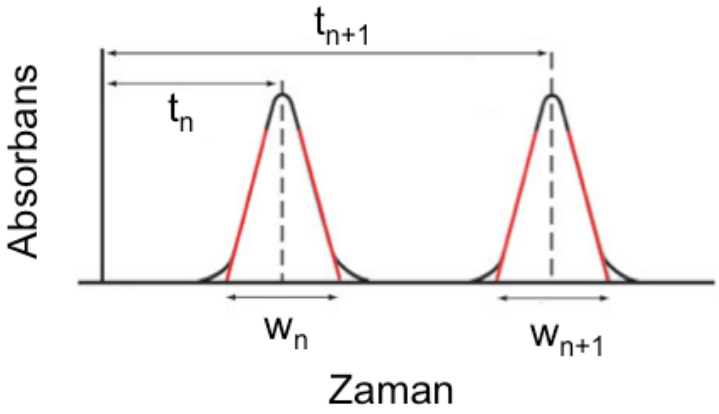
Bu eşitlikte t_R, herhangi bir mobil faz ile hareket eden analitin kolon içerisindeki alıkonma süresini, t_0 ise referans (tiyoüre) analit ile elde edilen alıkonma süresini göstermektedir.

3.2.4.3. Pik Çözünürlüğü

Pik çözünürlüğü ardışık iki pikin birbirinden ne kadar iyi ayrılabildiğini göstermektedir. Elde edilen kromatogramlarda belirli bir bileşen için pik çözünürlüğü, R(n+1/n), Eşitlik 3.3'e göre hesaplanmaktadır. Şekil 3.8.'den de görüldüğü gibi R(n+1/n), seçilen pik (n+1) ile bir önceki pik (n) arasındaki çözünürlüğü ifade

etmektedir. tn+1 ve tn 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 [16].

$$R(n+1/n) = 2(t_{n+1}-t_n) / (w_{n+1}+w_n) \quad (3.3.)$$



Şekil 3.8. Kromatografik analiz sonucu elde edilen ardışık iki pik için çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan parametrelerin gösterimi

3.2.4.4. Teorik Tabaka Sayısı (N) ve Teorik Tabaka Yüksekliği (h)

Teorik tabaka sayısı (N), kolonun verimliliğini ve hızını gösteren önemli bir kromatografik parameter olup aşağıdaki Eşitlik 3.4. ifadesi yardımıyla hesaplanır [142]:

$$N = 5.54 \times (t_R / w_{1/2})^2 \quad (3.4.)$$

Burada t_R, bileşiğin alıkonma süresini ve $w_{1/2}$, pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade eder. Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir.

Teorik tabaka yüksekliğI (h) kolonun hızını gösteren bir parametredir ve N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri büyüdükçe teorik h değeri azalır. Daha düşük teorik tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı, kısa sürede kromatografik ayrımın elde edilmesi anlamına gelmekte ve Eşitlik 3.5. ile

hesaplanmaktadır. Burada h; teorik tabaka yüksekliği; L, kolon boyudur.

$$h = (L / N) \quad (3.5.)$$

3.2.4.5. Kolon Geçirgenliği

Monolitik kolonların akışa karşı gösterdiği direnç Darcy eşitliği (Eşitlik 3.6.) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$K_F = F_M \times \eta \times L / (\Delta P \times \pi \times r^2) \quad (3.6.)$$

Bu eşitlikte F_M (m^3/s); hareketli fazın akış hızını, η (Pa.s); hareketli fazın viskozitesini, L (m); kolon uzunluğunu, ΔP (Pa); kolonun geri basıncını ve r (m); kolonun iç çapını ifade etmektedir [143].

3.2.5. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kromatografi çalışmalarında aynı koşullar altında alınmış olan ölçümlerdeki değişim olarak tanımlanabilir [144]. Analiz şartlarından, kromatografik sistemden veya kolon dolgu materyalinin sentezinden kaynaklanabilecek olan nedenlerden dolayı tekrarlanabilirlik analizlerinde farklı sonuçlar alınabilmektedir. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik, farklı günlerde yapılan günden güne tekrarlanabilirlik veya aynı koşullarda sentezlenen kolonlar ile kolondan kolona tekrarlanabilirlik olmak üzere farklı şekillerde yapılabilmekte ve

$$RT_n = \frac{\Sigma \mathrm{Ni}\ \mathrm{RTi}}{\Sigma\ \mathrm{Ni}} \quad (3.7.)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma Ni\ (RTi - RTn)^2}{(\Sigma\ Ni - 1)}} \quad (3.8.)$$

$$\%\ BSS = \frac{SD}{RTn} \quad (3.9.)$$

eşitlikleri yardımı ile hesaplanmaktadır. Tekrarlanabilirlik, bağıl standart sapma, (BSS) ile ifade edilir ve elde edilen değerin % 1.5'in altında olması istenir [144-148]. Burada RT_n; farklı analizler için belirli bir analit ile elde edilen sayıca ortalama alıkonma süresi, SD; standart sapma, BSS; bağıl standart sapma, N_i; analiz sayısını, RT_i ise i no'lu analitin alıkonma süresini ifade etmektedir. Değişimin onaylanan sınırlardan daha küçük olması, sentezlenen kolonların iyi tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

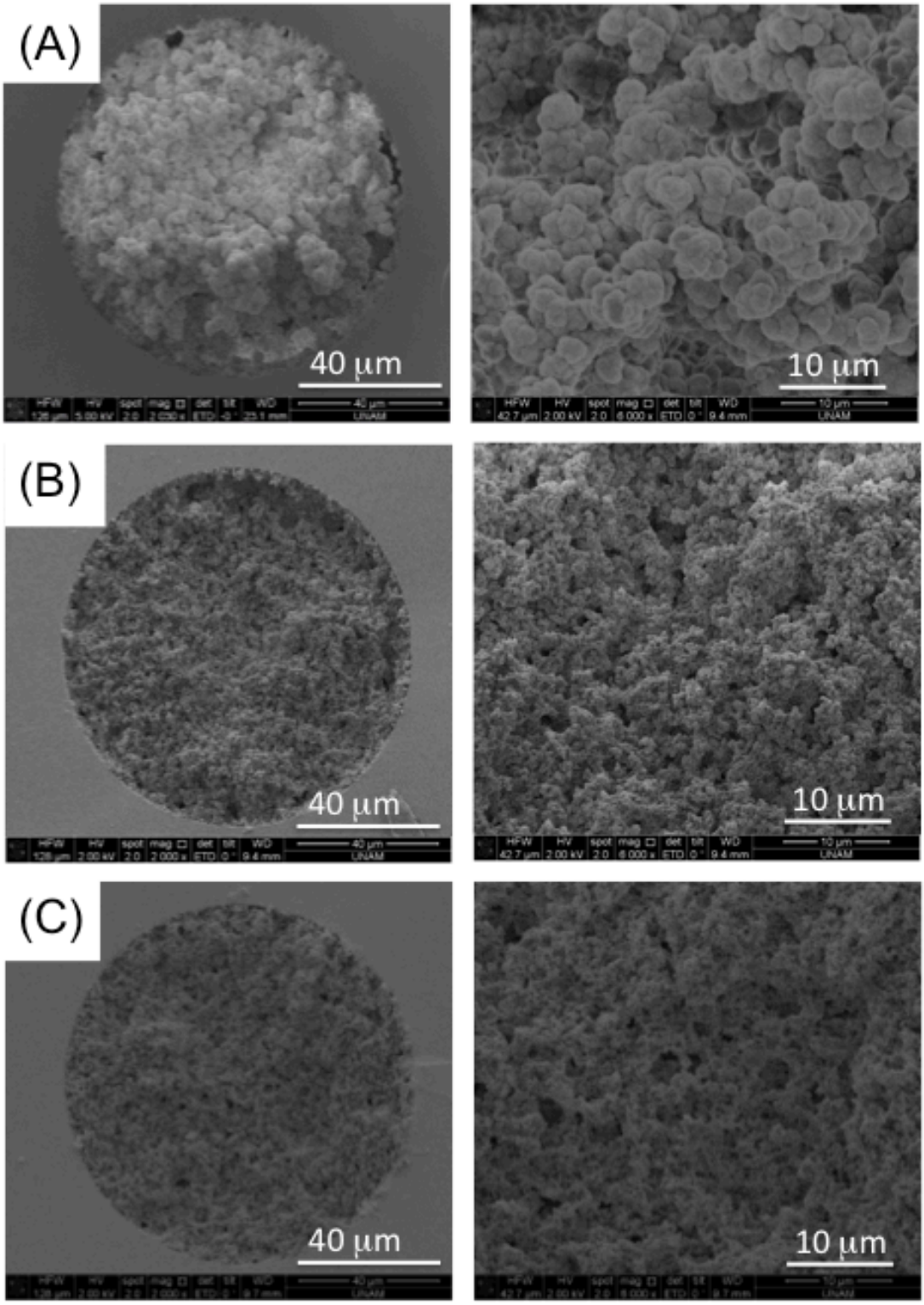
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında, yeni bir reaktif monomer (HPMA-Cl) kullanılarak, polimerik formda kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Hidrofilik özelliğe sahip olması ve içerdiği ‘‘kloropropil’’ grubu üzerinden farklı kromatografik ligandları içeren formlara basit ve tek basamaklı reaksiyonlar ile kolayca türevlendirilebilir olması, seçilen monomerin en önemli özelliğidir. Monomerin yapısında hidroksil grubunun bulunması yapıya hidrofilisite kazandırmakta ve sabit fazın analitler ile spesifik olmayan etkileşimini azalmaktadır. Tez çalışmasının ilk kısmında, HPMA-Cl monolitlerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, gözenek yapıcı solvent bileşimi değiştirilerek ve farklı zincir uzunluğuna sahip çapraz bağlayıcılar kullanılarak farklı gözeneklilik özelliklerine sahip kapiler monolitler elde edilmiştir. Seçilen bu değişkenlerin, literatürde farklı poliakrilat bazlı monolitlerin [poli(bütil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) ve poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat)] sentezinde, gözeneklilik özelliklerinin ve kromatografik davranışın kontrolünde etkili olduğu belirtilmektedir [149-152]. Genellikle poliakrilat bazlı monolitlerin sentezi için EDMA çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır [2,16,99,108]. Tez çalışmasında EDMA’ya ek olarak daha polar yapıda olan GDMA ve daha apolar yapıda olan BDDA’da çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Gözenek yapıcı solvent olarak ise İso-PrOH ve Dec-OH içeren karışım kullanılmıştır. Tez çalışmasının ikinci kısmında, elektrokromatografik performansın incelenebilmesi için, termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyon tekniği ile farklı çapraz bağlayıcı türleri kullanılarak sentezlenen kapiler monolitlere, yapılarında bulunan reaktif ‘‘kloropropil’’ grubu üzerinden anyonik ($NaHSO_3$) ve katyonik (PEI) ligandlar, kovalent olarak bağlanmıştır. Anyonik ligand bağlı monolitlerin kromatografik performansları incelenirken alkilbenzen ve fenol türevleri, katyonik ligand bağlı monolitlerin analizinde ise bunlara ek olarak çoklu halkasal aromatik hidrokarbonların, nükleotit ve nükleosid karışımının ve nükleosidlerin kromatografik ayrımları denenmiştir.

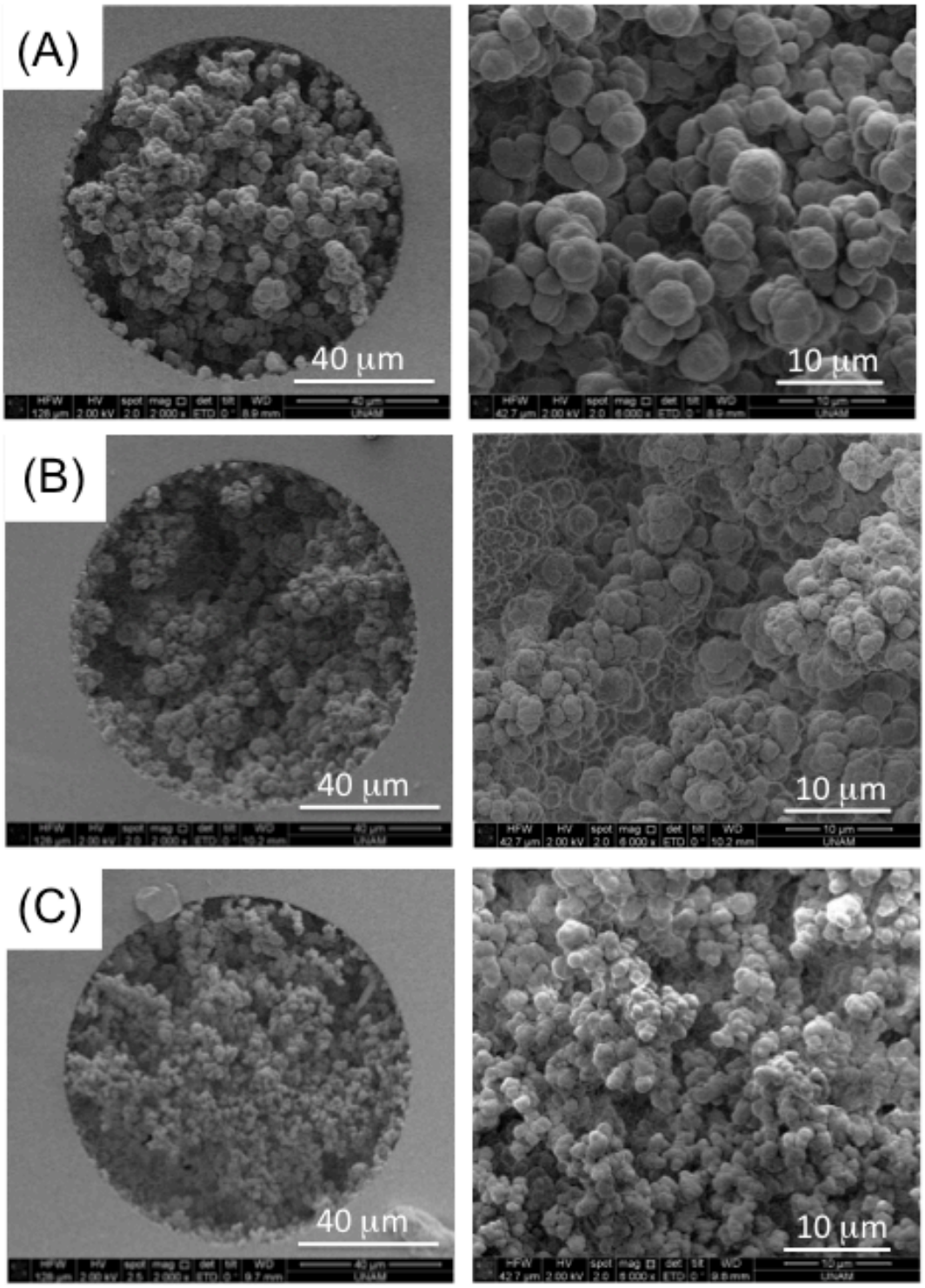
4.1. Kapiler Monolitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Gözenek yapıcı solvent bileşiminin etkisi

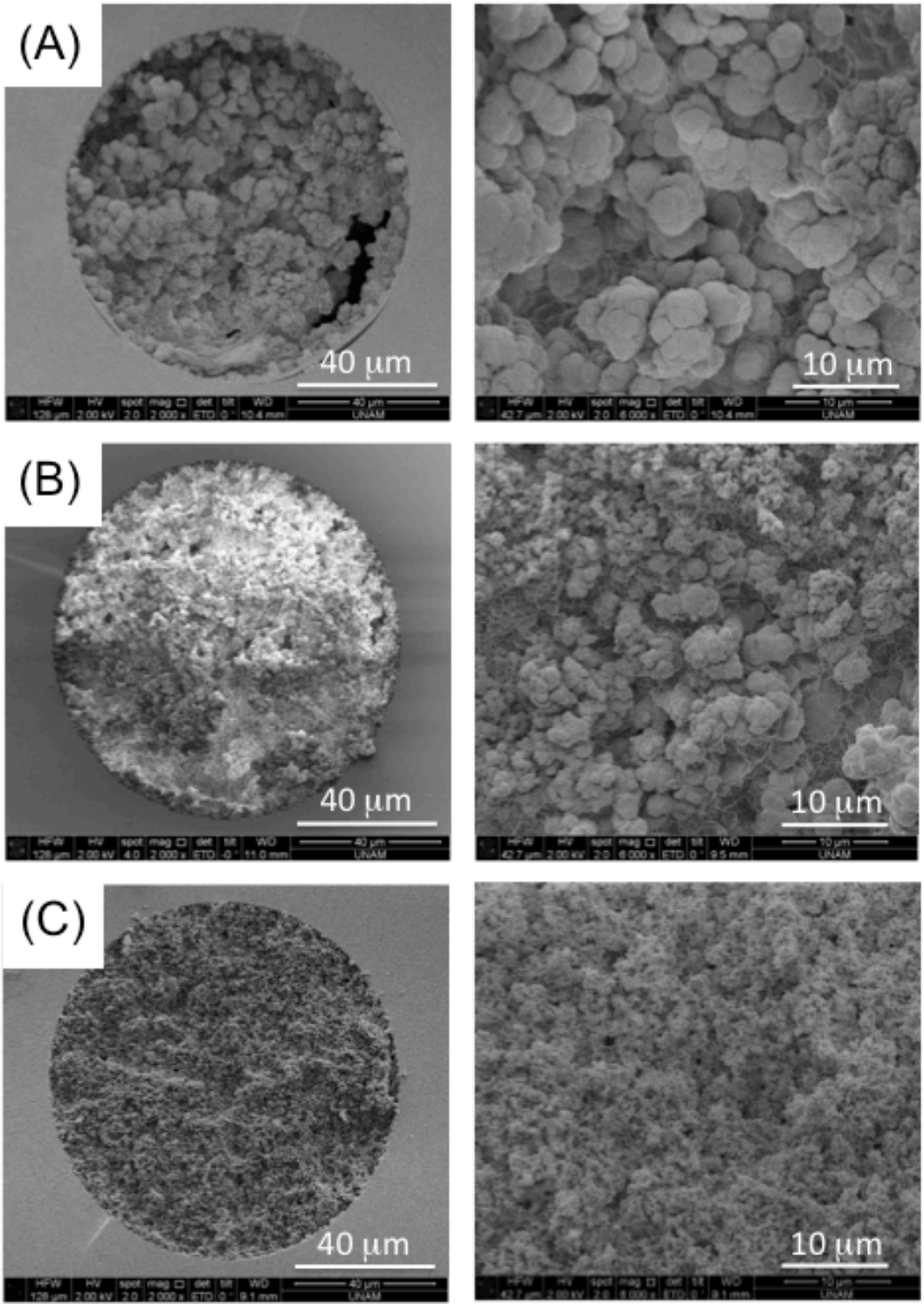
Bu gruptaki deneylerde üç farklı çapraz bağlayıcı türü ile çalışılmıştır. Sentezlerde monomer fazdaki HPMA-Cl başlangıç derişimi hacimce % 10, gözenek yapıcı solvent/monomer oranı 4/1 mL/mL, sentez sıcaklığı ise 50 ^{o}C değerinde sabit tutulmuştur. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen HPMA-Cl bazlı monolitlerde, gözenek yapıcı solvent bileşimi (İso-PrOH/Dec-OH) üç farklı düzeyde değiştirilmiştir. Kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları sırasıyla aşağıda, 4.2. ve 4.3.'te verilmiştir. Her bir şekilde, monolitin tüm kesit alanını veren fotoğraflar sol sütunda, gözenekli yapının morfolojisini ayrıntılı olarak gösteren yüksek büyütmeyle alınmış fotoğraflar ise sağ sütunda verilmiştir. Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.'deki SEM fotoğraflarından görüldüğü gibi, farklı çapraz bağlayıcı türleri ile sentezlenen monolitlerde gözenek yapıcı solvent içerisindeki İso-PrOH derişimi arttıkça, agregat boyutu belirgin şekilde küçülmektedir. Agregat boyutunun küçülmesi ortalama gözenek boyutunda bariz bir azalmaya neden olmaktadır. Çapraz bağlayıcı polaritesinden bağımsız olarak, bu etki bütün monolitlerde gözlenen bir davranıştır. Agregat boyutunun küçülmesi, monolitteki krater tipi, büyük düzensiz gözenekleri ortadan kaldırmakta ve daha küçük gözeneklerden oluşan fakat radyal kesite daha homojen biçimde yayılmış küçük gözenekler içeren morfolojiyi baskın hale getirmektedir. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitik kolonlar için özgül yüzey alanının ve kolon geçirgenliğinin İso-PrOH derişimi ile değişimi Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi üç farklı çapraz bağlayıcıyla sentezlenmiş monolitlerde özgül yüzey alanı değerleri İso-PrOH derişimi arttıkça artmaktadır. Gözenek yapısında ortaya çıkan değişim (ortalama gözenek boyutunun azalması) özgül yüzey alanındaki artışın nedenidir. Gözenek boyutunda oluşan düşmeye bağlı olarak, gözenek bükümlülüğünde (tortuosity) ortaya çıkan artış ise monolit geçirgenliğinin azalmasına neden olmaktadır. Sabit gözenek yapıcı solvent hacminde, İso-PrOH derişiminin artışı ve dolayısıyla İso-PrOH/Dec-OH hacim oranın değişimi ile elde edilen bu sonuçlar İso-PrOH'ın sentez ortamında mikrogözenek yapıcı, Dec-OH'ün ise makrogözenek yapıcı olarak davrandığını göstermektedir.



Şekil 4.1. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 25.0, (B) 31.25, (C) 50.0. HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.



Şekil 4.2. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 37.5, (B) 50.0, (C) 62.5, HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.



Şekil 4.3. Farklı gözenek yapıcı solvent bileşimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. Gözenek yapıcı solvent içerisinde İso-PrOH derişimi (% hacim): (A) 37.5, (B) 43.75, (C) 56.25, HPMA-Cl derişimi (% hacim): 10, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.

Çizelge 4.1. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g)	[b]K_o (m^2)
25.00	40.9	4.47×10^{-12}
31.50	66.3	2.48×10^{-12}
37.50	81.9	0.23×10^{-12}
50.00	89.9	0.08×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi (% v/v): 10, a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

Çizelge 4.2. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g)	[b]K_o (m^2)
37.5	4.1	2.07×10^{-12}
50.0	27.2	1.59×10^{-12}
62.5	34.2	1.16×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi (% v/v): 10, a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

Çizelge 4.3. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

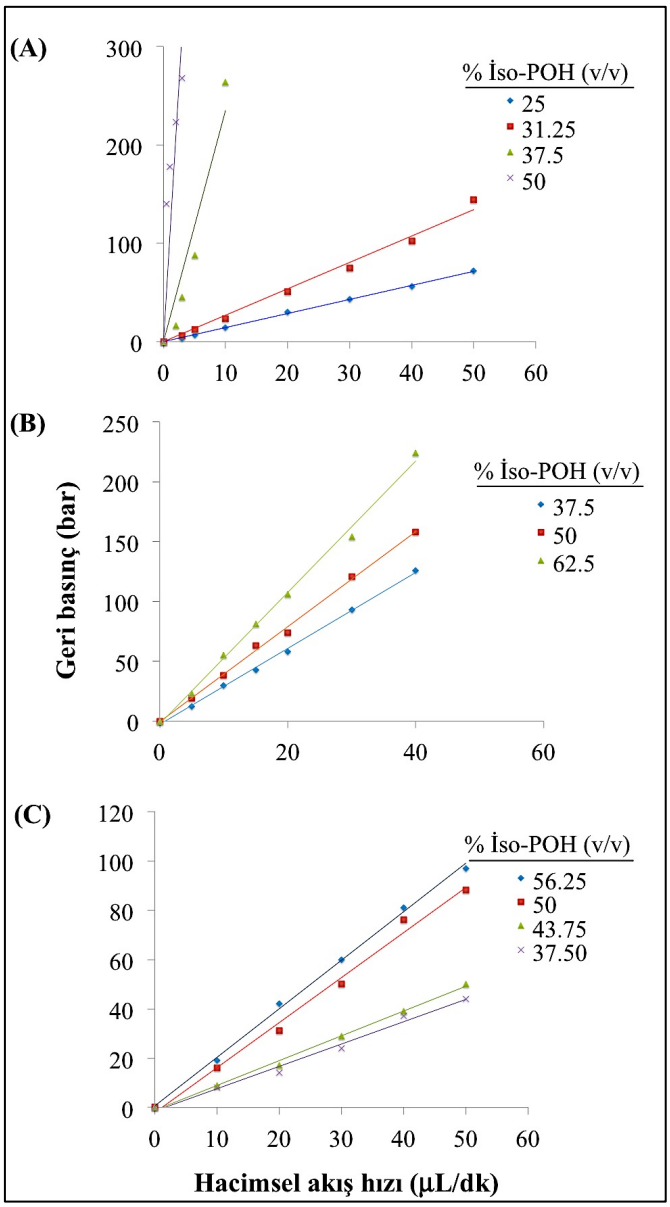
İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g)	[b]K_o (m^2)
37.50	76.0	7.07×10^{-12}
43.75	80.4	6.27×10^{-12}
50.00	82.3	3.51×10^{-12}
56.25	86.4	3.24×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi (% v/v): 10, a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

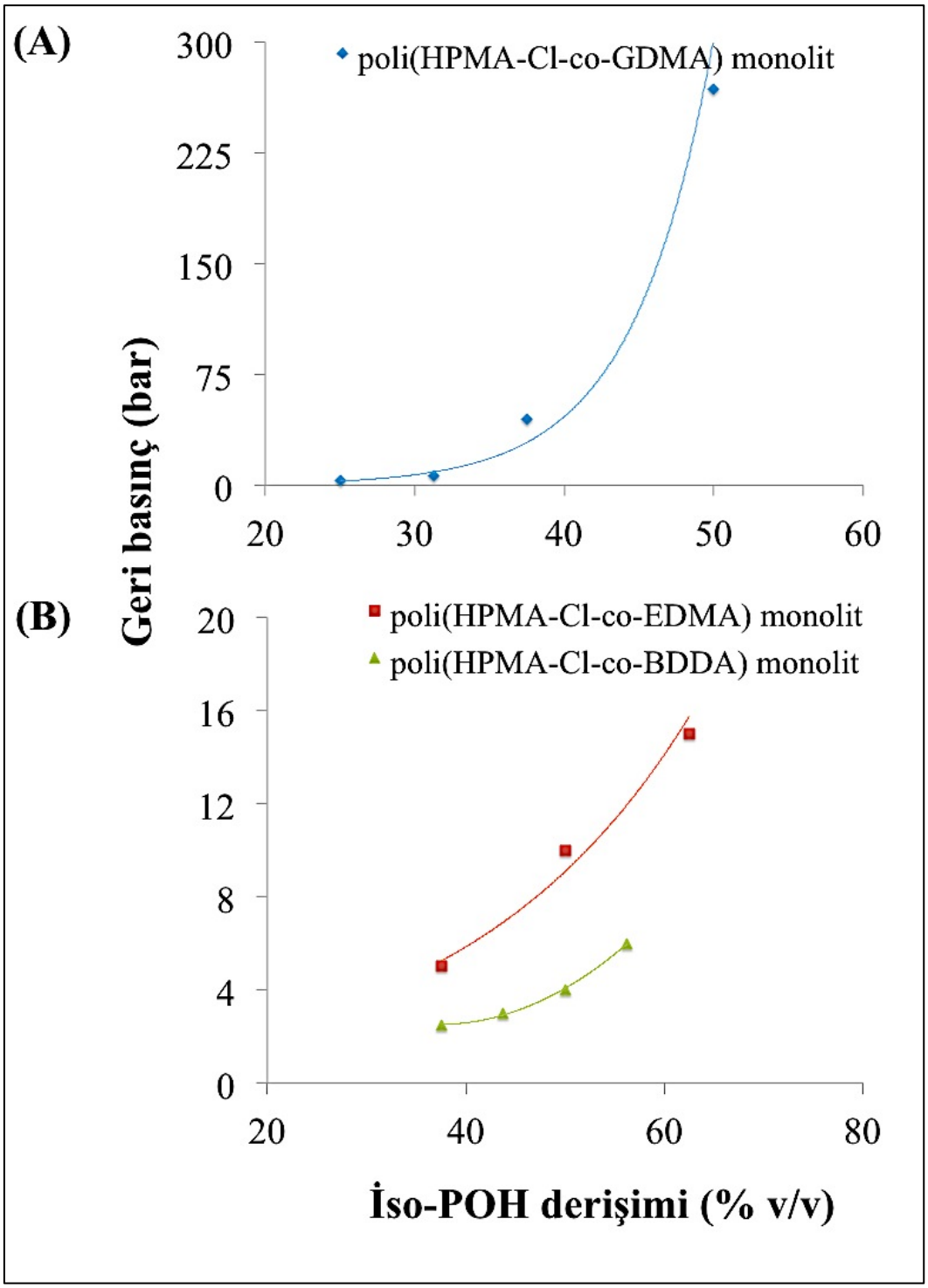
Yapılan deneylerde kullanılan İso-PrOH derişiminin değişim aralığı yapılan ön deneyler ile belirlenmiştir. Kapiler elektrokromatografi sisteminde kullanılan monolitlerin geçirgenlik değerleri çoğunlukla $1x10^{-12}$ m^2 değerine yakındır [149-152]. Bu değerin üstünde geçirgenlik değerlerinde iyi bir kromatografik ayrım elde edilememekte, kolon geçirgenliğinin bu değerin çok altında kalması durumunda ise analiz süresi çok uzamakta ve EOF koşullarında kolon içerisinde mobil faz transferi sağlanamamaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanılacak İso-PrOH derişim aralığı bu geçirgenlik değerine sahip monolitik kolonların elde edilebileceği şekilde belirlenmiştir. Şekil 4.4.'de sentezlenen monolitler için verilen basınç eğrileri, farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen her bir monolit türü için seçilen İso-PrOH derişim aralığının, geri basınç davranışını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermektedir. Farklı çapraz bağlayıcı türleri kullanılarak, farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen bütün monolitler için geri basınç değerinin artan akış hızı ile doğrusal bir artış gösterdiği görülmektedir. Bu durum sentezlenen kapiler monolitlerde 50 μL/dak mobil faz akış hızı değerine kadar gözenekli matrisin rijit formunu koruduğunu ve gözenekli matriste bir şekil deformasyonunun oluşmadığını göstermektedir. Elde edilen bütün monolitler için Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'ünde değerlendirilmesi sonucunda azalan ortalama gözenek boyutu ile akışa karşı direncin etkin bir şekilde arttığı görülmektedir. Farklı çapraz bağlayıcı türleri kullanılarak sentezlenen bütün monolitler için gözlenen ortak davranış, artan İso-PrOH derişimi ile sabit akış hızında geri basınç değerinin artış göstermesidir.

Sabit mobil faz akış hızı değeri için İso-PrOH derişiminin geri basınç üzerindeki etkisi ise Şekil 4.5.'de verilmektedir. Şekil 4.5'te de her üç çapraz bağlayıcı türü için İso-PrOH derişimi arttıkça geri basıncın arttığı daha net şekilde görülmektedir. Bu davranış aynı zamanda sabit akış hızı değerinde elde edilen geri basınç değerinin kullanılan çapraz bağlayıcının polaritesi (hidrofilisitesi) ile yakından ilgili olduğunu da göstermektedir. Hidroksil grubu içermesi nedeniyle en hidrofilik yapı olan GDMA varlığında en yüksek geri basınç değerleri elde edilmektedir (Şekil 3.2. (B)). GDMA ile sentezlenen monolitik kolonlarda İso-PrOH derişimindeki artış, geri basınç değerinin 250 bar'a kadar çıkmasına neden olmuştur. En uzun alkil zincir uzunluğuna sahip dolayısıyla en hidrofobik çapraz bağlayıcı olan BDDA varlığında ise en düşük geri basınç değerleri elde edilmektedir (Şekil 3.2. (D)). Alkil zincir

uzunluğu BDDA'dan daha kısa, dolayısıyla BDDA kıyasla daha hidrofilik olan EDMA varlığında sentezlenen monolitlerin geri basınç değerleri ise GDMA ve BDDA ile sentezlenen monolitler ile elde edilenlerin arasında yer almaktadır (Şekil Şekil 3.2. (C)). Bu sonuçlar çapraz bağlayıcı hidrofilisitesinin artışı ile sabit İso-PrOH derişimi ve sabit mobil faz akış hızında elde edilen geri basınç değerinin arttığını ortaya koymaktadır.



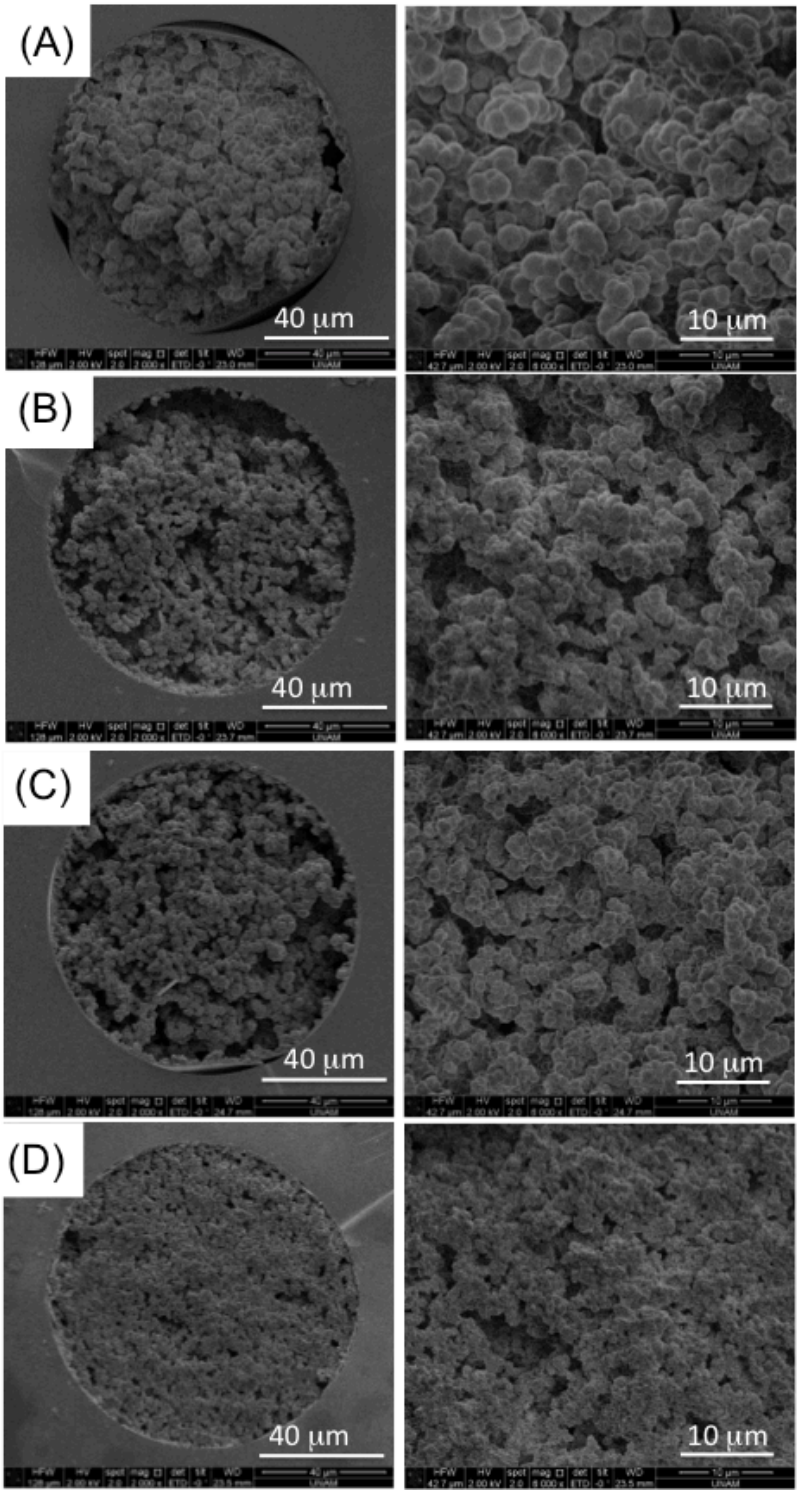
Şekil 4.4. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.



Şekil 4.5. İso-PrOH derişiminin (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınçları üzerindeki etkisi. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Akış hızı: 3 µl/dk, HPMA-Cl derişimi (% v/v): 10. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

4.1.2. Monomer faz bileşiminin etkisi

Bu gruptaki deneylerde üç farklı çapraz bağlayıcı türü ile çalışılmıştır. Her bir çapraz bağlayıcı türü için monomer fazdaki HPMA-Cl başlangıç derişimi değiştirilerek farklı kloropropil grup içeriklerine sahip monolitler sentezlenmiştir. Deneylerde, gözenek yapıcı solvent/monomer oranı 4/1 mL/mL, sentez sıcaklığı ise 50 ^{o}C değerinde sabit tutulmuştur. Farklı HPMA-Cl başlangıç derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.6.'da verilmektedir. SEM fotoğraflarında, her monolit türü için tüm kesit alanını veren görünümler sol sütunda, gözenekli yapının morfolojisini ayrıntılı olarak gösteren yüksek büyütmeyle alınmış görünümler ise sağ sütunda verilmiştir. SEM fotoğraflarından görüldüğü gibi HPMA-Cl başlangıç derişiminin artışı ile sabit agregat boyutunda bariz bir azalma meydana gelmektedir. Bu ise sabit agregatlar arasında yer alan gözeneklerin ortalama boyutunda azalmaya neden olmaktadır. Bir başka deyimle monomer derişiminin artışı radyal kesite düzensiz olarak dağılmış büyük gözenekler içeren krater türü gözenek yapısından, daha düşük ortalama boyuta sahip ve radyal kesite homojen şekilde dağılmış gözenekleri içeren süngerimsi gözenek yapısına geçişi sağlamaktadır. Bu durum, düşük monomer derişimlerinde (yüksek çapraz bağlayıcı derişimi) daha büyük ortalama boy değerine sahip sabit agregatların oluştuğunu göstermektedir. Böylece yüksek çapraz bağlayıcı derişiminde homojen formdaki sıvı polimerizasyon ortamında büyük olasılıkla daha hızlı bir faz ayrımı ile daha büyük boyuta sahip çapraz bağlı mikroküreler oluşmaktadır. Agregasyon hızının artması ve çapraz bağlı polimerin aşırı agregasyon ile büyük boyutlu mikroküreler oluşturması, oluşan çapraz bağlı yapıların daha düşük gözenek yapıcı solvent absorpsiyonu ile açıklanabilir [121]. Oluşan çapraz bağlı mikroküreler ile gözenek yapıcı solvent arasındaki polarite uyumsuzluğu agregasyon hızını ve oluşan agregatların boyutunu arttıran bir faktördür [120,121]. Polimerizasyon ortamındaki monomer derişiminin artışı ise oluşan çapraz bağlı mikrokürelerin polaritesini gözenek yapıcı solvent polaritesine yaklaştırmakta ve böylece polimerizasyon ortamında faz ayrımı daha yavaş ve daha küçük boyutlu mikroküreler oluşturacak şekilde meydana gelmektedir [120,121]. Bu durum ise agregat ve ortalama gözenek boyutunun azalmasına neden olmaktadır.



Şekil 4.6. Farklı monomer oranları ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin SEM fotoğrafları. % 30, % 40, % 50 HPMA-Cl (v/v) derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 55, % 60 HPMA-Cl derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 30, Monomer karışımı içerisindeki HPMA-Cl derişimi (% hacim): (A) 30.0, (B) 40.00, (C) 50.0, (D) 60.00, Büyütme oranı: Sol sütun: X2000, Sağ sütun: X6000.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen monolitik kolonların özgül yüzey alanı ve kolon geçirgenliği değerleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi monolitlerde özgül yüzey alanı, HPMA-Cl derişimi arttıkça azalmaktadır. Kolon geçirgenliği ise, artan monomer derişimi ile ortalama gözenek boyutunun azalması nedeniyle düşüş döstermektedir.

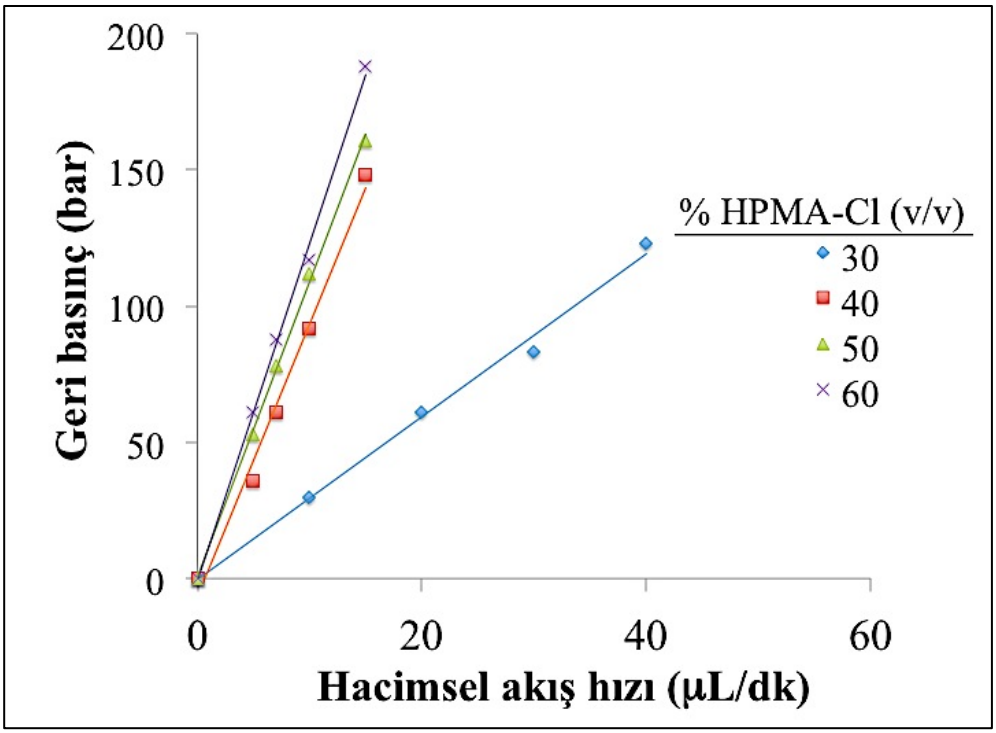
Çizelge 4.4. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

HPMA-Cl (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g)	[b]K_o (m^2)
30.00	19.5	5.37×10^{-13}
40.00	14.5	4.60×10^{-13}
50.00	9.2	3.21×10^{-13}
60.00	7.6	1.80×10^{-13}

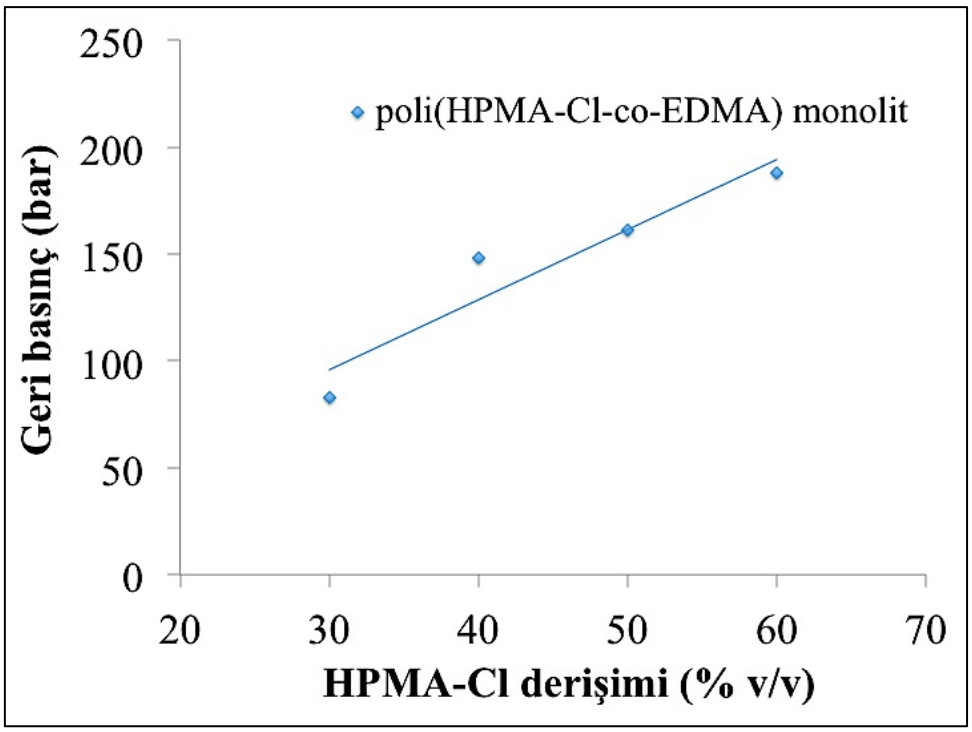
% 30, % 40, % 50 HPMA-Cl (v/v) derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 55, % 60 HPMA-Cl derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 30, a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi bütün HPMA-Cl başlangıç derişimleri ile elde edilen monolitler için geri basınç hareketli faz akış hızı ile doğrusal bir değişim göstermektedir. Bu durum, artan basınç ile monolitik blokların gözenekli yapısında herhangi bir deformasyonun olmadığını ortaya koymaktadır. % 30 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kapiler monolit ise sabit akış hızı değerinde en düşük geri basıç değeri elde edilmektedir. Sabit basınçta geri basınç değeri artan HPMA-Cl derişimi ile artış göstermektedir. Bu durum akış hızı 15 μL/dk değerinde sabit tutularak çizilen ve Şekil 4.8'de verilen grafikte daha net olarak gözlenmektedir. Bu davranış HPMA-Cl derişiminin artışı ile monomer fazındaki çapraz bağlayıcı derişiminin azalmasına bağlanabilir. Azalan çapraz bağlayıcı derişimi ile monolitik yapının oluşumu sırasında, çapraz bağlı agregatlar ile sıvı faz (gözenek yapıcı solvent)

arasındaki faz ayrımı yavaşlamakta ve zorlaşmakta, böylece daha küçük boyutlu agregatlar içeren bir yapı meydana gelmektedir. Bu durum gözeneklilik oranı ve ortalama gözenek boyutunun azalmasına, oluşan gözeneklerin bükümlülüğünün artmasına neden olmaktadır. Bu tür bir gözenek yapısı ise hareketli faz akışına karşı daha yüksek direnç oluşturmaktadır. Bu yorum Çizelge 4.4.'de yer alan kolon geçirgenliği değerleri tarafından da doğrulanmaktadır. Böylece HPMA-Cl derişiminin artışı ile daha yüksek geri basınç değerleri elde edilmektedir.



Şekil 4.7. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.



Şekil 4.8. Monomer derişiminin poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınçları üzerindeki etkisi. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Akış hızı: 15 µl/dk, Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

4.2. Ligand Bağlı Kapiler Monolitlerin Karakterizasyonu

4.2.1. Sodyum Bisulfit ($NaHSO_3$) ile Türevlendirilen Kapiler Monolitlerin Karakterizasyonu

Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitler $NaHSO_3$ ile türevlendirilerek monolitlerin üzerinde güçlü katyon değiştirici özelliğe sahip $–HSO_3$, sülfonik asit grubu oluşturulmuştur. Bu amaçla % 10 HPMA-Cl başlangıç derişimi kullanılarak farklı İso-PrOH derişimleri ile 50 ^oC'da sentezlenmiş monolitler kullanılmıştır. Monolitler farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenmiştir. Türevlendirme sonuçlarına bakılarak uygun EOF ve geri basınç değerlerine sahip monolitler kromatografik analiz için seçilmiştir.

Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin $NaHSO_3$ ile türevlendirilmesi sonucu elde edilen özgül yüzey alanı ve kolon geçirgenliği değerleri sırasıyla Çizelge 4.5., 4.6. ve 4.7.de sunulmuştur. Bütün monolitler için $NaHSO_3$ ile türevlendirme sonrasında, özgül yüzey alanında ve geçirgenlik değerinde hafif bir düşme gözlenmiştir. Buradan görüldüğü gibi, türevlendirme ile birlikte, özgül yüzey alanında ve kolon geçirgenliğinde azalma oluşmaktadır. Özgül yüzey alanındaki azalma özellikle mikrogözeneklerin kovalent olarak bağlı ligand molekülleri tarafından doldurulmasından kaynaklanmaktadır. Geçirgenlik değerindeki azalma ise monolitik yapının iyonizasyonu sonucu, sulu ortamda genleşme eğiliminin artması ve bu sayede gözenekliliğinde azalmanın oluşması ile açıklanabilir.

Çizelge 4.5. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g) Önce	ÖYA[a] (m^2/g) Sonra	[b]K_o (m^2) Önce	[b]K_o(m^2) Sonra
25.00	40.9	36.5	4.47×10^{-12}	3.82×10^{-12}
31.50	66.3	63.4	2.48×10^{-12}	2.22×10^{-12}
37.50	81.9	79.2	0.23×10^{-12}	0.22×10^{-12}
50.00	89.9	86.3	0.08×10^{-12}	0.07×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi: % 10 (v/v), a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

Çizelge 4.6. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g) Önce	ÖYA[a] (m^2/g) Sonra	[b]K_o (m^2) Önce	[b]K_o (m^2) Sonra
37.5	4.1	2.0	2.07×10^{-12}	1.66×10^{-12}
50.0	27.2	26.2	1.59×10^{-12}	1.47×10^{-12}
62.5	34.2	31.3	1.16×10^{-12}	1.03×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi: % 10 (v/v), a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.

Çizelge 4.7. Farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

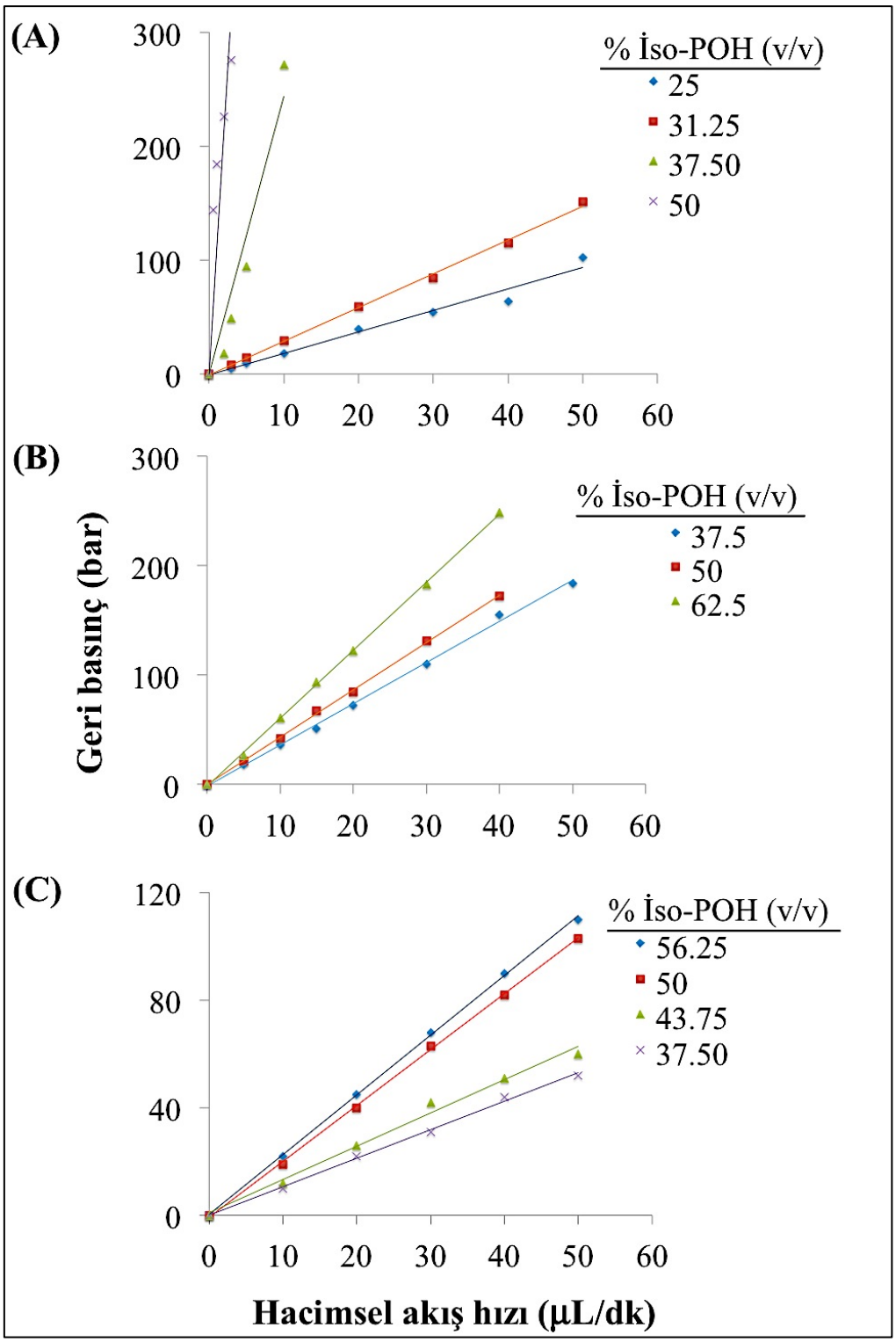
İso-PrOH (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g) Önce	ÖYA[a] (m^2/g) Sonra	[b]K_o ($m^{2)}$) Önce	[b]K_o (m^2) Sonra
37.50	76.0	73.4	7.07×10^{-12}	6.01×10^{-12}
43.75	80.4	78.5	6.27×10^{-12}	5.17×10^{-12}
50.00	82.3	81.4	3.51×10^{-12}	3.08×10^{-12}
56.25	86.4	83.2	3.24×10^{-12}	2.88×10^{-12}

HPMA-Cl derişimi: % 10 (v/v), a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik

Farklı çapraz bağlayıcılar ile İso-PrOH derişimi değiştirilerek sentezlenen kapiler monolitler için geri basıncın mobil faz akış hızı ile değişimi Şekil 4.9'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi geri basınç akış hızı ilişkisi bütün çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitler için doğrusal formdadır. Aynı davranış türevlendirilmemiş monolitik kolonlar ile de gözlenmiştir (Şekil 4.4). Sabit basınçtaki ve sabit İso-PrOH derişimindeki geri basınç değerleri kıyaslandığında ise çapraz bağlayıcı türleri için sıralamanın aşağıdaki şekilde olduğu görülmektedir.

GDMA>EDMA>BDDA

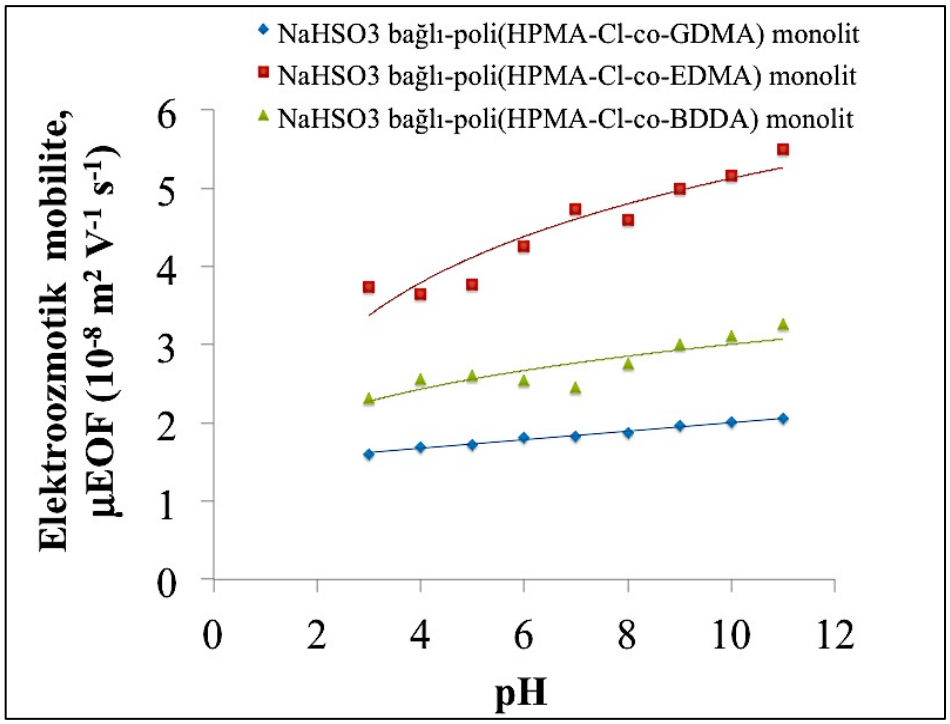
Bu durum türevlendirilmemiş monolitlerde olduğu gibi, geri basınç değerinin artan çapraz bağlayıcı hidrofobisitesi ile azaldığını göstermektedir.



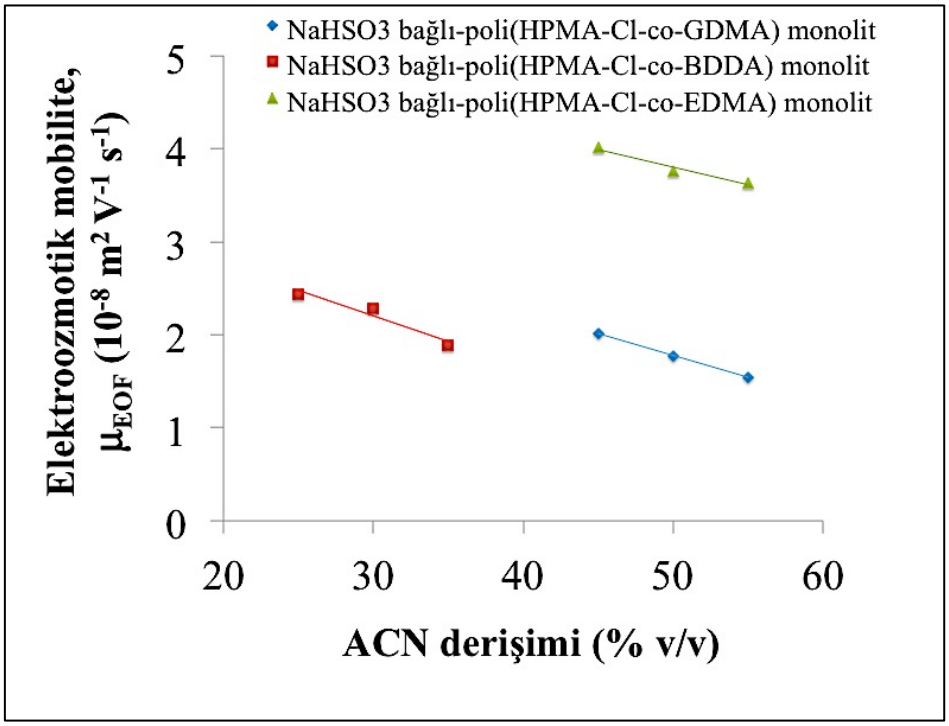
Şekil 4.9 Sülfonik asit ile türevlendirilen farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA) (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), monolitler ile elde edilen geri basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

Monolitlerin mobil faz geçirgenliğini gösteren bir başka parametre ise elektro-ozmotik mobilitedir. Yüksek elektroozmotik mobilite, mobil faz ile birlikte hareket eden analitlerin kolon boyunca transferinin hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir [153]. Sentezlenen bu kolonlar arasından, geri basınç ve EOF değerleri göz önünde tutularak, % 31.25 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolit, % 50 İso-PrOH derişimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit ve % 37.5 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit seçilerek pH ve ACN derişiminin EOF üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen HPMA-Cl bazlı monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin pH ile değişimi Şekil 4.10.'da verilmiştir. Ölçümlerde kolon içerisindeki alıkonmayan analit olarak tiyoüre kullanılmıştır. Şekil 4.10.'dan görüldüğü gibi monolitlerin, EOF değerleri artan pH ile hafif bir artış göstermektedir. Bu durum, monolit yüzeyinde iyonik gücün artması ile açıklanmakta ve poliakrilat monolitlerin çoğunda böyle bir davranış gözlenmektedir [154-158]. Sentezlenen kolonlar ile çalışılan pH aralığında önemli bir kütle transfer kısıtlaması olmaması ve yeterli EOF değerlerinin sağlanması, kromatografik analiz için pH 3-11 aralığının uygun olduğunu göstermiştir.

Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitlerde, elektroozmotik mobilite değerlerinin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.11.'de verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi ACN konsantrasyonundaki artış ile elektoozmotik mobilite değeri azalmaktadır. Bu durum, artan organik çözücü miktarı ile iyonik gücün ve zeta potansiyelinin azalmasından kaynaklanmaktadır [29,144]. Ancak geniş bir derişim aralığında bu azalmanın kromatografik kullanımı engellemeyecek, önemsiz bir azalma olduğu söylenebilir.



Şekil 4.10. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen HPMA-Cl monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin pH ile değişimi.



Şekil 4.11. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA), ve poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin ACN derişimi ile değişimi.

Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen ve sodyum bisülfit bağlanarak güçlü katyon değiştirici forma dönüştürülen monolitlerin ligand içeriği elementel analiz ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8.'de verilmiştir. Bu amaçla % 10 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen monolitler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, monolitin HPMA-Cl içeriğinin yalnızca sınırlı bir kısmının (ağırlıkça % 2-3) sülfolanabildiğini göstermektedir. Kullanılan çapraz bağlayıcının hidrofobisitesinin artışı ile monolitlerin $-SO_3H$ içeriğinin azaldığı görülmektedir. Bu durum beklenen bir sonuçtur. Çünkü $NaHSO_3$ ile sülfolama işlemi sulu fazda yapılmaktadır ve $NaHSO_3$'ün sulu fazdan monolitik yapıya difüzyonu ve yapıda bulunan reaktif kloropropil grupları ile kimyasal etkileşimi, yapının hidrofobisitesi ile yakından ilgilidir. Daha hidrofilik olan monolitik matriste, difüzyonun ve reaktif gruplar ile etkileşimin daha kolay olması beklenmektedir. Bu beklentiye uygun olarak en hidrofilik çapraz bağlayıcı olan GDMA ile en yüksek, en hidrofobik çapraz bağlayıcı olan BDDA ile ise en düşük $–HSO_3$ içerikleri elde edilmiştir. Ancak dikkati çeken önemli bulgu, gerek ACN, gerekse pH etkisinin çalışıldığı deneylerde, EDMA ile diğer çapraz bağlayıcılara kıyasla daha yüksek elektroozmotik akış değerlerinin elde edilmiş olmasıdır. Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7 incelendiğinde EDMA ile elde edilen monolitik yapıların, diğer çapraz bağlayıcılara kıyasla daha düşük özgül yüzey alanı değerlerine sahip olduğu gözlenmektedir. Bu durum EDMA varlığında daha büyük ortalama gözenek yapısına sahip monolitlerin elde edildiğini göstermektedir. -HSO3 içeriği en yüksek monolit olmamasına rağmen, elektroozmotik koşullarda en yüksek mobil faz akış hızının EDMA ile elde edilmiş olması bu monolitin bağıl olarak daha yüksek ortalama gözenek boyutu nedeniyle mobil faz akışına karşı gösterdiği daha düşük direnç ile açıklanabilir.

Çizelge 4.8. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı monolitlerin ligand içeriği

Çapraz bağlayıcı türü	İso-PrOH derişimi (% v/v)	Kükürt içeriği (% w/w)	-SO_3H içeriği (mg -SO_3H/g kuru monolit)
GDMA	31.25	0.4	15.9
EDMA	50.00	0.3	11.4
BDDA	37.50	0.2	9.4

HPMA-Cl derişimi: % 10 (v/v), Bağlama sıcaklığı: 80 ^oC, 20 saat.

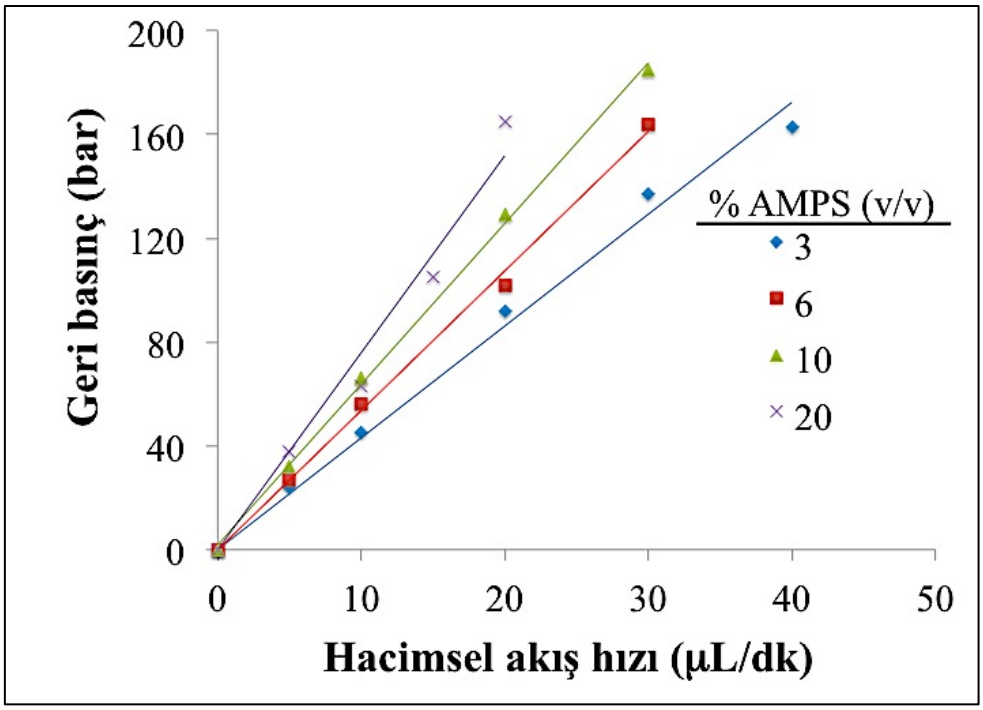
Literatürde, yüklü grup içeren komonomerlerin polimerizasyon işleminde direkt olarak kullanılması ile EOF oluşturabilme yeteneğine sahip polimerik monolitler sentezlenmektedir [69]. HPMA-Cl ile sentezlenen monolitlerin $NaHSO_3$ ile türevlendirilmesi sonucu elde edilen monolitlerin EOF davranışı ve geçirgenlik özelliklerini yüklü monomer içeren kopolimerizasyon ile sentezlenen monolitler ile karşılaştırabilmek amacıyla literatürde yaygın olarak kullanılan ve $–SO_3H$ grubu içeren AMPS monomeri ile poli(AMPS-co-EDMA) kopolimeri formunda monolit sentezi yapılmıştır. Bir başka deyimle sentezlenenen poli(AMPS-co-EDMA) monolitler, sülfonik asit ile türevlendirilmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) bazlı monolitlerin geçirgenlik davranışlarını değerlendirebilmek amacıyla referans materyal olarak kullanılmıştır. Monolitler AMPS ve EDMA monomerlerinin serbest radikal kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Sentezlerde, gözenek yapıcı solvent/monomer oranı 4/1 mL/mL, sentez sıcaklığı ise 50 ^oC değerinde sabit tutulmuştur. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) monolitik kolonları için yüzey alanı ve kolon geçirgenliği değerleri Çizelge 4.9.'da verilmiştir. AMPS derişiminin kolon geri basıncı üzerindeki etkisi ise Şekil 4.12.'de belirtilmiştir. Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi monolitlerde AMPS derişimi arttıkça özgül yüzey alanı değerleri azalmaktadır. Dolayısıyla kolon geçirgenliği ortalama gözenek boyutu azaldığı için azalmıştır. Şekil 4.12'de sentezlenen monolitler için verilen basınç eğrileri, AMPS derişim aralığının monolitlerin geri basınç davranışını önemli ölçüde değiştirilebildiğini göstermektedir. Mikrogözenek yapısının artışı ile

akışa karşı direncin etkin bir şekilde arttığı dikkat çekmektedir. Bu sonuç artan AMPS derişimi ile geri basınç değerinin artmasından kaynaklanmaktadır. Çizelge 4.2.'de verilen ve farklı İso-PrOH derişimleri ile sentezlenen sülfonik asit bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri, Çizelge 4.9.'da poli(AMPS-co-EDMA) monolitler için verilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Her iki tür monolit arasında kolon geçirgenliği yönünden önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi poli(AMPS-co-EDMA) monolitlerde AMPS içeriğinin artışı ile özgül yüzey alanı değerleri bariz bir düşüş göstermektedir. % 3 AMPS içeriğine sahip monolit ile poli(AMPS-co-EDMA) monolitin özgül yüzey alanı sülfolanmış poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlere kıyasla yüksektir. Ancak, diğer AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları, sülfolanmış poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlere çok yakındır. Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.9.'un karşılaştırılması sonucunda, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin –HSO3 ile sonradan türevlen-dirilmesi ile CEC sisteminde yaygın kullanımı olan AMPS bazlı monolitlere yakın geçirgenlik ve yüzey alanı özelliklerine sahip monolitik ayırma ortamlarının sentezlenebileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.9. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) monolitlerin özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

AMPS (%w/w)	ÖYA[a] (m^2/g)	[b]K_o (m^2)
3.0	73.5	0.85×10^{-12}
6.0	42.4	1.03×10^{-12}
10.0	18.9	1.19×10^{-12}
20.0	12.4	1.53×10^{-12}

İso-PrOH derişimi (% v/v): 50 a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.



Şekil 4.12. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen poli(AMPS-co-EDMA) kapiler monolitlerin geri basınç-hareketli faz akış hızı eğrileri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

4.2.2. Polietilenimin (PEI) ile Türevlendirilen Kapiler Monolitlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler PEI ile türevlendirilerek monolit üzerinde katyonik yük oluşturulması hedeflenmiştir. PEI'nın primer ve tersiyer amino grupları ve polimerik matrisin kloropropil grupları arasındaki direkt reaksiyon ile PEI'nın monolitik yapıya bağlanması sağlanmıştır (Şekil 3.3.). Türevlendirme sonuçlarına bakılarak farklı monomer derişimleri ile sentezlenmiş ve uygun geri basınç değerine sahip monolitlerin kromatografik analiz için seçilmesi yoluna gidilmiştir.

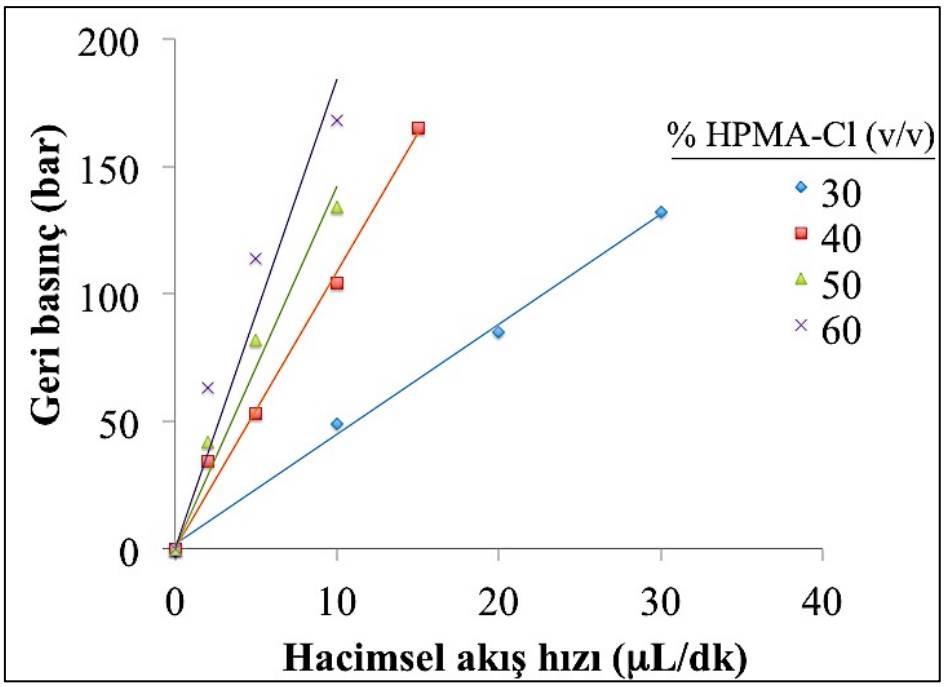
Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin PEI ile türevlendirilmesi sonucu azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile elde edilen özgül yüzey alanı değerleri ve kolon geçirgenlikleri Çizelge 4.10.'da

verilmiştir. Burada görüldüğü gibi, türevlendirme ile birlikte özgül yüzey alanında ve kolon geçirgenliğinde hafif bir azalma oluşmuştur. Bu durum gözeneklerin, bağlanan PEI molekülleri ile kısmen dolmasından kaynaklanmaktadır. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile 50 ^{o}C'da sentezlenen ve PEI ile türevlendirilmiş monolitlerin geri basınç eğrileri ise Şekil 4.13.'de verilmiştir. Basınç eğrileri, Şekil 4.7.'de türevlendirilmemiş monolitlere ait eğriler ile kıyaslandığında türevlendirme sonrası geri basınç değerinin hafif artış gösterdiği gözlenmektedir.

Çizelge 4.10. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin türevlendirme öncesi ve sonrası özgül yüzey alanları ve geçirgenlik değerleri

HPMA-Cl (% v/v)	ÖYA[a] (m^2/g) Önce	ÖYA[a] (m^2/g) Sonra	[b]K_o (m^2) Önce	[b]K_o (m^2) Sonra
30	19.5	14.0	5.37×10^{-13}	4.92×10^{-13}
40	14.5	12.1	4.60×10^{-13}	3.77×10^{-13}
50	9.2	5.4	3.21×10^{-13}	2.93×10^{-13}
60	7.6	5.2	1.80×10^{-13}	1.51×10^{-13}

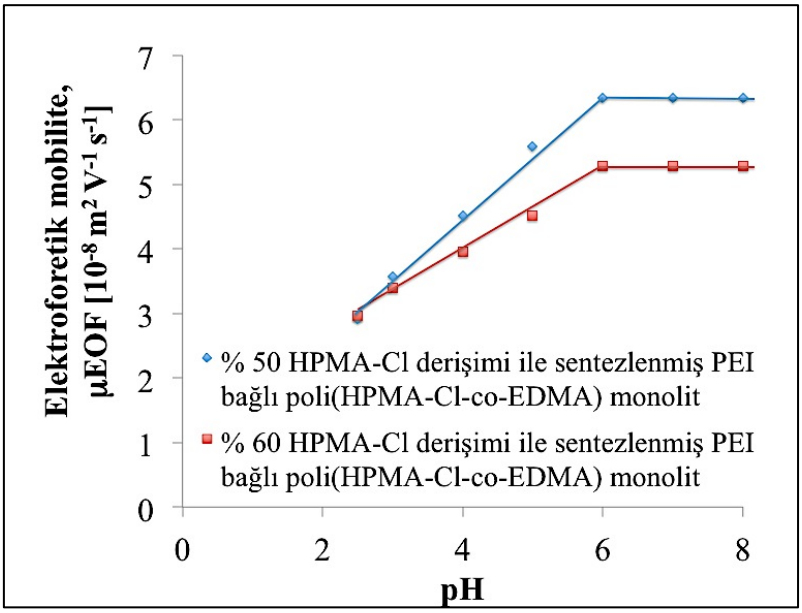
% 30, % 40, % 50 HPMA-Cl (v/v) derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 55, % 60 HPMA-Cl derişiminde İso-PrOH derişimi (% v/v): 30, a: Özgül yüzey alanı, b: Geçirgenlik.



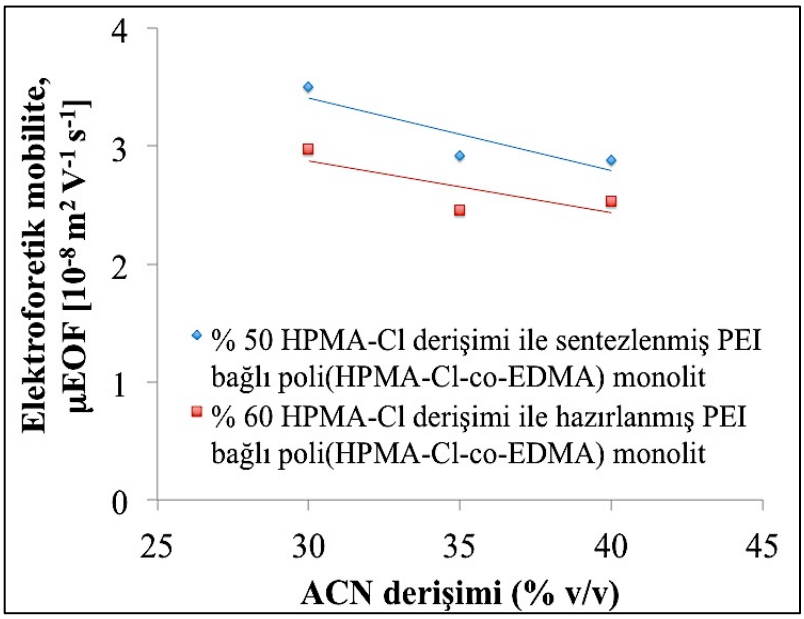
Şekil 4.13. PEI ile türevlendirilen farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin geri basınç akış hızı grafikleri. Hareketli faz: 50/50 mL/mL ACN/5 mM pH 2.5 tamponu. Monolit boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

Sentezlenen bu kolonlar arasından, geçirgenlik değerleri dikkate alınarak, % 50 ve % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenmiş monolitler seçilmiş ve bu monolitler için pH ve ACN derişiminin EOF üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.14., Şekil 4.15.). Şekil 4.14'de pH 2-6 aralığında EOF'ta doğrusal artış gözlenmiştir. Bu artış PEI üzerinde yer alan farklı amin gruplarının protonasyonu ile açıklanabilir. Bu aralıkta PEI'nın iyonizasyon eğiliminde artış beklenir. Bu iyonizasyon mobil fazdaki fosfat iyonları ile daha iyi etkileşime neden olmakta ve EOF değerinde artış ile sonuçlanmaktadır. pH 6-8 aralığında ise pH ile EOF değerinde önemli bir değişim olmamaktadır. Bu durum ise söz konusu aralıkta amin gruplarının deprotonasyonu sonucu iyonizasyon eğiliminin giderek azalması ve buna bağlı olarak mobil fazdaki fosfat iyonları ile sabit faz arasındaki etkileşimin pH ile önemli bir değişim göstermemesinin sonucudur [17]. Benzer davranış Bedair ve El Rassi'nin çalışmasında, ters faz CEC sisteminde katyonik stearil akrilat monolit ile gözlenmiştir [17]. EOF'nin yönü ve büyüklüğü mobil faz iyonlarının adsorp-siyonundan önemli ölçüde etkilenmektedir [159].

Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi ACN konsantrasyonundaki değişim EOF'yi fazla değiştirmemektedir. Bu durum, artan organik çözücü derişimi ile iyonik gücün ve zeta potansiyelinin önemli oranda değişmediğini göstermektedir. [29,144].



Şekil 4.14. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerlerinin pH ile değişimi.



Şekil 4.15. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin elektroozmotik mobilite değerinin ACN derişimi ile değişimi.

Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen ve PEI bağlanarak güçlü anyon değiştirici forma dönüştürülen monolitlerin ligand içeriği elementel analiz yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Sonuçlar monolitin artan HPMA-Cl içeriği ile monolite bağlanan PEI miktarının arttığını ancak, monolit HPMA-Cl içeriğinin tamamının PEI ile reaksiyona girmediğini göstermektedir. Bu durum su bazlı bağlanma ortamında, su ve dolayısıyla PEI'nın monolitik matrisin sabit agregatları içerisine tam olarak difüzlenemediğini, PEI ve kloropropil grupları arasındaki bağlanma reaksiyonunun ağırlıklı olarak monolitin gözenekli yüzeyi üzerinde meydana geldiğini göstermektedir.

Çizelge 4.11. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı monolitlerin ligand içerikleri

Çapraz bağlayıcı türü	HPMA-Cl derişimi (% v/v)	Azot içeriği (% w/w)	PEI içeriği (mg PEI/g kuru monolit)
EDMA	50	1.2	23.9
EDMA	60	0.7	37.3

Bağlama sıcaklığı: 75 ^{o}C, 20 saat.

4.3. $NaHSO_3$ Bağlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının İncelenmesi

Öncelikle $NaHSO_3$ ile türevlendirme için farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen kapiler monolitlerin seçimi yapılmıştır. Sentezlenen kolonlar arasından SEM görüntüleri, geri basınç ve geçirgenlik değerleri değerlendirilerek % 31.3 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolit, % 50 İso-PrOH derişimi ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit ve % 37.5 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit sabit faz sentezi için çıkış materyali olarak seçilmiştir. Bu seçimde, öncelikle monolitin 0.010-0.040 μL/dakika aralığında mobil faz akış hızı için yaklaşık 10-150 bar aralığında geri basınç değerleri üretebilir olması kriter olarak alınmıştır. Literatürde, bu kritere uyan geri basınç mobil faz akış hızı ilişkisine sahip kapiler monolitik kolonlar ile

kapiler elektrokromatografi sisteminde başarılı kromatografik ayrımların yapılabildiği görülmektedir [160-162]. Monolitik kolonların kromatografik performans analizi oda sıcaklığında yapılmıştır. Çalışmada öncelikle uygun ACN/fosfat tampon çözelti oranı ve hareketli faz pH değerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Belirlenen koşullarda, farklı voltaj değerlerinde monolitik kolonların ayırma davranışı incelenmiştir. Kapiler monolitlerin CEC sistemine bağlanması ve kullanılacak hareketli faz ile koşullanmasını takiben, kromatografik performans deneylerinde aromatik hidrokarbon türevleri içeren analit karışımı kullanılmıştır. Deneylerde kolonda alıkonmayan analit olarak tiyoüre ve alkilbenzenlerden ise benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen, bütilbenzen ve pentilbenzen bulunmaktadır. Ayrıca fenollerin ayrımları denenmiş ve başarılı kromatogramlar elde edilmiştir.

4.3.1. Sabit Faz Üzerindeki Fonksiyonel Grup Derişiminin Etkisi

Elektroozmotik akış hızı, yüzey yük yoğunluğuna bağlı olan zeta potansiyeli ile doğru orantılıdır. Yüzeydeki yük yoğunluğunun kontrolü sayesinde elektroozmotik akış hızının da kontrolü sağlanmaktadır. Literatürde bu kontrol genellikle monolit sentezinde kullanılan yüklü komonomer, AMPS derişimi değiştirilerek sağlanmaktadır. Literatürde gözenek yapıcı solvent ve çapraz bağlayıcı türü sabit tutularak farklı AMPS derişimleri kullanılarak yapılan analizlerin sonucunda derişim arttıkça analiz süresinin kısaldığı görülmüştür [69]. Fakat AMPS derişiminin artmasıyla ortalama gözenek çapında da artış meydana gelmiş ve analit-sabit faz arasındaki etkileşim azaldığı için ayrım performansında düşüş gözlenmiştir [69]. Bunun üzerine, AMPS derişimi arttırılırken gözenek çapının sabit kalması için gözenek yapıcı solvent derişimi değiştirilmiştir [69]. Elde edilen kolon ile, analiz süresinin azaldığı ve başarılı kromatografik ayrımın elde edildiği görülmüştür [69].

Tez çalışmasında sentezlenen monolitik kolonlarda yüzeydeki yük yoğunluğunun kontrolü monolitin ‘‘kloropropil’’ grubu derişimi değiştirilerek ayarlanmıştır. Bu amaçla monomer fazındaki HPMA-Cl derişimi hacimce % 5-20 aralığında değiştirilerek, farklı kloropropil grup içeriğine sahip monolitler sabit koşullarda elde edilmiştir. Sentezlenen monolitler çapraz bağlayıcı olarak EDMA kullanımı ile poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kopolimeri formunda elde edilmiştir. Monolitler yine sabit

koşullarda $NaHSO_3$ ile türevlendirilerek, farklı $-HSO_3$ içeriğine sahip monolitlerin eldesi sağlanmıştır. Kromatografik performans deneylerinde bu monolitler ile birlikte % 10 HPMA-Cl derişimi ile hazırlanmış ve $NaHSO_3$ ile sülfolanma işlemi uygulanmayan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit, referans materyal olarak kullanılmıştır. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen ve sodyum bisülfit bağlanarak güçlü katyon değiştirici forma dönüştürülen monolitlerin ligand içeriği elementel analiz ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12.'de verilmiştir. Bu amaçla % 50 İso-PrOH derişimi ile sentezlenen monolitler kullanılmıştır. Çizelge 4.12.'de görüldüğü üzere % 5 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen ve sülfonik asit grubu bağlanan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile en düşük kükürt içeriği tesbit edilmiştir. Bu sonuç yüzeydeki yetersiz iyonize grup ($-HSO_3$) derişiminden kaynaklanmaktadır. Kullanılan HPMA-Cl derişiminin artışı ile monolitlerin $-SO_3H$ içeriğinin arttığı görülmektedir. % 20 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kolonda da yüksek $–HSO_3$ derişiminden ötürü kükürt içeriği yüksek çıkmıştır.

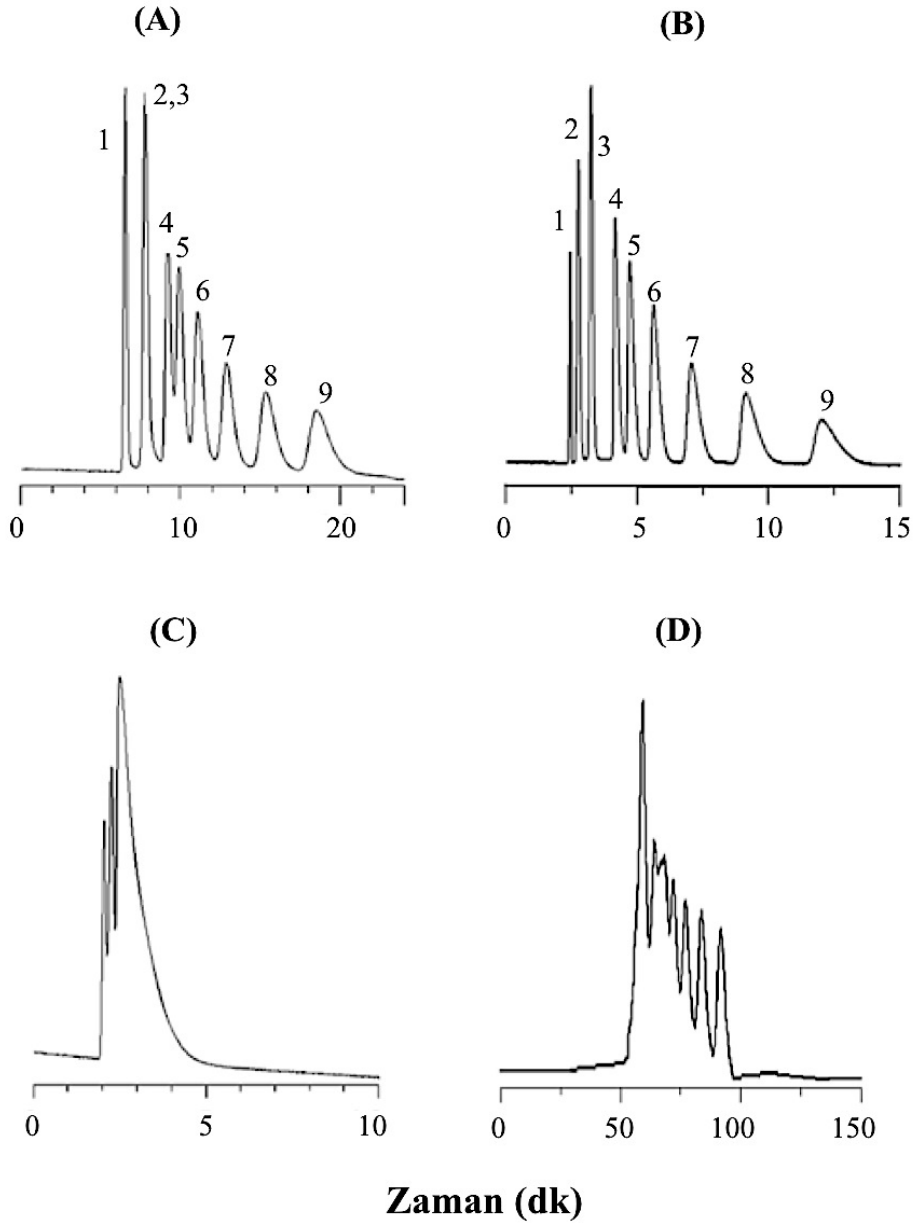
Çizelge 4.12. Farklı monomer derişimleri ile sentezlenen sülfonik asit bağlı monolitlerin ligand içeriği

Çapraz bağlayıcı türü	HPMA-Cl derişimi (% v/v)	Kükürt içeriği (% w/w)	$-SO_3H$ içeriği (mg $-SO_3H$/g kuru monolit)
EDMA	5	0.1	3.8
EDMA	10	0.3	11.4
EDMA	20	0.7	27.7

İso-PrOH derişimi: % 50 (v/v), Bağlama sıcaklığı: 80 ^oC, 20 saat.

Farklı HPMA-Cl başlangıç derişimleri ile sentezlenen ve sülfolama işlemi uygulanan monolitlerin elektrokromatografik performansları Şekil 4.16'da örneklenmektedir. Burada sülfolanma işlemi uygulanmayan HPMA-Cl bazlı monolit referans ayırma ortamı olarak kullanılmıştır. Şekil 4.16.'da görüldüğü üzere

türevlendirme yapılmadan %10 HPMA-Cl derişimi ile hazırlanmış poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit ile başarılı bir kromatografik ayrım elde edilememiştir. Bu davranış yüzeye herhangi bir ligand bağlanmayan monolitik kolon için beklenen bir sonuçtur. En iyi kromatografik performans, % 10 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen ve sülfonik asit grubu bağlanan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile elde edilmiştir. % 5 ve % 20 HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar ile elde edilen kromatografik ayrım % 10 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kolona kıyasla daha kötüdür. % 5'lik HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kolonda EOF oluşumu için yetersiz iyonize grup (-HSO_3) derişimi nedeniyle analiz süresi uzamakta, % 20-HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kolonda da yüksek –HSO_3 derişiminden ötürü, yüksek hızla analitler kolondan geçmekte ve yetersiz alıkonma nedeniyle kromatografik ayrım gerçekleşmemektedir.



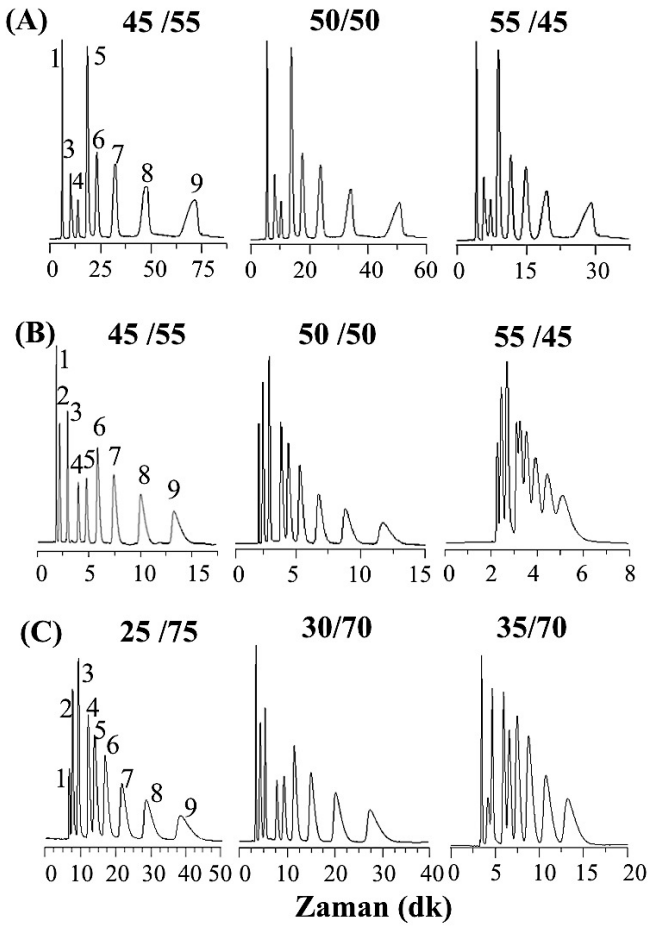
Şekil 4.16. Farklı HPMA-Cl derişimleri (% hacim): (A) 5, (B) 10, (C) 20 ile elde edilerek $NaHSO_3$ ile sülfolanma işlemi uygulanan ve (D) % 10 HPMA-Cl derişimi ile hazırlanmış, fakat sülfolanma işlemi uygulanmamış poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar ile elde edilen elektrokromatogramlar. İso-PrOH derişimi: % 50 v/v, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 50/50, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen.

4.3.2. Mobil faz polaritesinin (ACN derişimi) etkisi

Bu bölümde, mobil faz polaritesinin HPMA-Cl bazlı kapiler monolitlerin elektro-kromatografik performansına etkisi incelenmiştir. Monolitik kolonlar ile yapılan kromatografik çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada öncelikle hareketli faz için uygun ACN/fosfat tamponu oranının belirlenmesi sağlanmıştır. Takiben en uygun ACN/fosfat tamponu oranı ile farklı voltaj değerlerinde elektrokromatografik ayırma davranışı incelenmiştir.

HPMA-Cl başlangıç derişimi % 10 değerinde sabit tutularak, GDMA, EDMA ve BDDA ile sentezlenen ve sabit koşullarda $NaHSO_3$ ile türevlendirilen monolitik kolonlar kullanılarak farklı ACN/fosfat tamponu oranları ile elde edilen kromatogramlar Şekil 4.17.'de verilmektedir. Bu sentezlerde İso-ProH derişimi GDMA, EDMA ve BDDA bazlı monolitler için sırasıyla, % 31.2, % 50.0 ve % 37.5 değerlerinde tutulmuştur. Şekil 4.17'de yer alan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise sırasıyla Çizelge 4.13., 4.14. ve 4.15.'de verilmektedir. Şekil 4.17.'deki elektrokromatogramlardan görüldüğü gibi farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen tüm monolitik kolonlar ile özellikle düşük ACN derişimlerinde başarılı kromatografik ayrım elde edilmiştir. Çizelge 4.13., 4.14. ve 4.15.'deki elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında, iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin farklı ACN/5 mM fosfat tamponu oranlarının çoğunda sağlandığı görülmektedir. ACN derişimi arttığında mobil faz polaritesinin azalması ile analitlerin alıkonması azalmış ve toplam analiz süresi kısalmıştır. Ancak, kolonda yetersiz alıkonma nedeniyle, ACN derişiminin artışı ile kromatografik ayrımın zorlaştığı ve Çizelge 4.13, 4.14 ve 4.15'de görüldüğü gibi bütün monolitler için pik çözünürlüğü değerlerinin azaldığı gözlenmiştir. Şekil 4.17'de verilen kromatogramlar değerlendirildiğinde, en kısa analiz süresi ve en yüksek çözünürlük değerlerine sahip elektrokromatogramların poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit ile elde edildiği görülmektedir. Poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolit ile analiz süresi uzun ve pik çözünürlükleri de düşüktür. Poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit ile çözünürlük değrleri poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolite yakın olmasına karşın toplam analiz süresi daha uzundur. Bu durum ise BDDA'nın EDMA'ya kıyasla daha hidrofobik olması ve hidrofobik özelliğe sahip

aromatik hidrokarbonların, bu sabit faz üzerinde daha fazla alıkonması ile açıklanabilir. Sonuç olarak, analiz süresi ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA), sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonları için en uygun ACN/fosfat tamponu hacimsel oranları, sırasıyla 50/50, 50/50 ve 30/70 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit kullanılarak farklı ACN/5mM pH 7 tamponu oranları kullanılarak elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektro-kromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen (9) pentilbenzen.

Çizelge 4.13. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri.

	Pik çözünürlüğü						
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**
45/55	2.98	3.15	4.02	1.85	2.18	2.00	1.90
50/50	3.01	3.21	3.96	1.80	2.13	1.87	1.78
55/45	2.04	1.05	1.76	1.62	1.86	1.52	1.62

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) butilbenzen, (8) pentilbenzen.

Çizelge 4.14. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri.

	Pik çözünürlüğü							
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**	**R(9/8)**
45/55	3.18	3.48	4.20	1.95	2.42	2.40	2.10	2.15
50/50	3.14	3.40	4.18	1.84	2.36	2.34	2.26	2.10
55/45	1.38	1.35	1.91	0.67	0.56	1.22	0.70	0.72

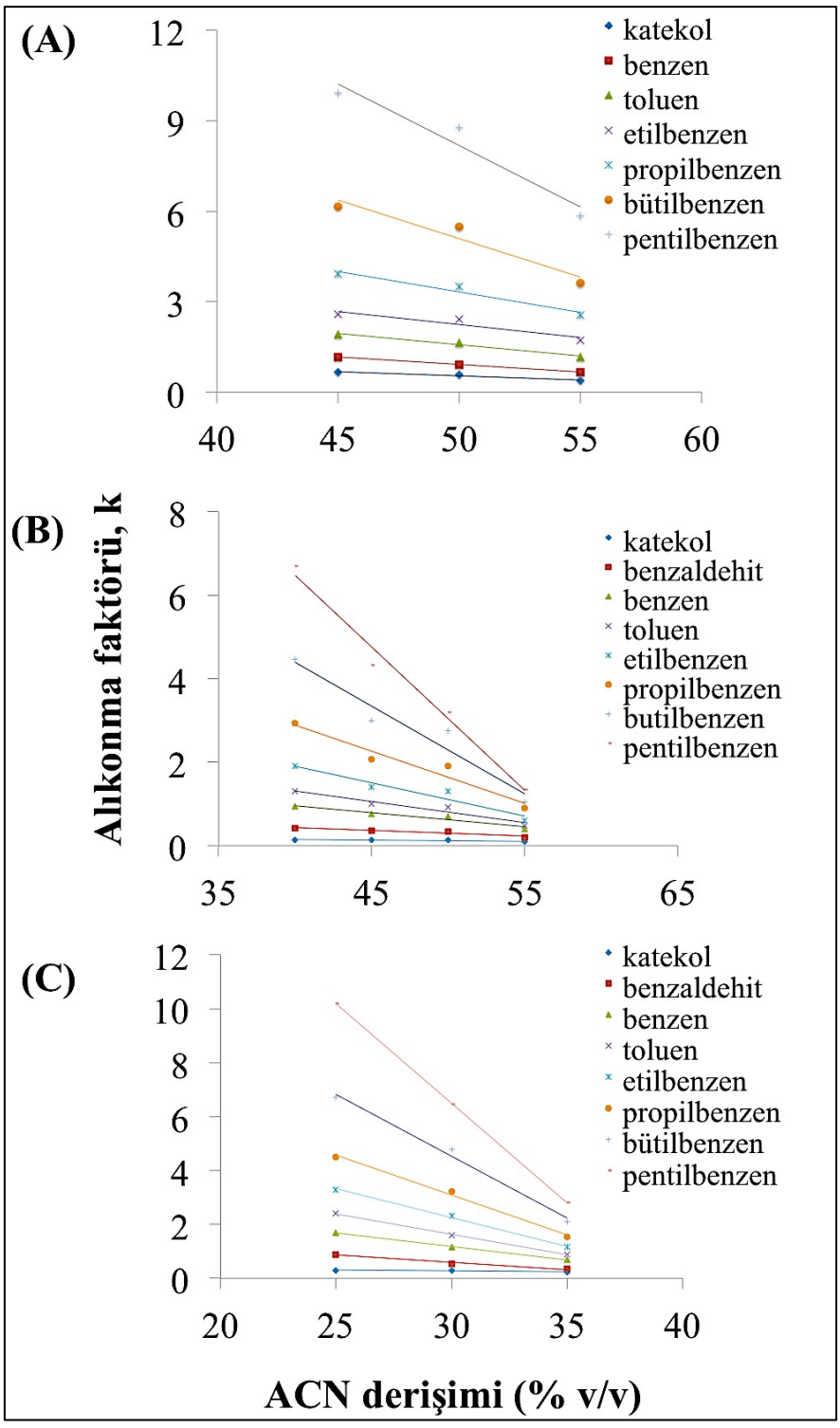
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) butilbenzen, (9) pentilbenzen.

Çizelge 4.15. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (5 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri.

	Pik çözünürlüğü							
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**	**R(9/8)**
25/75	3.03	3.20	4.10	1.90	2.32	2.24	2.05	2.09
30/70	3.11	3.34	4.10	1.78	2.25	2.15	1.98	2.00
35/65	2.15	1.11	2.01	1.71	1.95	1.75	1.92	1.85

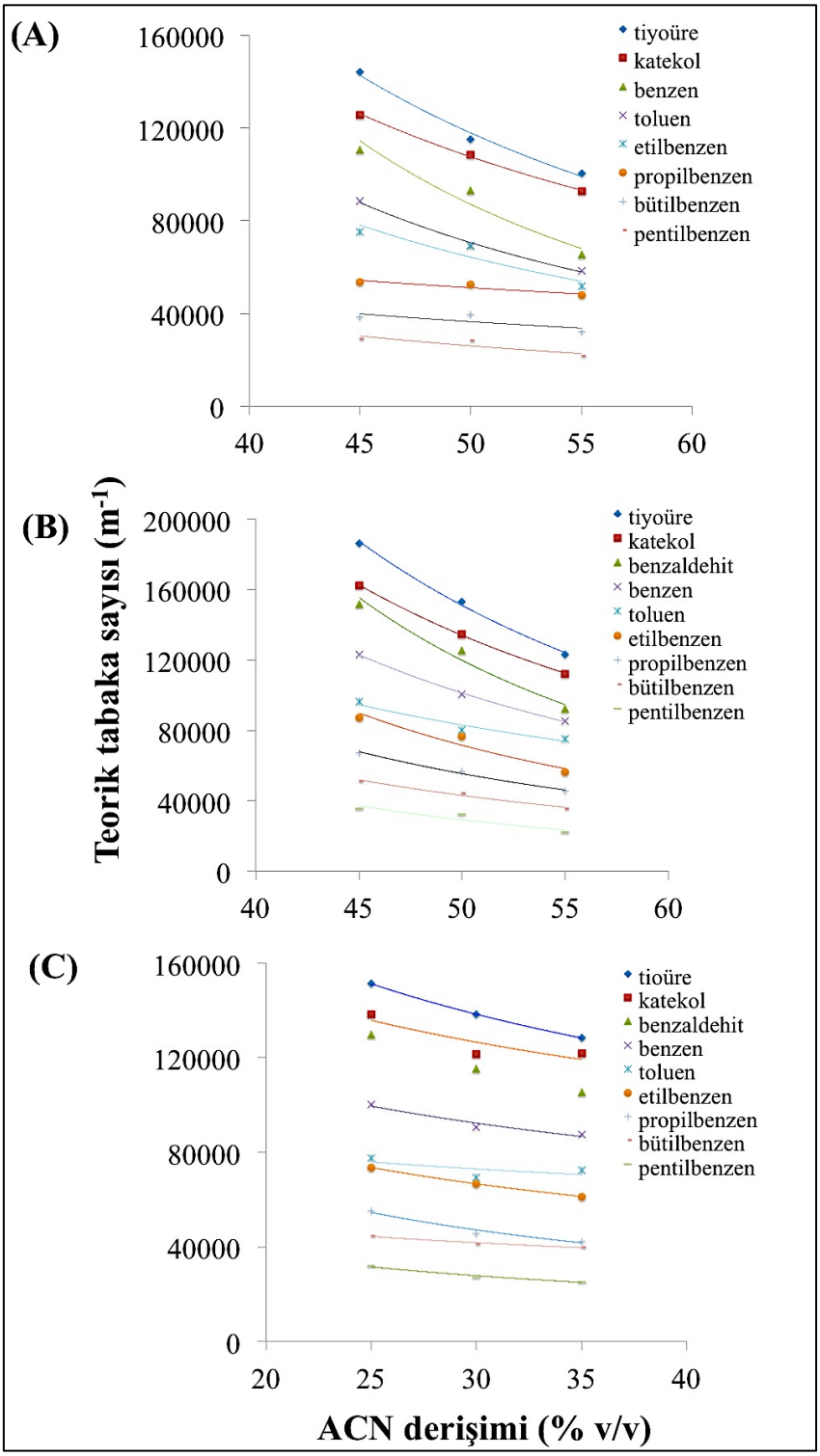
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) butilbenzen, (9) pentilbenzen.

Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitik kolonlar için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.18.'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi alıkonma faktörü ACN derişimi ile doğrusal olarak azalmaktadır. Bu davranış sentezlenen monolitlerin ters faz kolonu formatına uygun olduğunu göstermektedir [142,158]. Çünkü benzer davranış, poliakrilat bazlı farklı kapiler monolitik kolonlar için literatürde tanımlanmıştır [142,158]. Artan ACN derişimi ile farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen bütün kolonlarda farklı analitler için hesaplanan alıkonma faktörünün birbirine yaklaştığı görülmektedir. Ancak GDMA bazlı kolonda, alıkonma faktörleri arasındaki fark çalışılan bütün ACN derişimlerinde diğerlerine kıyasla daha fazla korunmaktadır. Ancak, toplam analiz süresinin bu kolonda çok uzun olması iyi ayrım elde edilmesine rağmen kolonun pratik kullanımı yönünden önemli bir dezavantajdır. Alıkonma faktörü farklılığı ve toplam analiz süresi dikkate alındığında en iyi kolonun özellikle % 50 ACN derişimine kadar mobil faz kullanımı için poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon olduğu söylenebilir.

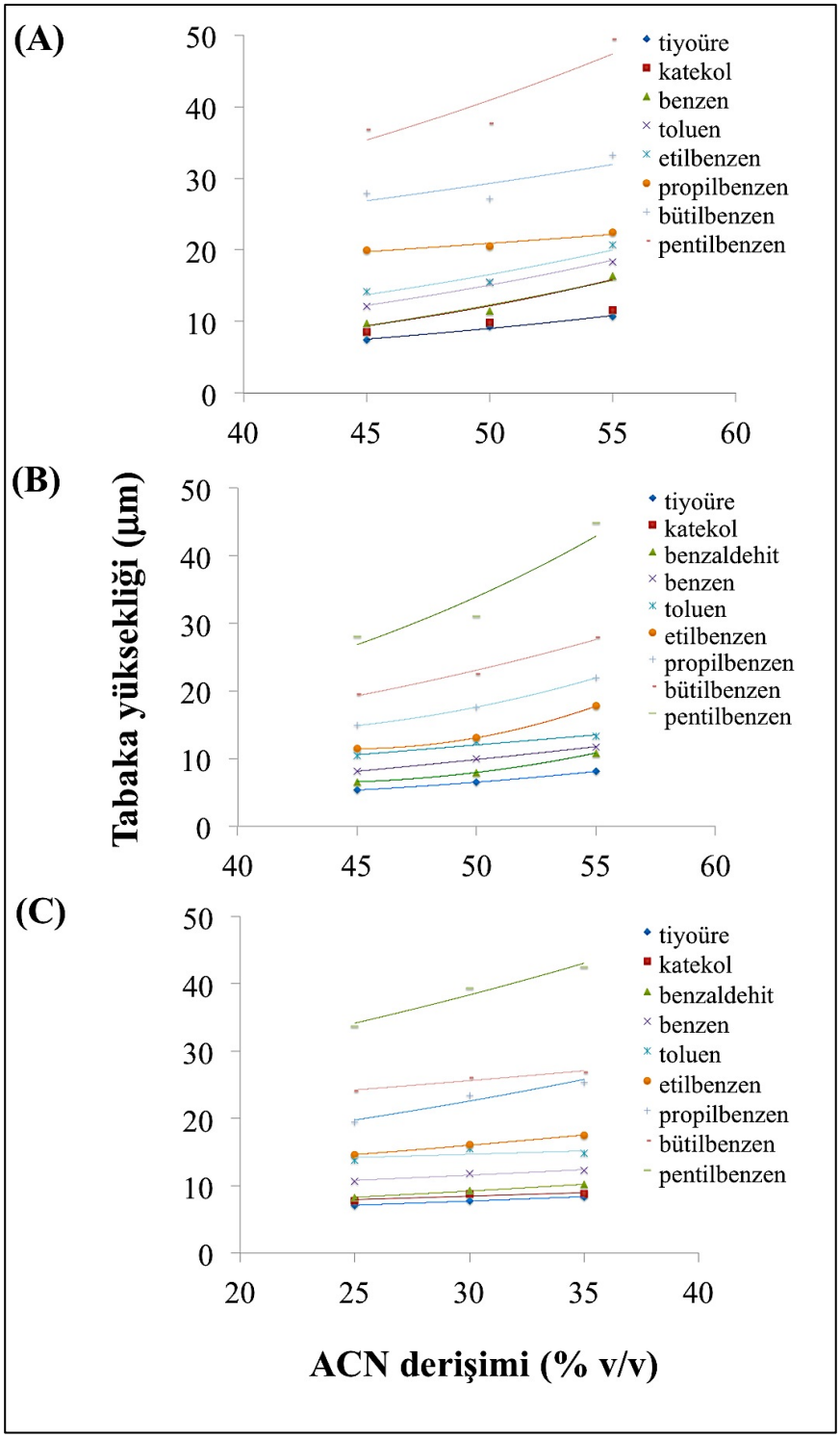


Şekil 4.18. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA), monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

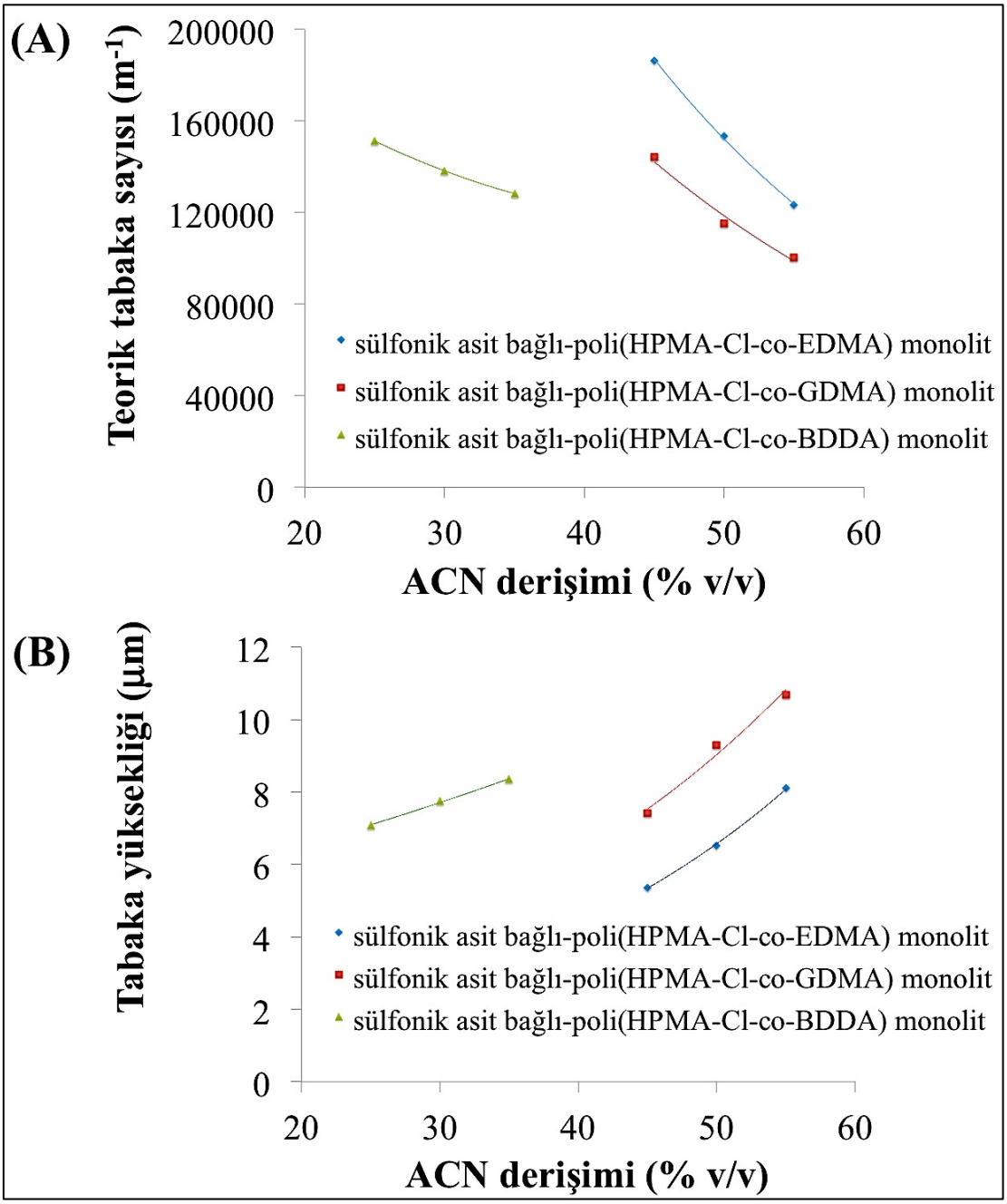
Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.19. ve 4.20.'de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında ACN derişimi arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmiştir. Şekil 4.21.'deki grafiklerde farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenmiş ve sülfonik asit ile türevlendirilmiş kolonların teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi kıyaslamalı olarak verilmiştir. Burada analit olarak tiyoüre kullanılmıştır. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen monolitik kolonlarla elde edilen ayırma verimi; literatürdeki monolitler ile yarışabilir niteliktedir [69,142,165,166]. Düşük ACN/fosfat tamponu değerlerinde daha iyi kromatografik ayrım elde edilmesi bu monolitlerin literatürde bulunan polimetakrilat bazlı monolitlere göre önemli bir avantajını oluşturmaktadır [69,142,165,166]. Literatürde mevcut polimetakrilat monolitik kolonlar 80/20 gibi yüksek solvent içeriğinde iyi ayırma yeteneğine sahiptir [69,142,165,166]. Ancak sentezlenen yeni monolitik kolonların kullanımıyla mobil faz için gerekli solvent ihtiyacı yaklaşık % 40 veya % 70 oranında azaltılmıştır. Bu özellik sentezlenen monolitlerin ''yeşil kromatografiye'' daha yakın olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 4.21'de, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile 45/55 ACN/5 mM fosfat tamponu oranı ile en yüksek teorik tabaka sayısına (186.000 m^{-1}) ve en düşük tabaka yüksekliğine (5.4 μm) ulaşılmıştır. Bu değerler sırasıyla sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonda 25/75 ACN/ 5 mM fosfat tamponu oranı ile 150.000 m^{-1}, 7.0 μm iken sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonda 45/55 ACN/5 mM fosfat tamponu oranı ile 145.000 m^{-1}, 7.5 μm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile daha yüksek verim ile kromatografik ayrım gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.19. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.



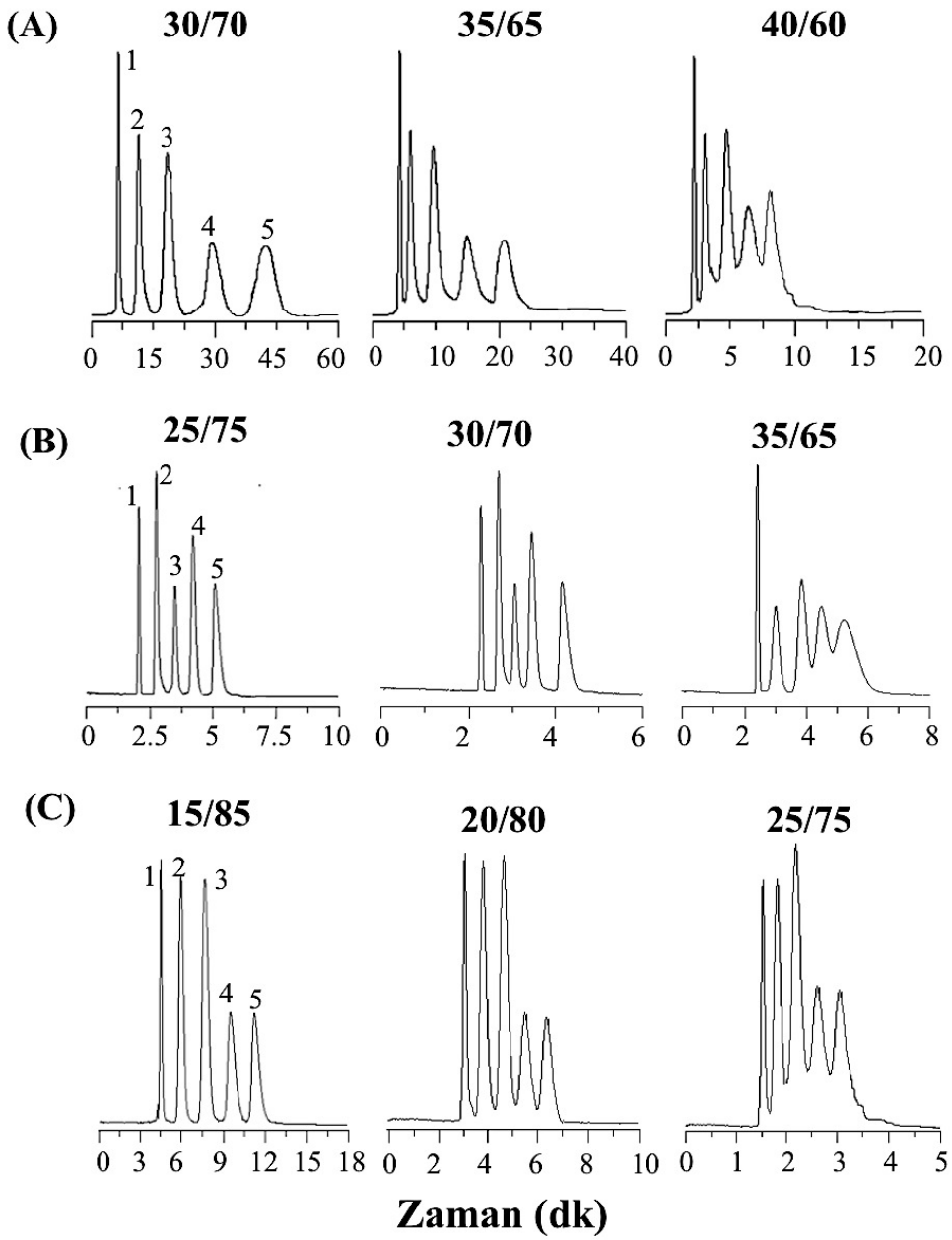
Şekil 4.20. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkil-benzenlerin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.



Şekil 4.21. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı HPMA-Cl bazlı monolitlerde (A) teorik tabaka sayısının (B) tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre.

GDMA, EDMA ve BDDA ile sentezlenen monolitik kolonlar kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 7 tamponu oranları ile elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.22.'de verilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.16., 4.17. ve 4.18.'de gösterilmiştir. Şekil 4.22.'deki elektrokromatogramlardan görüldüğü gibi sülfonik asit ile türevlendirilen ve farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen tüm monolitik kolonlarla fenoller başarılı bir şekilde ayrılmıştır. ACN derişimi arttığında mobil faz polaritesi ve analitlerin alıkonması azaldığı için analiz süresinin azaldığı gözlenmektedir. En iyi kromatografik ayrımlar sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon için 30/70 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kolonu için 20/80 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı ve sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kolonu için 35/65 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı ile elde edilmiştir. Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında, EDMA ile sentezlenen monolitik kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. EDMA ile sentezlenen monolitik kolon, 30/70 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı ile fenol türevlerinin ayrımını 5 dakika gibi kısa bir sürede yapabilmektedir.

Çizelge 4.16., 4.17. ve 4.18.'deki elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında, iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin farklı ACN/10 mM fosfat tamponu oranlarının çoğunda sağlandığı görülmektedir. Her bir kolon için en uygun ACN/10 mM fosfat tamponu oranında çözünürlük değerleri karşılaştırıldığında sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile elde edilen pik çözünürlük değerlerinin diğer çapraz bağlayıcılar ile elde edilen çözünürlük değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 7 tampon oranları kullanılarak elde edilen fenol karışımına ait elektro-kromatogramlar. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.16. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mM pH7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü			
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
30/70	2.54	2.33	2.24	2.01
35/65	1.92	1.85	1.74	1.62
40/60	1.68	1.34	1.21	1.15

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.17. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenolllerin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mM pH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü			
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
25/75	3.97	2.69	2.44	2.53
30/70	3.84	2.62	1.95	2.41
35/65	2.68	2.05	1.44	1.38

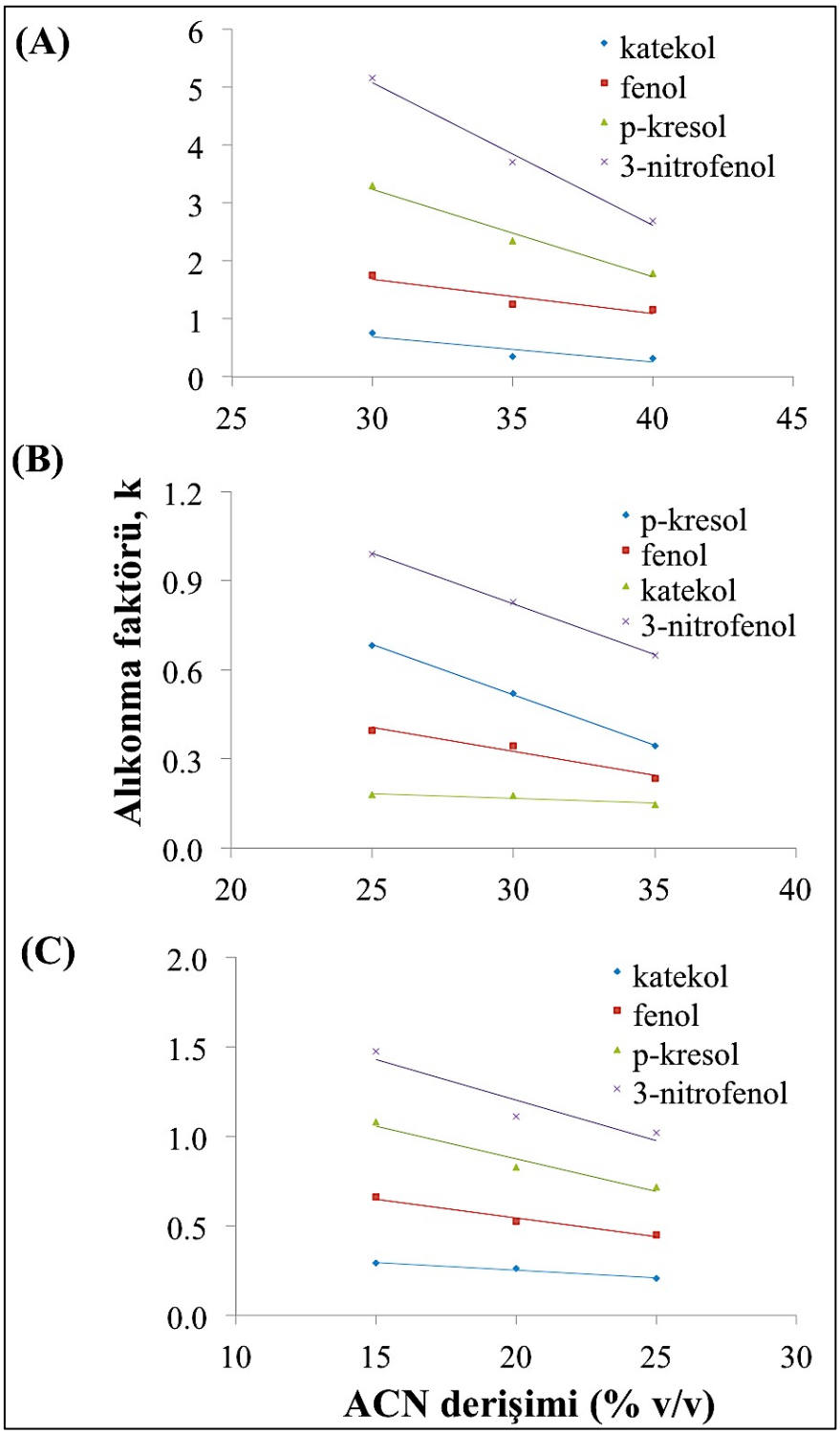
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.18. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, fenolleriin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon (10 mMpH 7 fosfat tamponu) oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü			
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
15/85	2.75	2.51	2.36	2.29
20/80	2.05	1.90	1.85	1.73
25/75	1.89	1.42	1.32	1.35

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

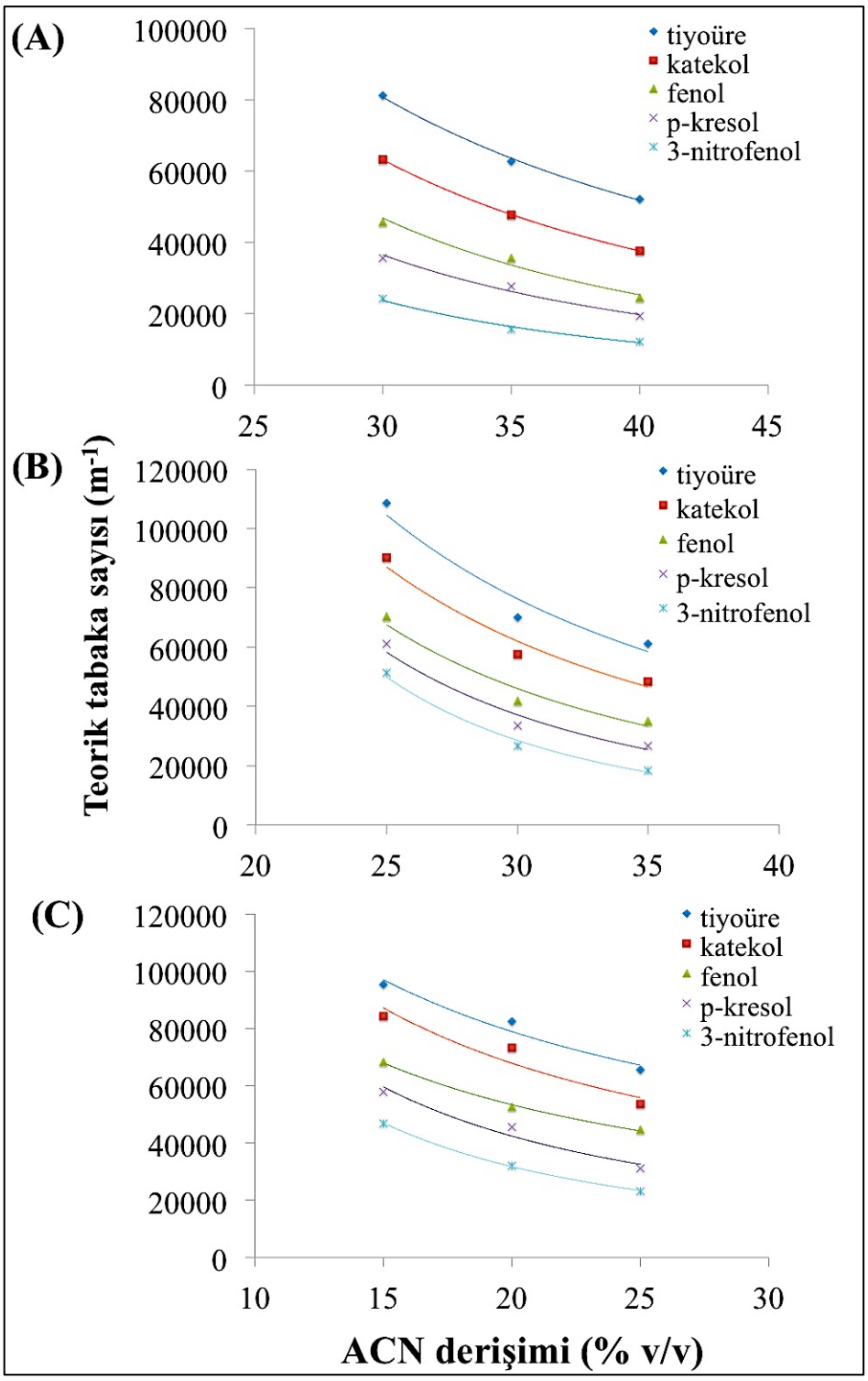
Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitik kolonlar için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.23.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi alıkonma faktörü ACN derişimi ile lineer olarak azalmaktadır. Bu davranış, sentezlenen monolitlerin ters faz kolonu formatına uygun olduğunu göstermektedir [142,158].



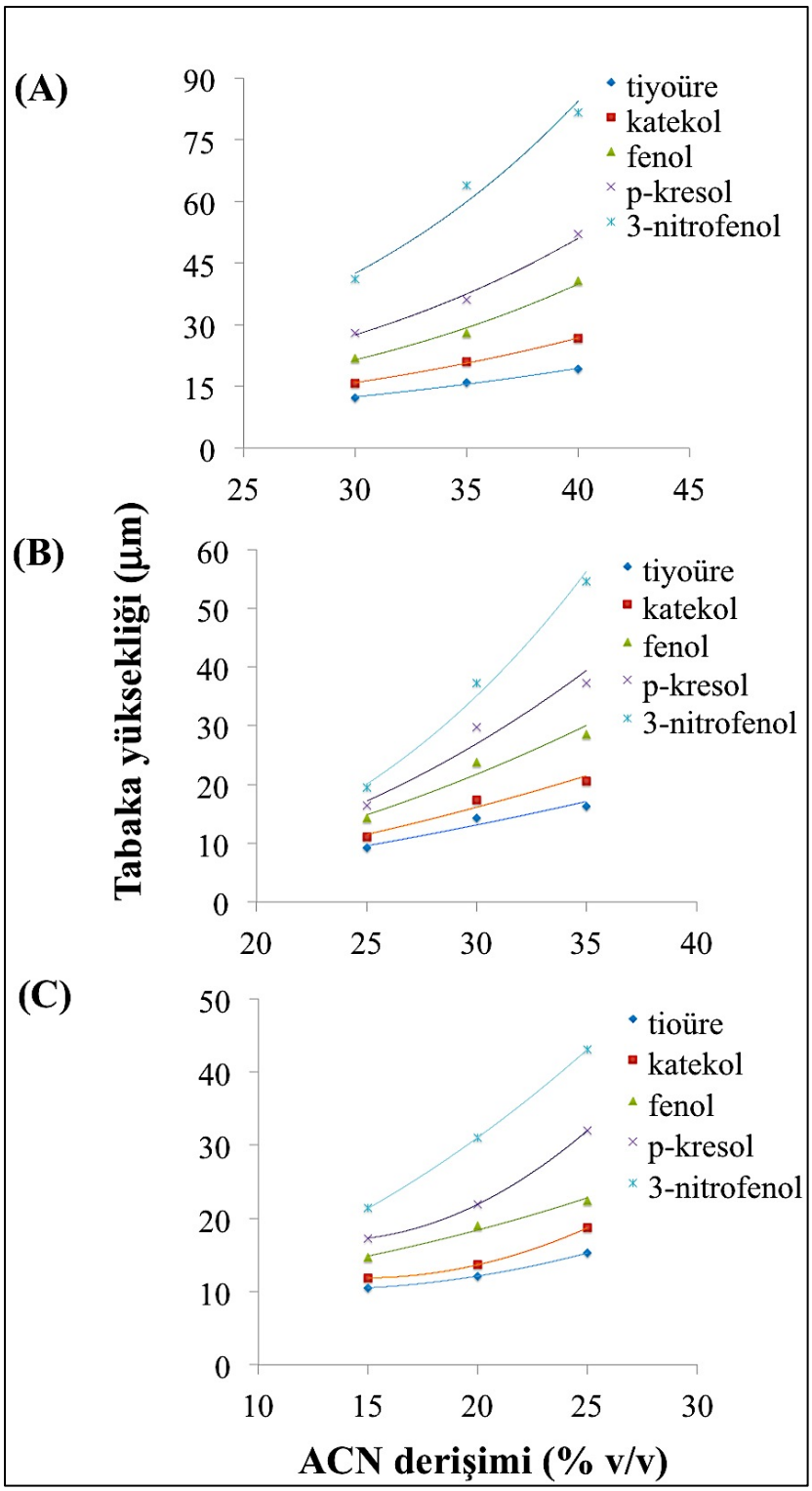
Şekil 4.23. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.24. ve 4.25.'de verilmiştir. Sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile 25/75 ACN/10 mM fosfat tamponu oranında en yüksek teorik tabaka sayısı (108.000 m^{-1}) ve en düşük tabaka yüksekliğine (9.2 μm) ulaşılmıştır. Bu değerler sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kolonda 15/85 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı ile 95.200 m^{-1} ve 10.5 μm iken sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kolonda 30/70 ACN/10 mM fosfat tampon oranı ile 81.000 m^{-1} ve 12.3 μm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre EDMA kullanılarak elde edilen monolitik kolonun, diğer çapraz bağlayıcılara kıyasla daha iyi fenol ayırma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır.

Fenoller için farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen monolitik kolonlarla elde edilen ayırma verimi değerleri, literatürde CEC için kullanılan farklı polimer bazlı monolitler ile yarışabilir niteliktedir [142,166,167]. Düşük ACN/fosfat tamponu değerlerinde daha iyi kromatografik ayrım elde edilmesi bu monolitlerin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Mevcut monolitik kolonlar 80/20 gibi yüksek solvent içeriğinde iyi ayırma yeteneğine sahipken; sentezlenen yeni monolitik kolonlar ile mobil fazdaki solvent derişimi fenol ayrımı için yaklaşık % 60-% 80 aralığında azaltılmıştır [142,166,167].



Şekil 4.24. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

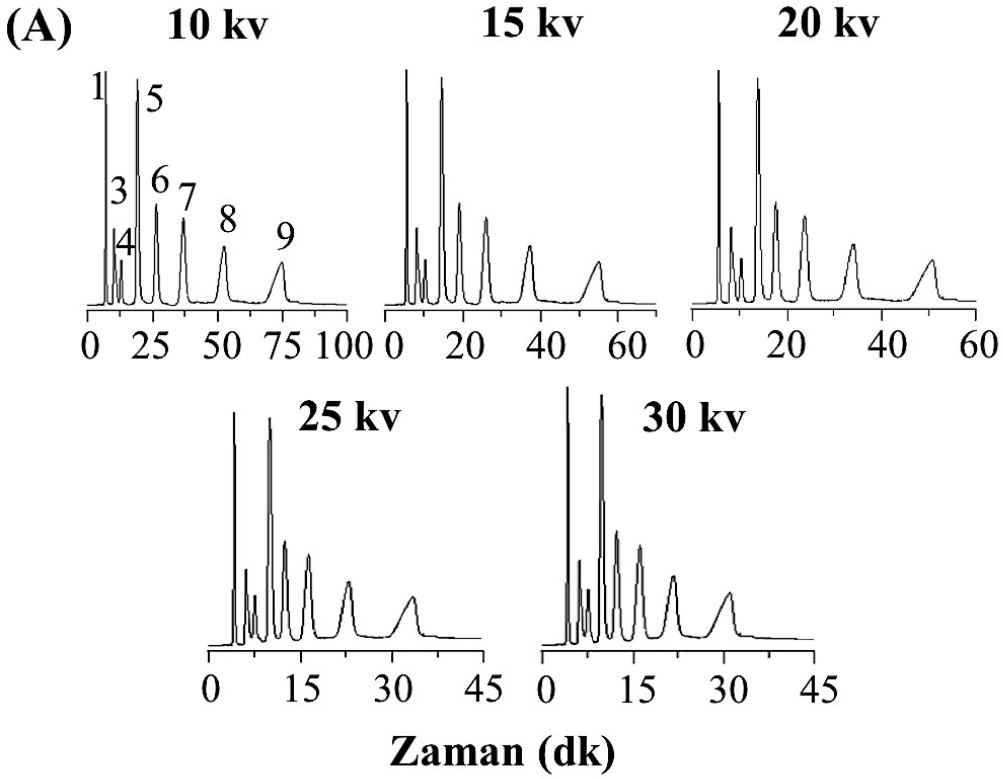


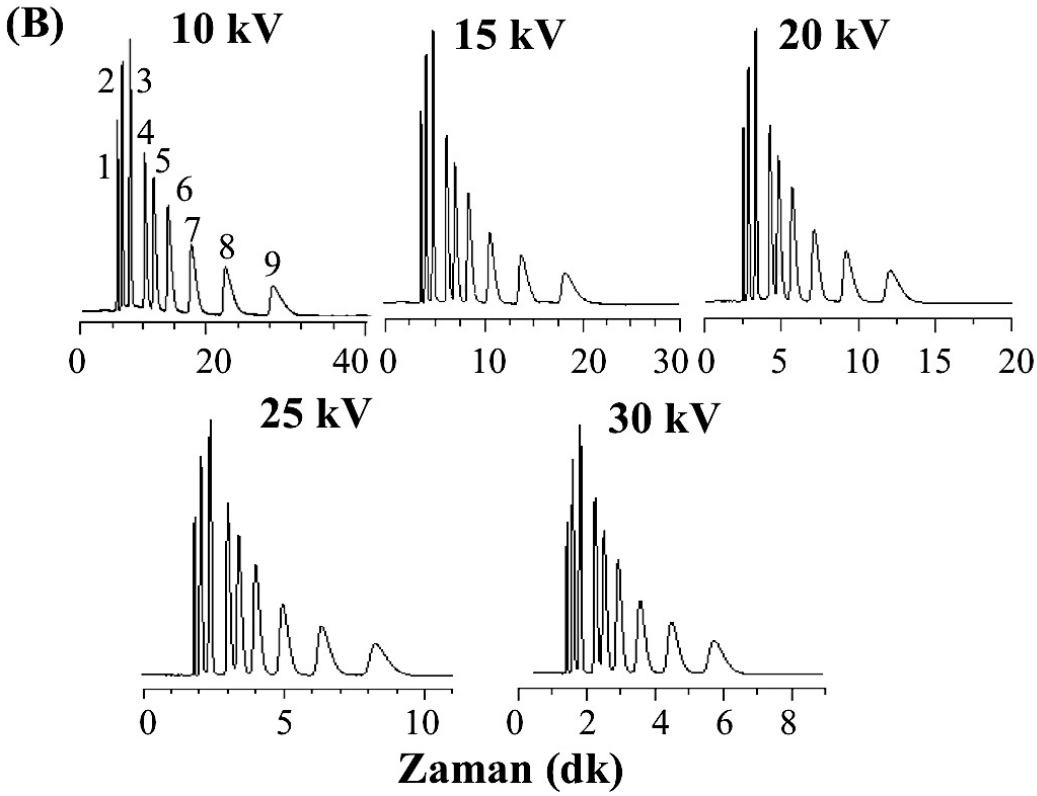
Şekil 4.25. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenollerin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör: 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

4.3.3. Sürücü Gücün Etkisi

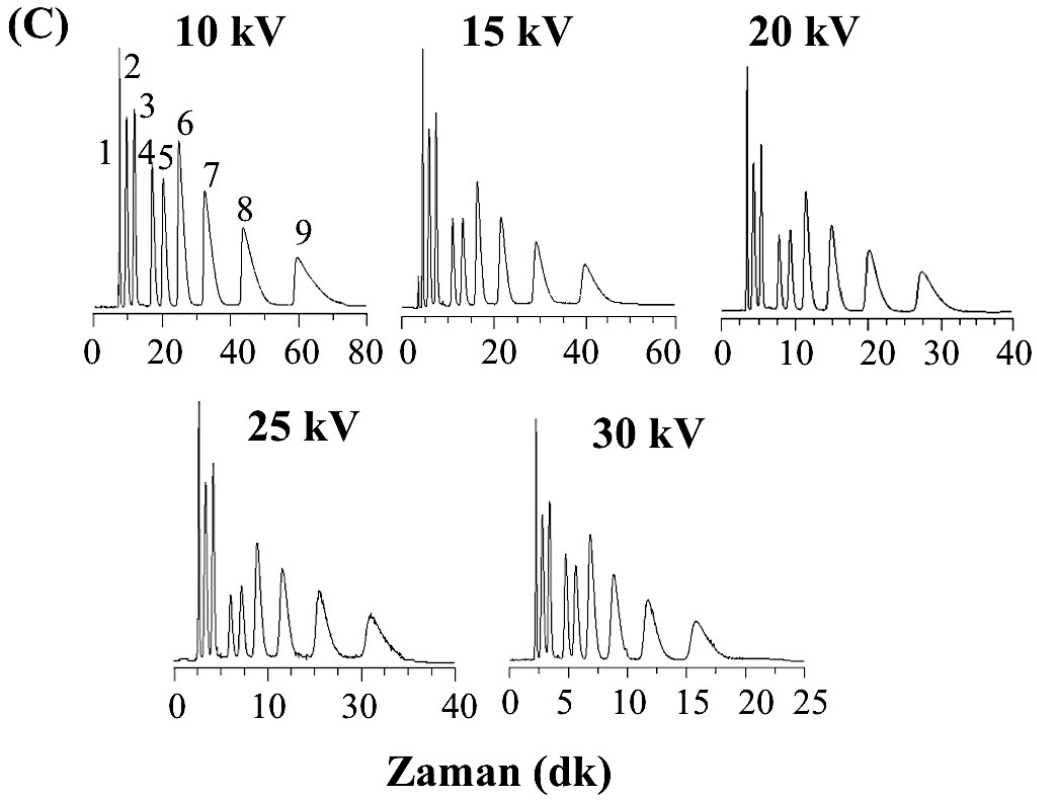
Sülfonik asit bağlı monolitik kolonlara farklı ACN/fosfat tamponu oranlarına sahip mobil fazların uygulanması sonucu, en uygun mobil faz bileşimi belirlenmiştir. Belirlenen mobil faz bileşimleri sabit tutularak CEC sisteminde bütün kolonlara 10-30 kV arasında voltaj uygulanmış ve kromatografik ayrım üzerine sürücü gücün etkisi incelenmiştir. Bu deneylerde alkilbenzen ve fenol türevleri analit olarak kullanılmıştır. Sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.26.'da gösterilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.19., Çizelge 4.20. ve Çizelge 4.21.'de verilmiştir.

Şekil 4.26.'daki kromatogramlardan görüldüğü gibi sülfonik asit ile türevlendirilen ve farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitik kolonlara uygulanan tüm voltaj değerlerinde alkilbenzenlerin kromatografik ayrımının yapılabildiği gözlenmektedir. Uygulanan voltaj artışı ile analiz süresi kısalmış ve çözünürlük değerlerinde düşme meydana gelmiştir. Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında; EDMA ile sentezlenen monolitik kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Özellikle sürücü gücün 20 kV olduğu durumda elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında bu durum net görülmektedir.


(A)
10 kv
15 kv
20 kv
1
5
3
6
7
8
9
4
0 25 50 75 100
0 20 40 60
0 20 40 60
25 kv
30 kv
0 15 30 45
0 15 30 45
Zaman (dk)


(B)
10 kV
15 kV
20 kV
2
3
4
1
5
6
7
8
9
0 20 40
0 10 20 30
0 5 10 15 20
25 kV
30 kV
0 5 10
0 2 4 6 8
Zaman (dk)

Şekil 4.26. devam ediyor.



Şekil 4.26. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonları kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen.

Çizelge 4.19. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü						
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**
10	4.23	4.12	4.61	2.12	3.14	3.03	2.63
15	3.59	3.33	4.17	1.79	2.09	2.11	2.21
20	3.01	3.21	3.96	1.80	2.13	1.87	1.78
25	2.34	2.56	3.73	1.54	1.72	1.91	1.82
30	1.94	2.10	3.64	1.52	1.60	1.72	1.63

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 50/50 ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen.

Çizelge 4.20. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü							
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**	**R(9/8)**
10	4.43	4.37	4.84	2.45	3.28	3.24	2.92	2.67
15	3.91	3.53	4.44	1.92	2.25	2.52	2.30	2.20
20	3.14	3.40	4.18	1.84	2.36	2.34	2.26	2.10
25	2.63	2.78	4.05	1.80	1.98	2.16	2.06	1.95
30	2.11	2.44	3.95	1.63	1.88	1.95	1.91	1.75

a: Çizelge 4.19. ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir.

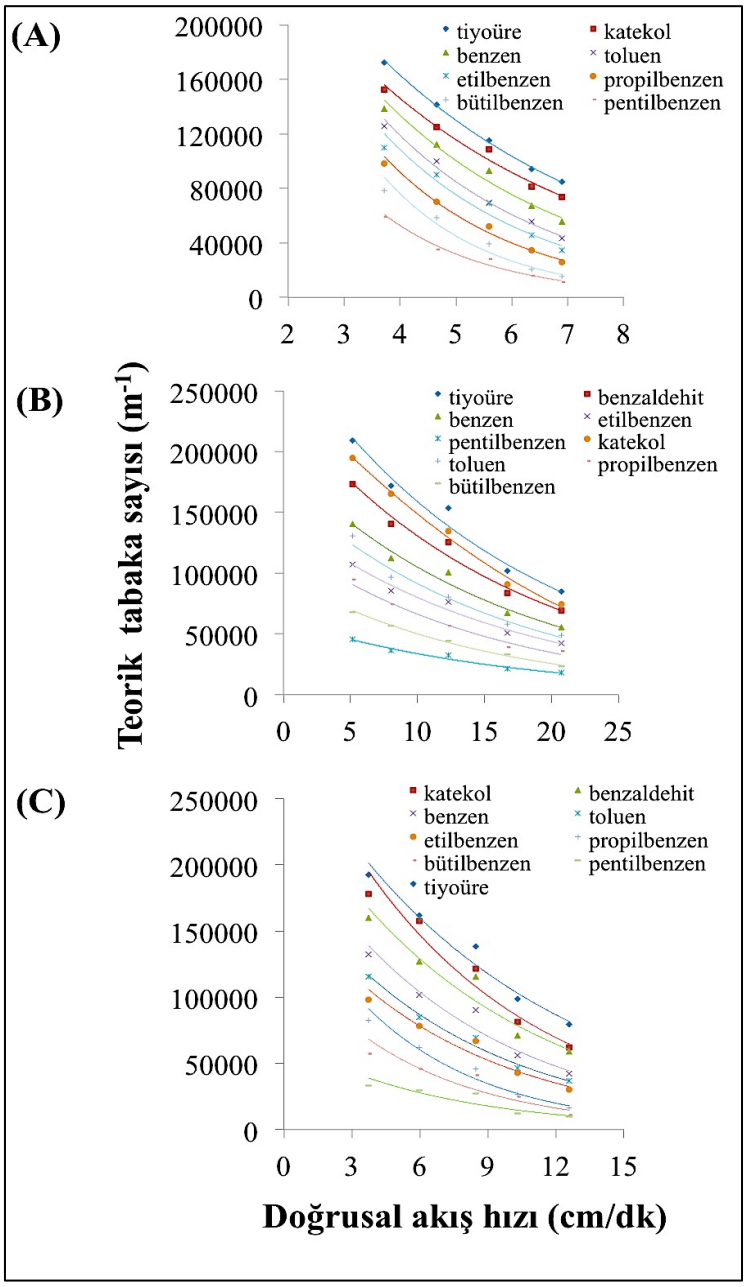
Çizelge 4.21. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü							
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**	**R(9/8)**
10	4.34	4.27	4.74	2.32	3.25	3.18	2.88	2.54
15	3.83	3.41	4.30	1.85	2.16	2.27	2.28	2.13
20	3.11	3.34	4.10	1.78	2.25	2.15	1.98	2.00
25	2.55	2.64	3.97	1.75	1.89	2.04	1.92	1.85
30	2.03	2.23	3.81	1.68	1.78	1.93	1.86	1.71

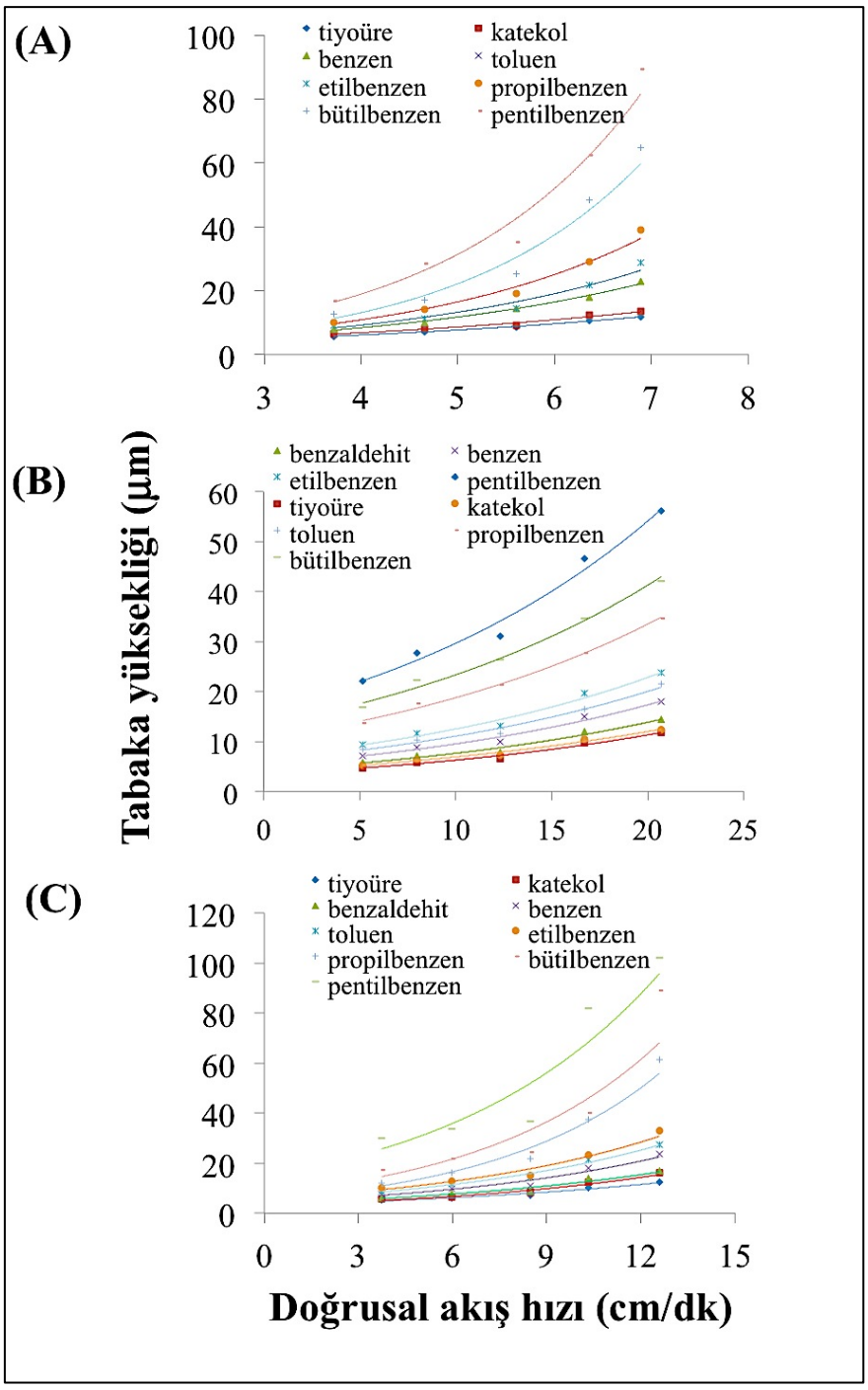
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 30/70 ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) bütilbenzen, (9) pentilbenzen.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.27.'de ve Şekil 4.28.'da verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında doğrusal akış hızı arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Şekil 4.29.'daki grafiklerde farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenmiş ve sülfonik asit ile türevlendirilmiş kolonların teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi kıyaslamalı olarak verilmiştir. Kolonların ayırma verimi davranışı, analit olarak tiyoüre kullanılarak incelenmiştir. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen monolitik kolonlarla elde edilen ayırma verimleri, literatürdeki monolitler ile gözlenen ayırma verimleri ile yarışabilir niteliktedir [69, 142,166,167]. Grafiklerden görüldüğü gibi, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği 210.000 m^{-1} ve 4.8 µm olarak bulunmuştur. Bu değerler sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kolonda 192.000 m^{-1} ve 5.2 µm iken sülfonik asit bağlı

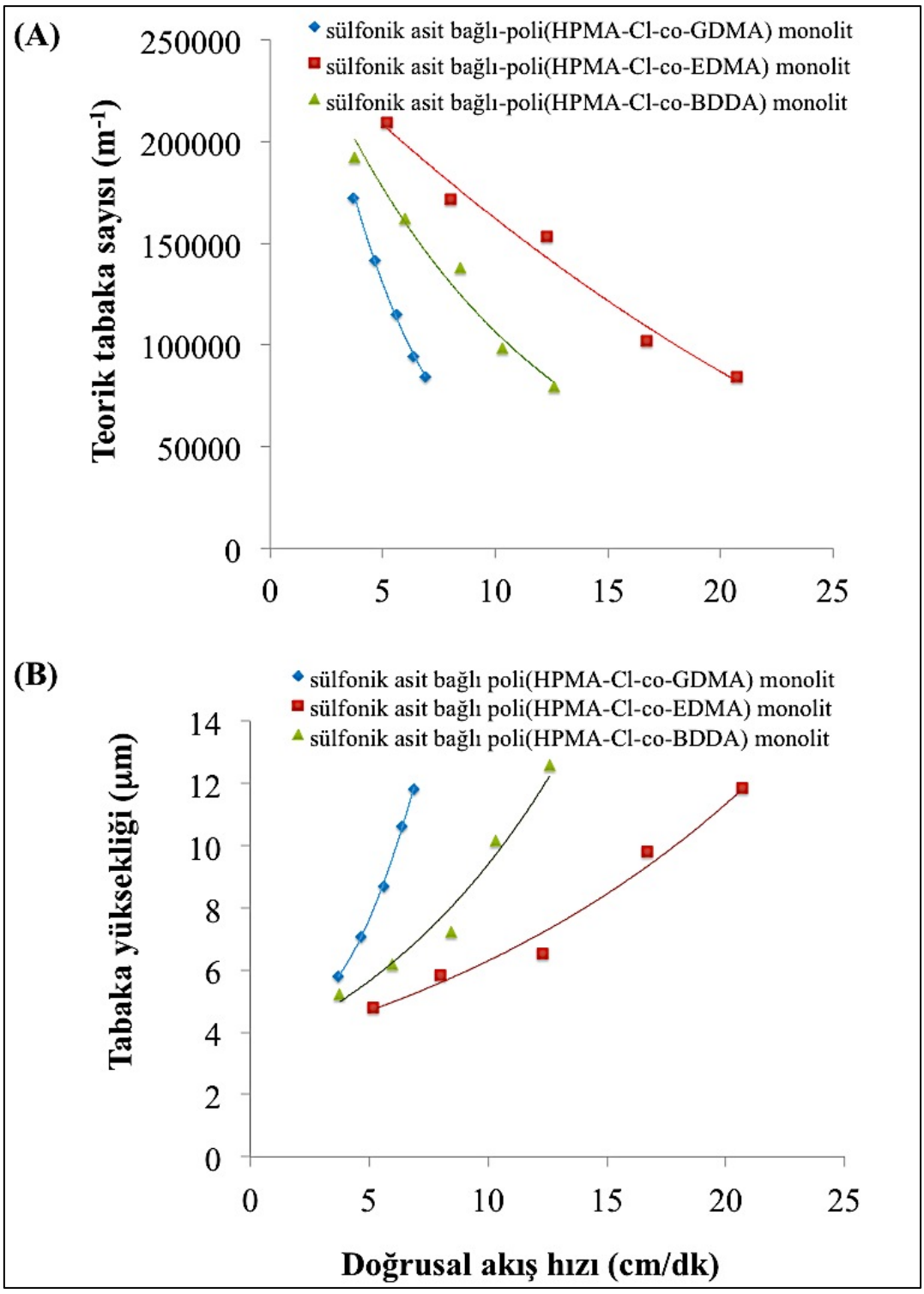
poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kolonda 172.000 m^{-1} ve 5.8 µm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre EDMA çapraz bağlayıcısı kullanılarak elde edilen monolitik kolonun, diğer çapraz bağlayıcılara kıyasla alkilbenzen türevleri için daha iyi kromatografik ayırma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.27. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkilbenzen karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.

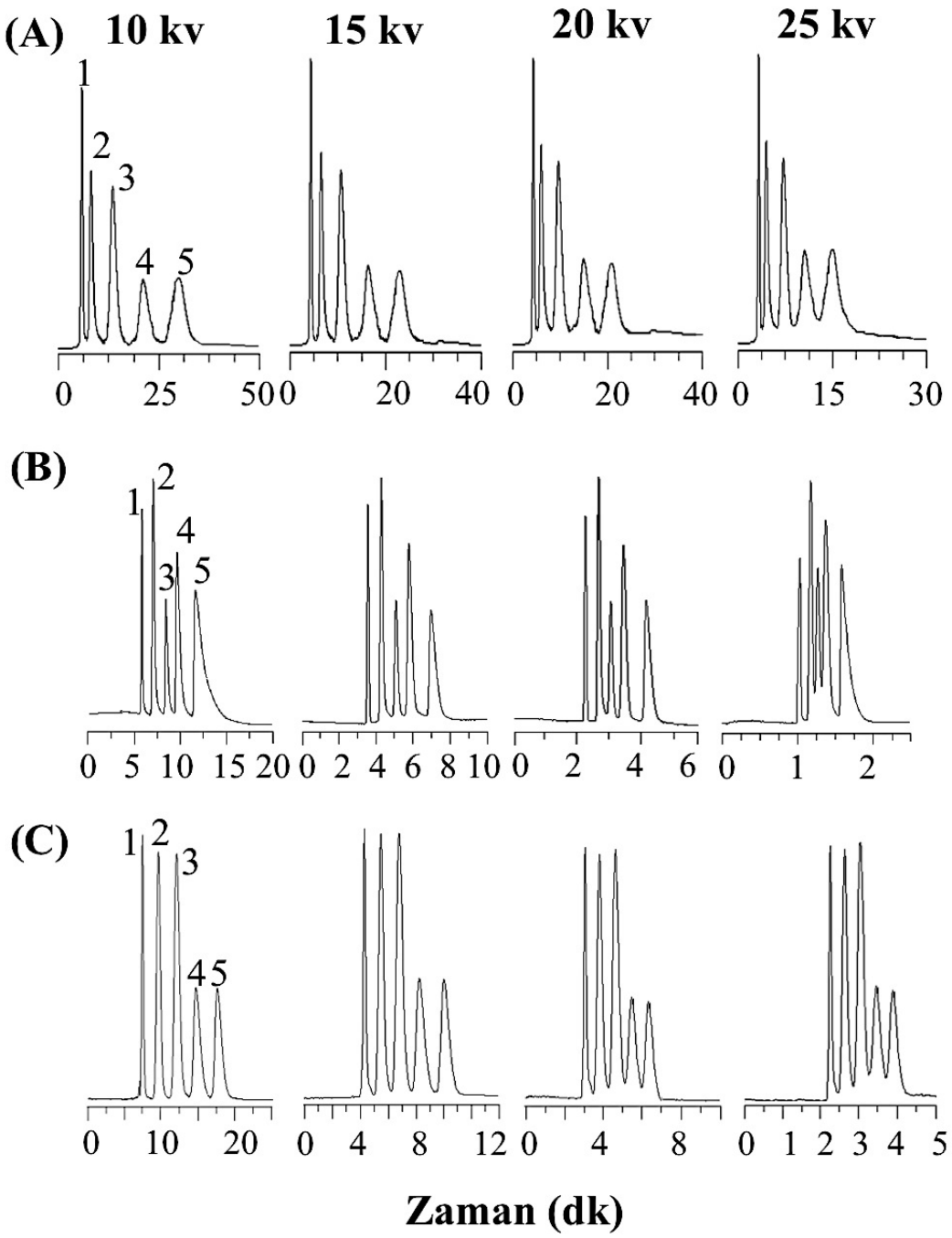


Şekil 4.28. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak alkilbenzen karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 50/50, (B) 50/50, (C) 30/70, Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap.



Şekil 4.29. Farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen sülfonik asit bağlı HPMA-Cl bazlı monolitlerde (A) teorik tabaka sayısının (B) tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. Analit: tiyoüre.

Sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-BDDA) ve poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonları kullanılarak 10-25 kV değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.30.'da sunulmaktadır. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.22., Çizelge 4.23. ve Çizelge 4.24.'de verilmiştir. Şekil 4.30.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi sülfonik asit ile türevlendirilen ve farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen monolitik kolonlar ile tüm voltaj değerlerinde kromatografik ayrımının yapılabildiği gözlenmektedir. EDMA ile sentezlenen monolitik kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile uygulanan voltaj 20 kV iken fenol türevlerinin ayrımı 5 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirmiştir. Sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile 10 kV voltaj değerinde tam bir kromatografik ayrım gerçekleştirilmiş olup sentezlenen diğer kolonlara kıyasla en yüksek çözünürlük değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.30. . Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. Mobil faz: (A) 35/65 (B) 30/70 (C) 20/80 ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.22. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü			
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
10	2.35	2.24	1.92	2.12
15	2.17	2.02	1.81	1.95
20	1.92	1.85	1.74	1.62
25	1.68	1.51	1.35	1.21

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 35/65 ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mmx 100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.23. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

	Pik çözünürlüğü			
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
10	4.57	3.10	2.30	1.91
15	3.24	2.68	2.20	1.82
20	3.84	2.62	1.95	2.41
25	1.37	0.92	0.78	0.64

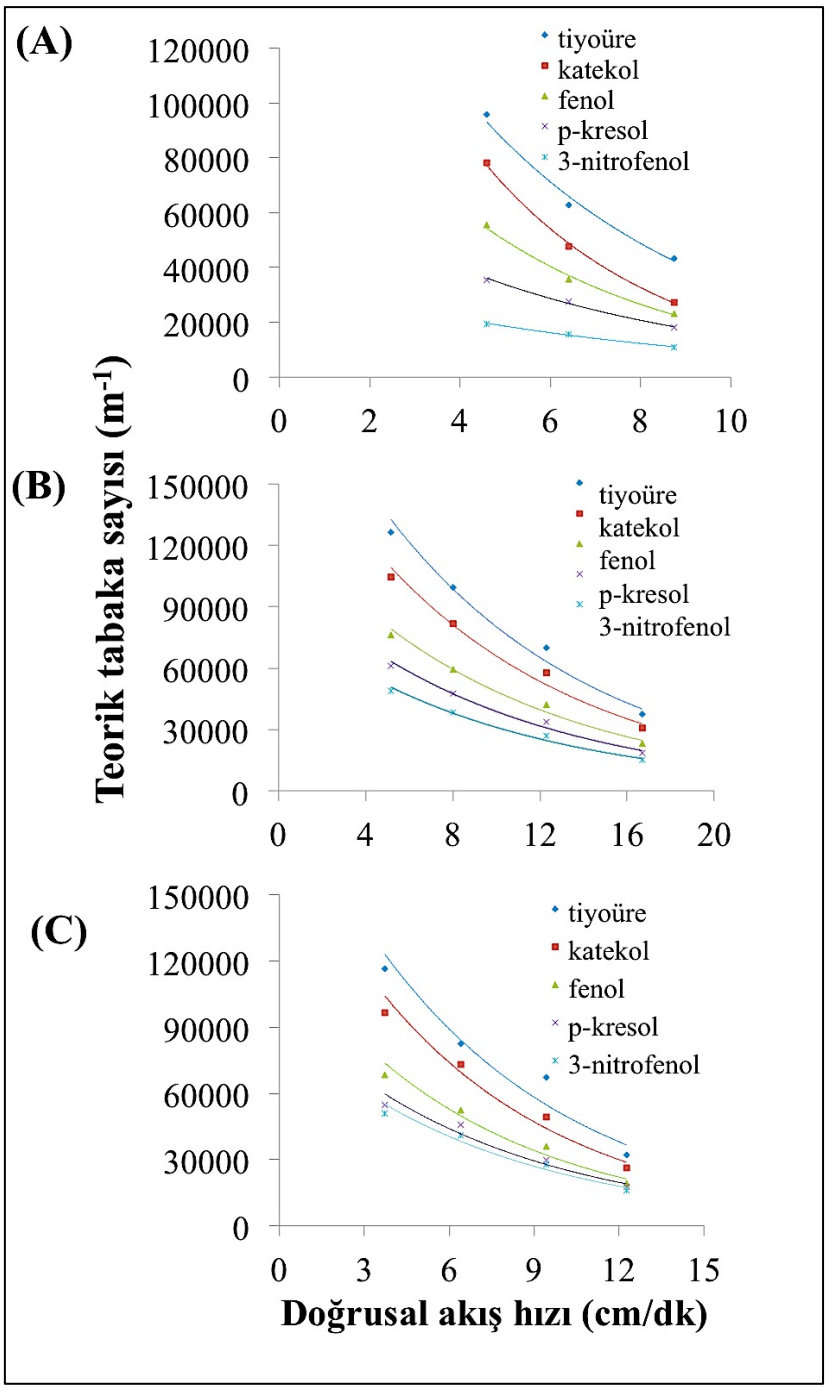
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 30/70 ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.24. Sülfonik asit bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonu kullanılarak, fenollerin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

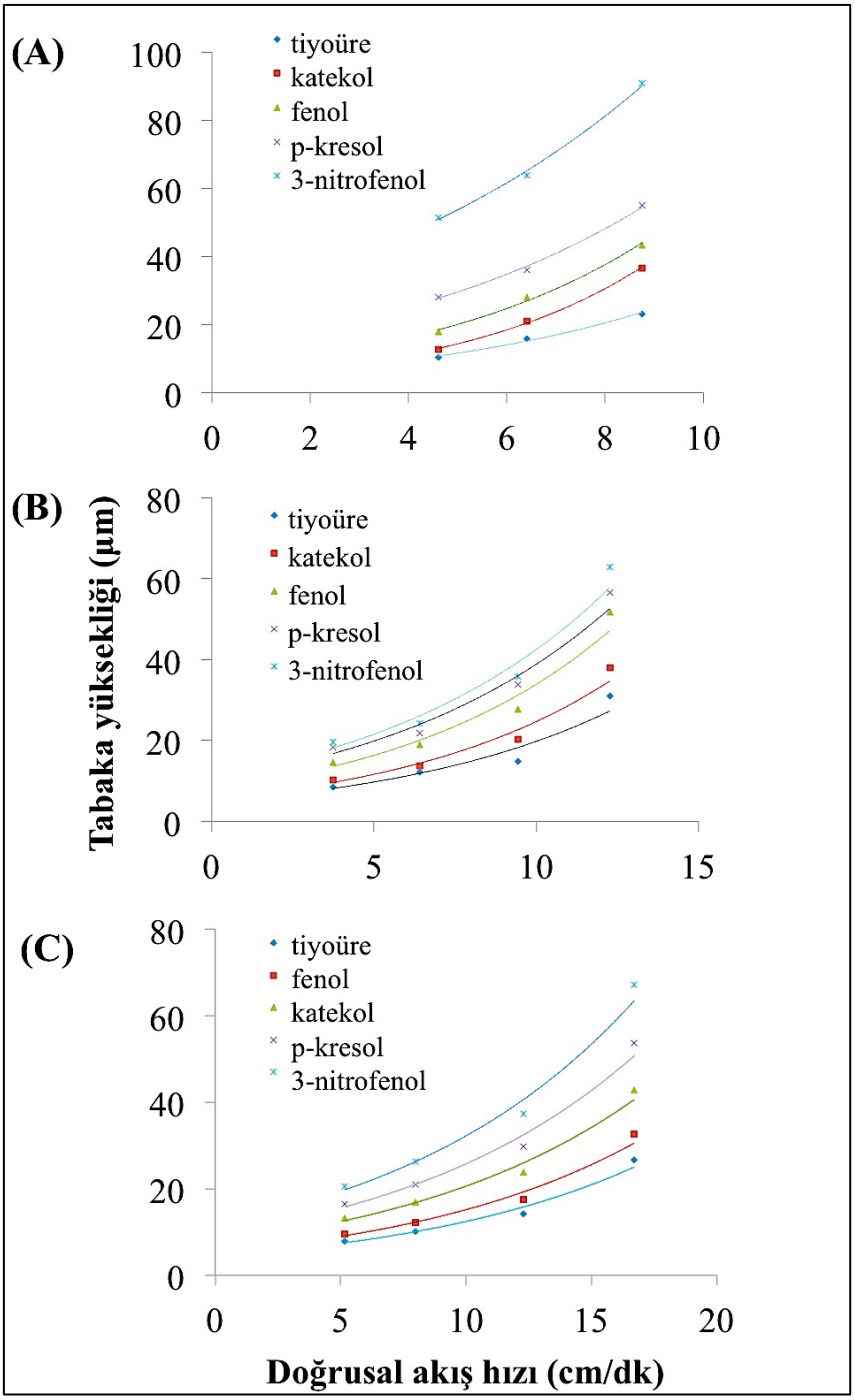
	Pik çözünürlüğü			
Voltaj (kV)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
10	2.48	2.36	2.03	2.28
15	2.25	2.12	1.93	2.17
20	2.05	1.90	1.85	1.73
25	1.76	1.61	1.42	1.35

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 20/80 ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.31. ve 4.32.'de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi fenollerin kromatografik ayrımında doğrusal akış hızı arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Sentezlenen monolitik kolonlarla elde edilen fenol türevlerinin ayırma verimleri, literatürdeki benzer polimerik monolitler ile elde edilen ayırma verimleri ile kıyaslanabilir büyüklüktedir [147,166,167]. Grafiklerden görüldüğü gibi sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği sırasıyla 127.000 m^{-1} ve 7.9 µm olarak bulunmuştur. Bu değerler sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-BDDA) kolonda 117.000 m^{-1} ve 8.6 µm, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-GDMA) kolonda 96.000 m^{-1} ve 10.5 µm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 35/65, (B) 30/70, (C) 20/80, Uygulanan voltaj: değişken, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.



Şekil 4.32. Sülfonik asit bağlı (A) poli(HPMA-Cl-co-GDMA), (B) poli(HPMA-Cl-co-EDMA), (C) poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/10 mM pH 7 fosfat tamponu: (A) 35/65 (B) 30/70 (C) 20/80, Uygulanan voltaj: değişken, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

4.3.4. Anyonik Polimer Bazlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının Literatür Çalışmaları ile Kıyaslanması

Farklı araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı monomerler kullanılarak elde edilen anyonik özelliğe sahip monolitik kolonlar ile ulaşılan teorik tabaka sayıları Çizelge 4.25.'de verilmiştir. Bu karşılaştırma ayırma verimi yönünden önerilen monomer ile sentezlenen anyonik kolonların mevcut olan monolitler ile yarışabilir nitelikte olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.25. Anyonik polimer bazlı monolitlerin kromatografik performanslarının literatür çalışmaları ile kıyaslanması

Kolon	Analit	Tabaka sayısı (m^{-1})	Referans
Poli(TFEM-co-EDMA)	Benzen	172300	[142]
(200 mm x100 µm iç çap)	Katekol	92800	[142]
Poli(ODA-co-PETA)	Benzen	210500	[165]
(200 mm x100 µm iç çap)			
Poli(NAPM-co-PDA)	Benzen	19500	[19]
(200 mm x100 µm iç çap)	Anilin	147500	[19]
Poli(ODA-co-TRIM)	Benzen	183000	[166]
(200 mm x100 µm iç çap)	Katekol	59500	[166]
Poli(DMAEMA-co-HEMA-co-EDMA)	Fenol	177000	[167]
(250 mm x100 µm iç çap)			
Poli(BMA-co-EDMA)	Benzen	168500	[69]
(250 mm x100 µm iç çap)	Katekol	125600	[69]

Sülfonik asit bağlı	Benzen	112400	Bu çalışma
poli(HPMA-Cl-co-GDMA)	Katekol	125400	Bu çalışma
(300 mm x100 μm iç çap)			
Sülfonik asit bağlı	Katekol	195124	Bu çalışma
poli(HPMA-Cl-co-EDMA)	Benzen	172000	Bu çalışma
(300 mm x100 μm iç çap)			
Sülfonik asit bağlı	Benzen	140000	Bu çalışma
poli(HPMA-Cl-co-BDDA)	Katekol	105300	Bu çalışma
(300 mm x100 μm iç çap)			

TFEM: 2,2,2-trifloroetil metakrilat, EDMA: etilen dimetakrilat, ODA: oktadesil akrilat, PETA: pentaeritrol triakrilat, NAPM: 2-naftil metakrilat, PDA: 1,4-fenilen diakrilat, TRIM: trimetilolpropantrimetakrilat, DMAEMA: 2-(N,N-dimetilamino)etil metakrilat, HEMA: 2-hidroksietil metakrilat, BMA: bütilmetakrilat, HPMA-Cl: 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat, GDMA: Gliserol dimetakrilat, BDDA: 1,4-bütandiol dimetakrilat.

4.3.5. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları

Kromatografik çalışmaların son bölümünde, monolitik kolonların kararlılığını test etmek amacıyla analizden analize ve kolondan kolona tekrarlanabilirlik testleri yapılmıştır. Bu amaçla alkilbenzen türevleri günde dört kez kolona enjekte edilmiş ve analitlerin alıkonma süreleri kaydedilmiştir. Ayrıca aynı sentez koşullarında 3 farklı kolon hazırlanmış ve bu kolonlar ile aynı elektrokromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sülfonik asit ile modifiye edilmiş HPMA-Cl bazlı monolitik kolonlar ile alkilbenzen türevlerinin ayrımında analizden analize ve kolondan kolona hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS) Çizelge 4.26.'da verilmiştir. Buradan görüldüğü üzere alıkonma süresi temel

alınarak hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS); analizden analize % 0.72-0.96, kolondan kolona ise % 0.95-2.10 aralığında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kolon verimliliğinin ve yeniden hazırlanabilirliğinin iyi olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar sentezlenen kolonların başarılı bir şekilde kapiler elektrokromatografi sisteminde kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.26. Farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak sentezlenen monolitik kolonların analizden analize ve kolondan kolona elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri

Bileşen	**Analizden analize tekrarlanabilirlik BSS (%)**	**Kolondan kolona tekrarlanabilirlik BSS (%)**
Kullanılan çapraz bağlayıcı: GDMA		
Tiyoüre	0.72	1.46
Benzaldehit	0.86	1.16
Benzen	0.67	1.28
Toluen	1.04	1.56
Etilbenzen	0.93	1.41
Propilbenzen	1.10	1.53
Bütilbenzen	0.98	2.10
Pentilbenzen	0.96	1.32
Kullanılan çapraz bağlayıcı: EDMA		
Tiyoüre	0.56	0.95
Katekol	0.65	0.97
Benzaldehit	0.82	1.06
Benzen	0.77	1.12
Toluen	0.69	1.20
Etilbenzen	0.80	1.15
Propilbenzen	0.75	1.18
Bütilbenzen	0.71	1.22
Pentilbenzen	0.90	1.24

Kullanılan çapraz bağlayıcı: BDDA

Tiyoüre	0.66	1.12
Katekol	0.71	1.21
Benzaldehit	0.75	1.30
Benzen	0.88	1.14
Toluen	0.92	1.21
Etilbenzen	0.82	1.35
Propilbenzen	0.77	1.26
Bütilbenzen	0.83	1.17
Pentilbenzen	0.93	1.27

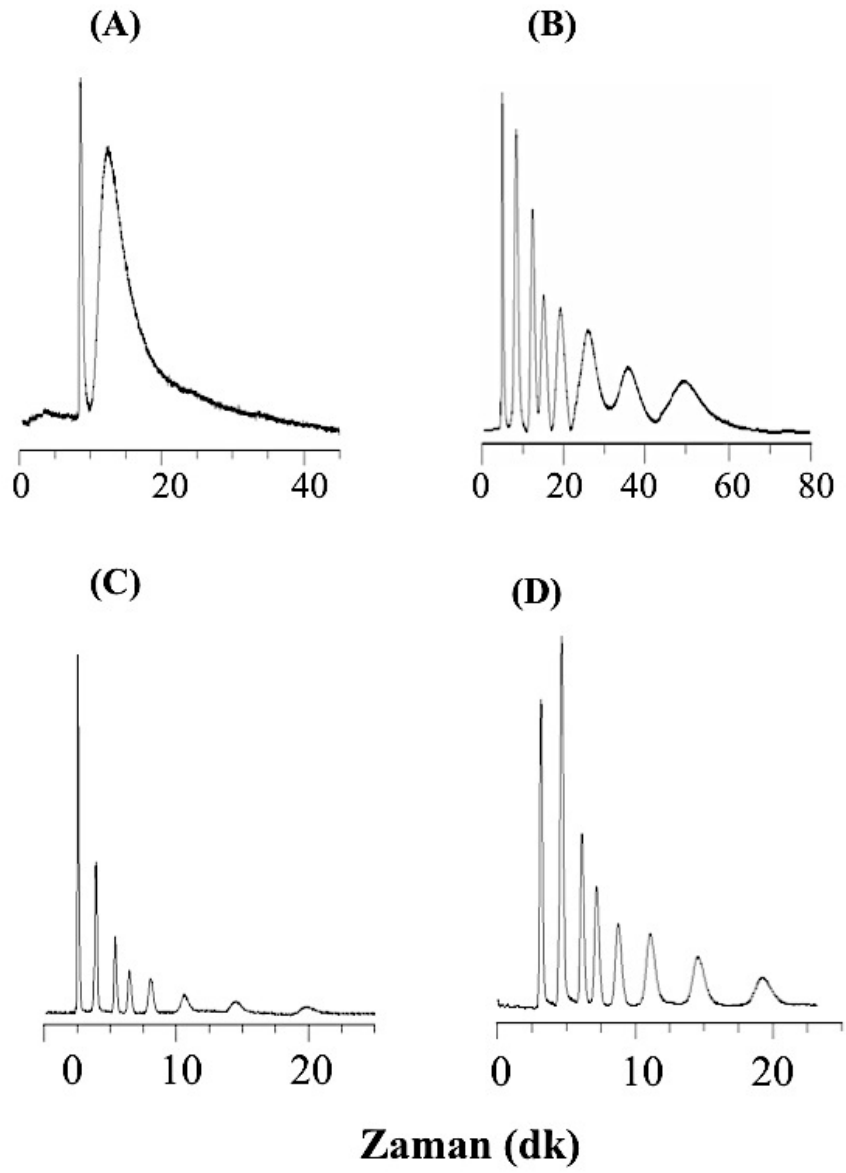
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu (% v/v): 50/50 (GDMA), 50/50 (EDMA), 30/70 (BDDA), Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm.

4.4. PEI Bağlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının İncelenmesi

4.4.1. Sabit Faz Üzerindeki Fonksiyonel Grup Derişiminin Etkisi

Tez çalışmasının ikinci kısmında sentezlenen monolitik kolonların yüzeyine ‘‘kloropropil’’ grubu üzerinden PEI bağlanarak yüzeydeki yük yoğunluğunun kontrolü sağlanmıştır. Öncelikle elektroozmotik akış hızını ve elektrokromatografik performansı etkileyen monomer oranını belirleyebilmek için poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin sentezinde, HPMA-Cl monomer oranı hacimce % 10-60 aralığında değiştirilmiş ve monolitler üzerine katyonik ligand PEI kovalent olarak bağlanmıştır. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen ve PEI bağlanan monolitler elektroozmotik akış koşullarında, kromatografik ayrım ortamı olarak test edilmiş ve kromatografik testlerde alkilbenzen analit karışımı kullanılmıştır. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenerek PEI bağlanan kapiler monolitler ile elektrosmotik akış koşullarında elde edilen ve alkilbenzenlerin ayrımını gösteren elektrokromatogramlar Şekil 4.33’de verilmektedir.

Buradan görüldüğü üzere, % 30 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen ve PEI ile türevlendirilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonu ile başarılı bir kromatografik ayırma elde edilememiştir. Bu durum, yüzeyde yeterli yük oluşmaması ve kolon boyunca alkilbenzen türevlerinin ayrımını sağlayacak gerekli elektroozmotik akışın meydana gelmemesinden kaynaklanmaktadır. Analit ile sabit faz arasındaki etkileşim yetersiz olduğu için ayrım gerçekleştirilememiştir. Monomer derişimi % 40'a çıkarıldığında kromatografik performansta artış gözlenmiştir. Ancak bu ayrım literatürdeki monolitik kolonlar ile yarışabilir nitelikte değildir [159,168,169]. Bu durum, monomer derişiminin artması ile daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğinin bir işareti olmuştur. HPMA-Cl derişimi % 50 ve % 60'a çıkarıldığında yüksek çözünürlük ile alkilbenzen türevlerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kolonlar arasından hacimce % 50 ve % 60 monomer oranı ile elde edilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler sabit faz sentezi için ilk çıkış materyali olarak seçilmiştir. PEI ile türevlendirilen monolitlerin kromatografik performansları bundan sonraki bölümlerde değerlendirilmiştir.

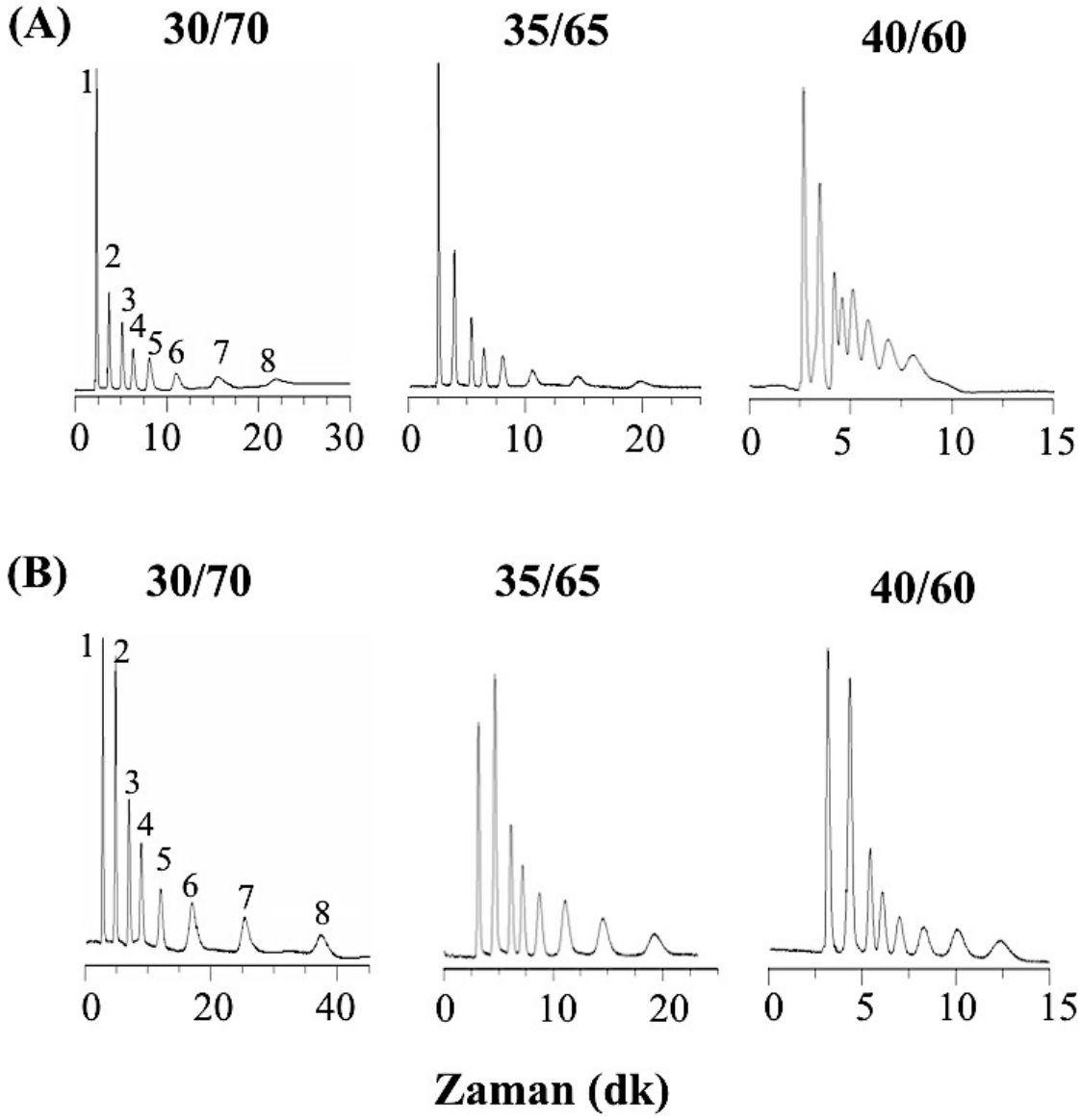


Şekil 4.33. Farklı HPMA-Cl derişimleri (% hacim): (A) 30, (B) 40, (C) 50, (D) 60 ile sentezlenen ve PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, Uygulanan voltaj: -20 kV, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (5) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.

4.4.2. Mobil Faz Polaritesinin (ACN derişimi) Etkisi

Bu bölümde, mobil faz polaritesinin elektrokromatografik ayırma performansına etkisi değerlendirilmiştir. Sentezlenen PEI bağlı monolitik kolonlar ile yapılan kromatografik çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada öncelikle alkilbenzenlerin, fenollerin, çoklu halkasal aromatik hidrokarbonların (PAH), nükleosidlerin ve nükleotid ve nükleosid karışımının ayrımı için uygun ACN/fosfat tamponu oranının belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonrasında belirlenen en uygun mobil faz oranı ile farklı voltaj değerlerinde kromatogramlar alınmış ve elde edilen kromagramlar ile kromatografik parametrelerin tayini yapılarak kolon performansları incelenmiştir.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı ACN/tampon oranları kullanılarak elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.34'de verilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.28.'de görülmektedir. Şekil 4.34.'deki elektrokromatogramlardan görüldüğü gibi farklı monomer derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla yeterli kromatografik ayrım elde edilmiştir. Analiz düşük pH (pH 2.5) değerinde yapılarak, PEI'nın yapısındaki amin gruplarının protonasyonu sağlanmaktadır. Mobil fazdaki ACN derişiminin artmasıyla mobil faz polaritesi azalmış ve analitlerin kolonda alıkonma süreleri kısalmıştır. Buna bağlı olarak toplam analiz süresi kısalmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir [168,169].



Şekil 4.34. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/5mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.

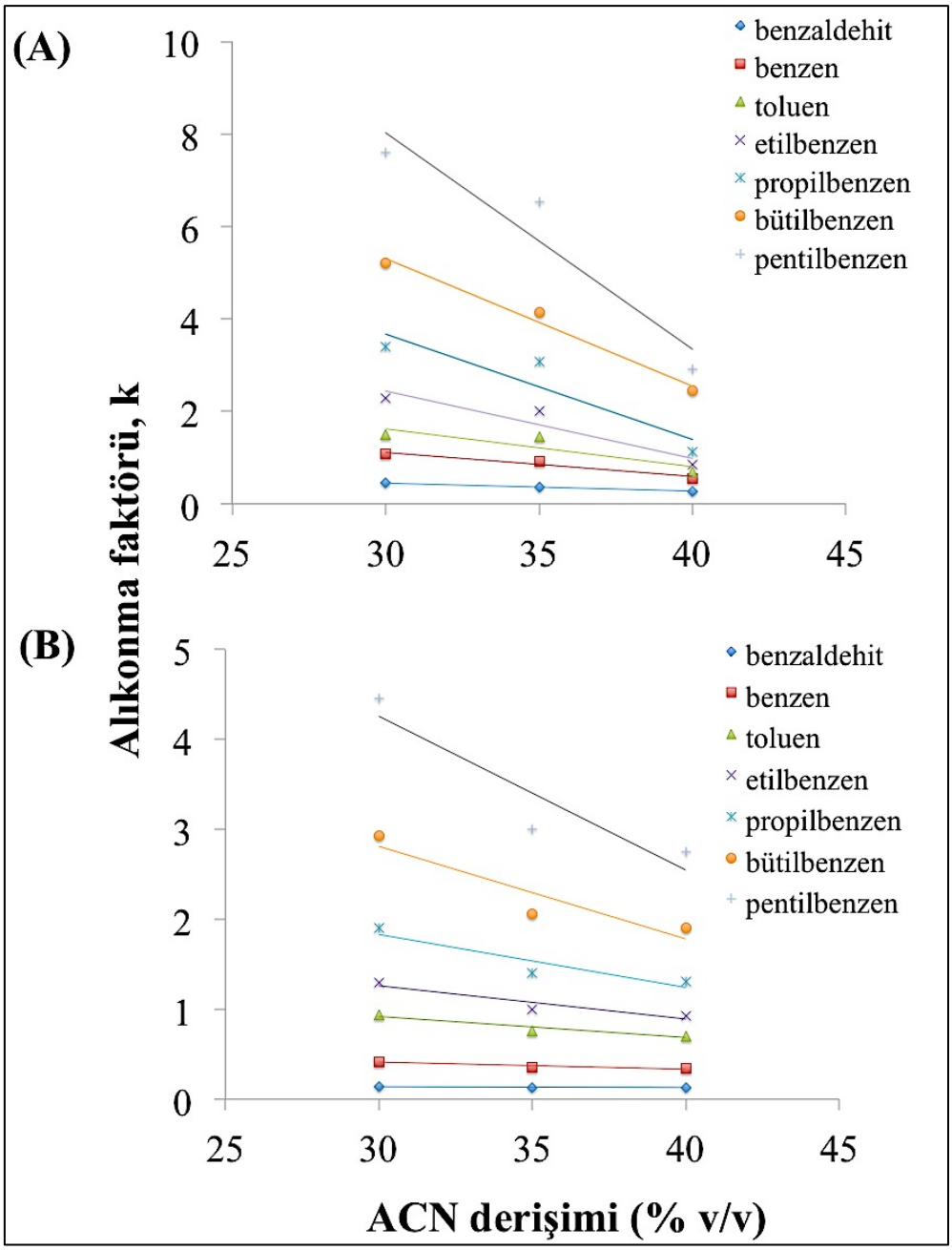
Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında, analiz süresinde önemli bir farklılık olmamasına karşın % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen monolitik kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edilmiştir. Özellikle 35/65 ACN/5 mM tampon oranı ile elde edilen kromatogramlar dikkate alındığında bu fark net olarak görülmektedir. İyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin sağlanması gerekmektedir. Çizelge 4.27.'de elde edilen çözünürlük değerlerine bakıldığında farklı ACN/5 mM tampon oranlarının çoğunda bu değerin sağlandığı görülmektedir. % 50 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile 40/60 ACN/5 mM tampon oranı kullanılarak daha kısa sürede ayrım elde edilmesine karşın elde edilen çözünürlük değerlerinin yeterince yüksek olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla analiz süresi ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında % 50 ve % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için alkilbenzen türevlerinin ayrımını sağlayan en uygun değer 35/65 ACN/5 mM tampon olarak belirlenmiştir. Kolonların en uygun ACN/5 mM tampon oranında çözünürlük değerleri karşılaştırıldığında % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile elde edilen çözünürlük değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişim grafikleri Şekil 4.35.'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi alıkonma faktörü ACN derişimi ile doğrusal olarak azalmaktadır. Bu davranış ters faz mekanizması ile kromatografik ayrım yapıldığının bir göstergesidir [168]. Ayrıca mobil fazdaki ACN derişimi arttıkça analitlerin kolondaki alıkonma süresi azalmaktadır. Analitlerin birbirlerine çok yakın sürelerde kolonu terketmeleri yani pik çözünürlüklerinin azalması, artan ACN derişimi ile elektrokromatografik ayrımın güçleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.27. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzen türevlerinin kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

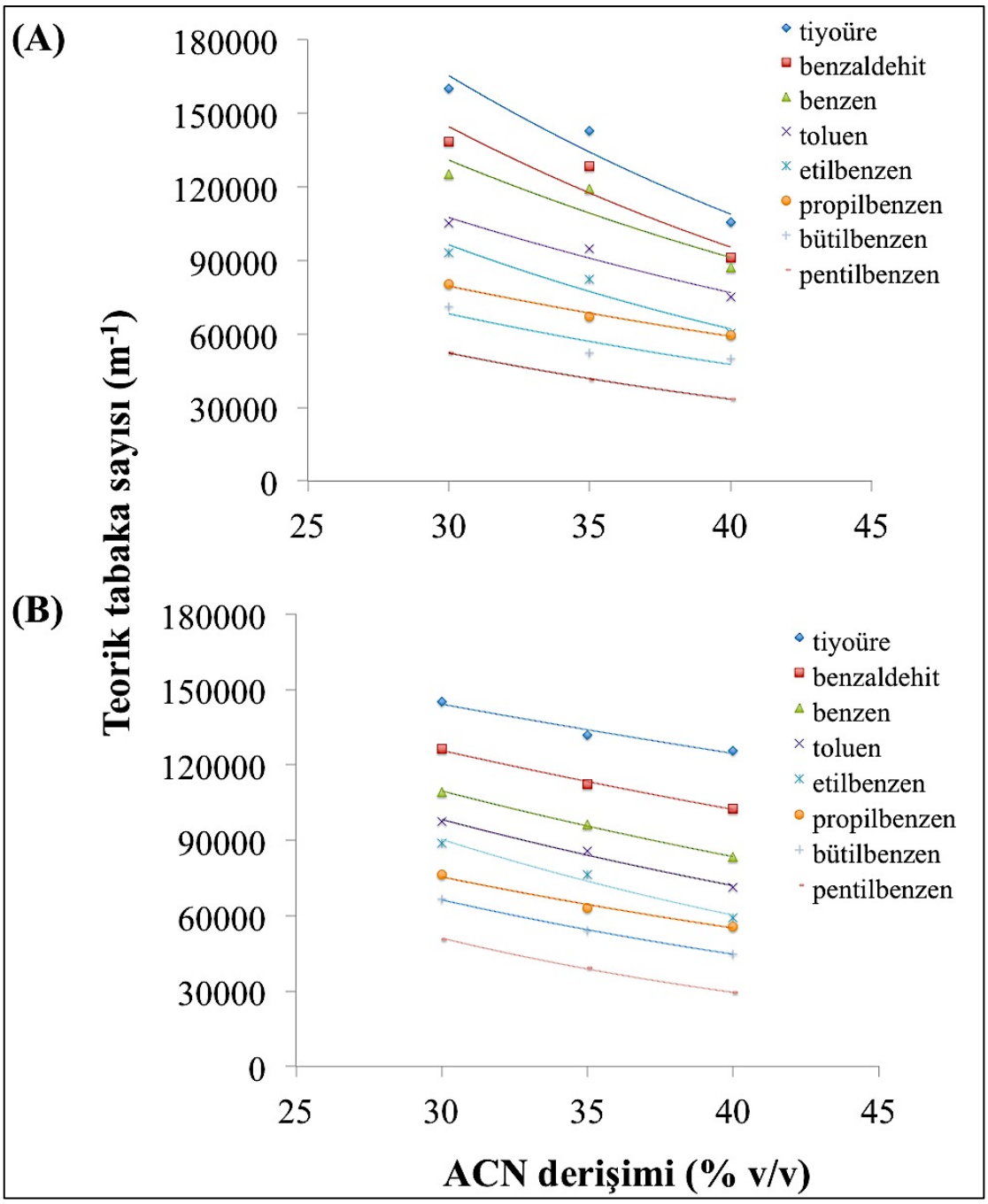
		Pik çözünürlüğü						
HPMA-Cl (% v/v)	**ACN/Tampon (mL/mL)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**
50	30/70	3.69	4.27	2.38	2.65	3.29	2.94	2.32
50	35/65	3.41	4.06	2.20	2.08	2.85	2.64	2.28
50	40/60	1.32	1.74	0.71	0.64	0.73	0.65	0.68
60	30/70	3.54	4.10	2.15	2.44	3.10	2.64	2.21
60	35/65	3.23	3.82	2.00	1.83	2.51	2.23	2.06
60	40/60	2.11	2.04	1.57	1.73	1.62	1.53	1.47

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 2.5 tampon, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.

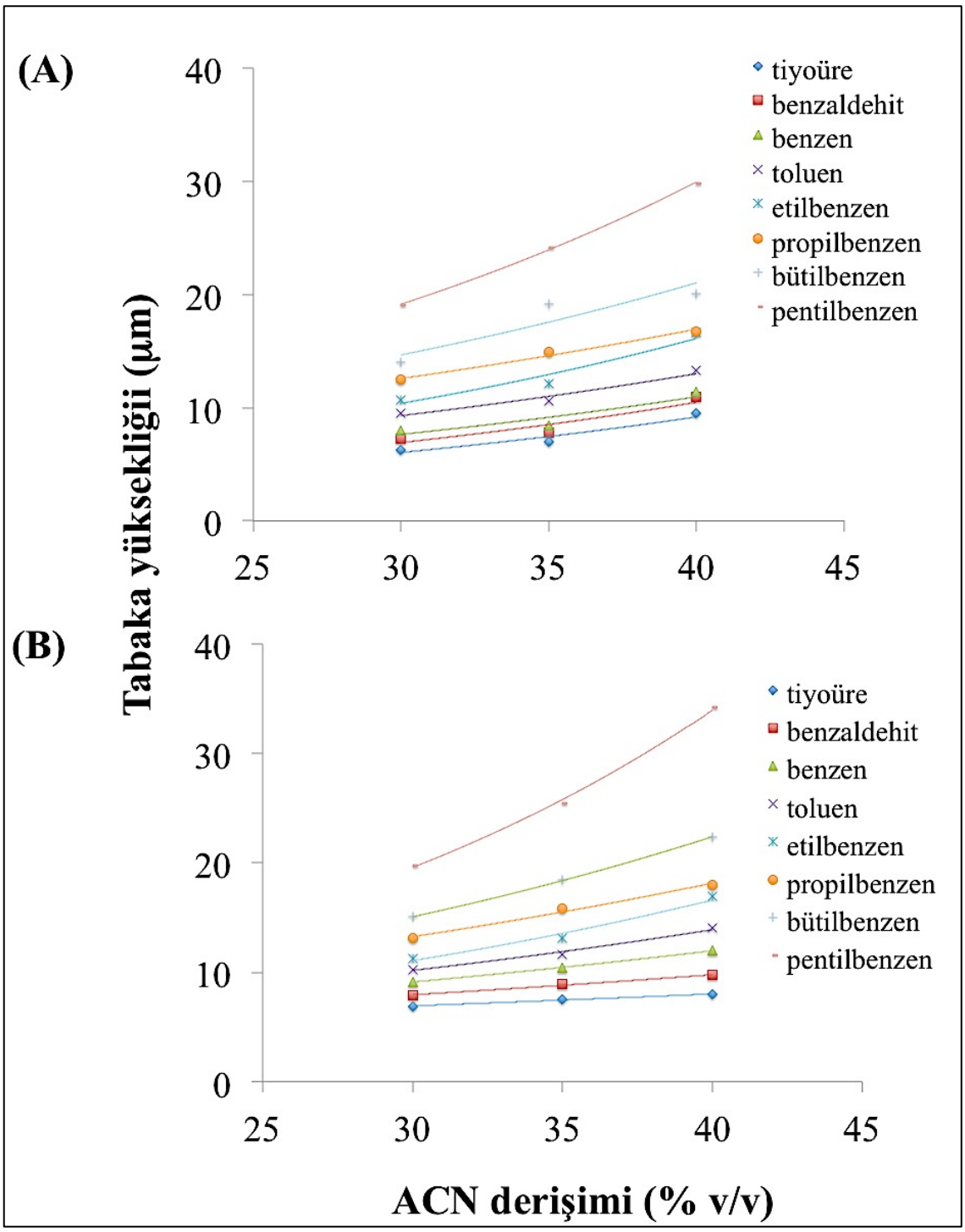


Şekil 4.35. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Kolon veriminin iki farklı ölçüsü olan teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.36. ve 4.37.'de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında artan ACN derişimi ile teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Her iki eğilim de ayırma veriminin azalması anlamına gelmektedir. Bu sonuç artan ACN derişimi ile analitlerin kolondaki alıkonma süresinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Analitlerin kolonu birbirlerine yakın zamanlarda terketmesi ise kromatografik performansın düşmesine sebep olmaktadır. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile 145.000 m^{-1} teorik tabaka sayısı ve 6.9 μm tabaka yüksekliği elde edilirken, % 50 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile bu değerler 160.000 m^{-1}, ve 6.2 μm olarak elde edilmektedir. Bu sonuçlar % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonunun alkilbenzen türevlerini daha yüksek verim ile ayırdığını göstermektedir. Sentezlenen katyonik monolitik kolonlar ile düşük ACN/fosfat tamponu değerlerinde daha iyi kromatografik ayrımların elde edilmesi bu monolitlerin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Literatürdeki mevcut monolitik kolonlar 70/30 ACN/ tampon gibi yüksek solvent içeriğinde iyi ayırma yeteneğine sahiptir. Ancak sentezlenen yeni monolitik kolonların kullanımıyla mobil faz için gerekli solvent ihtiyacı yaklaşık % 50 oranında azaltılmıştır. Bu özellik, sentezlenen monolitlerin ''yeşil kromatografiye'' daha yakın olduğunu ortaya koymaktadır [159,168,169].

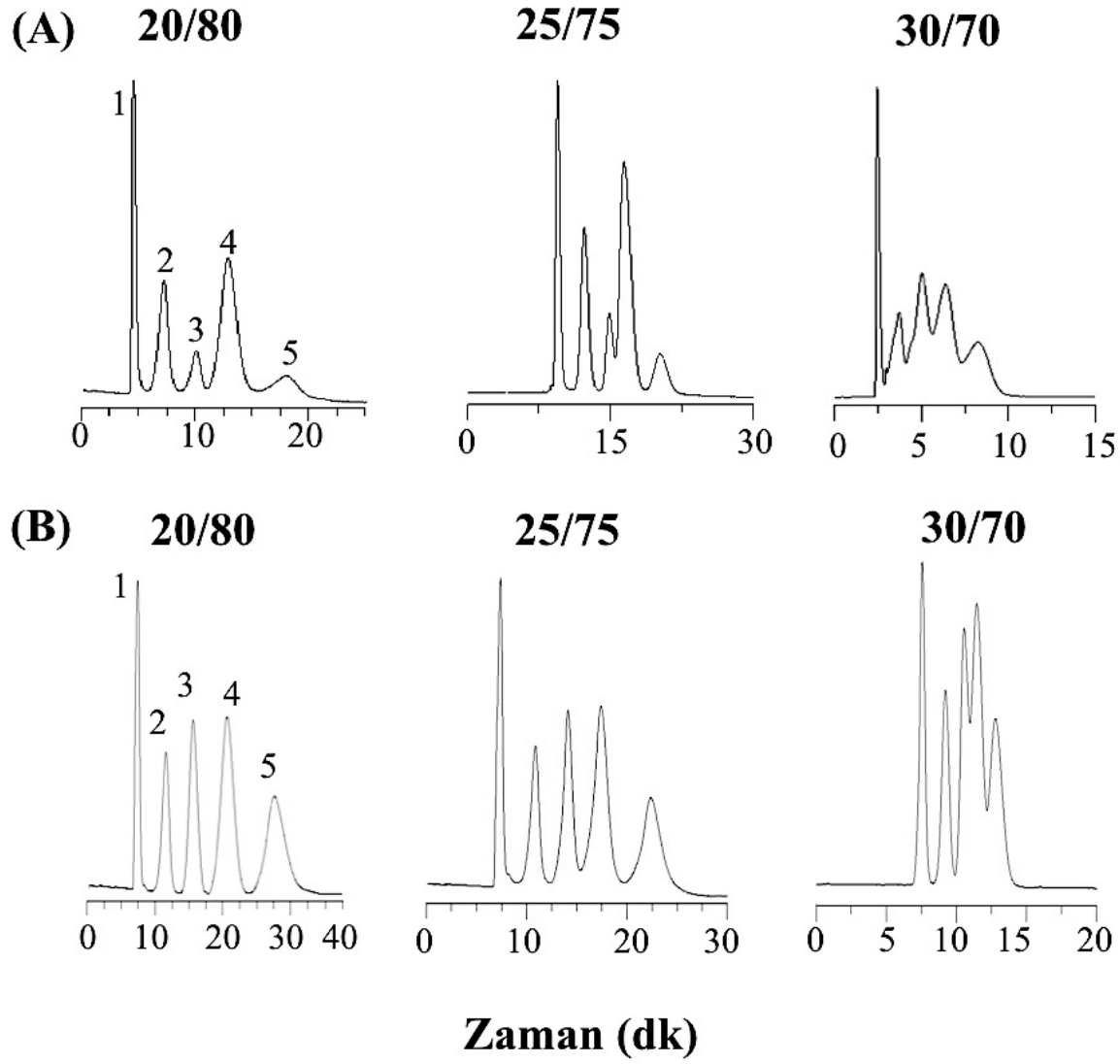


Şekil 4.36. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.37. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile elde edilen fenol türevlerine ait elektrokromatogramlar Şekil 4.38.'de gösterilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.28.'de verilmiştir. Şekil 4.38.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen ve farklı monomer derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla da fenoller başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Analiz sırasında negatif voltaj uygulanarak anodik EOF oluşturulmuştur. Hareketli fazda kullanılan fosfat tamponunun pH'ı 2.5'a ayarlanarak, PEI yapısındaki amin gruplarının protonasyonu sağlanmıştır. ACN derişimi arttığında mobil faz polaritesi ve analitlerin alıkonması azaldığı için analiz süresinin ve pik çözünürlüğünün azaldığı gözlenmektedir. Fenol türevleri elektroozmotik koşullarda hidrofilisitelerine göre ayrılmaktadır. Bağıl olarak polar analit kolondan önce çıkmaktadır (sırasıyla tiyoüre, katekol, fenol, p-kresol ve 3-nitrofenol). Apolarite arttıkça kolonda alıkonma süresi artmaktadır. Elde edilen bu sonuç literatürde yapılan çalışmalar ile uygunluk göstermektedir [159,170]. Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında, % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonu ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Bu durum, monomer miktarındaki artış ile hidrofilisitenin (polaritenin) artmasından kaynaklanmaktadır. Her iki kolonun analiz süreleri kıyaslandığında fenollerin kolonu terk ediş sürelerinin uzaması polaritedeki artışı doğrulamaktadır. % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile 20/80 ACN/10 mM tampon oranı kullanılarak fenol türevlerinin ayrımı 40 dakika gibi bir sürede başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.38. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 fosfat tampon oranları kullanılarak elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.28.'de elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında, her iki kolon için de iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin 20/80 ACN/10 mM fosfat tamponu oranında sağlanabildiği görülmektedir. Dolayısıyla analiz süresi ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında her iki kolon için de optimum değer 20/80 ACN/10 mM fosfat tamponu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.28. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, fenol karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

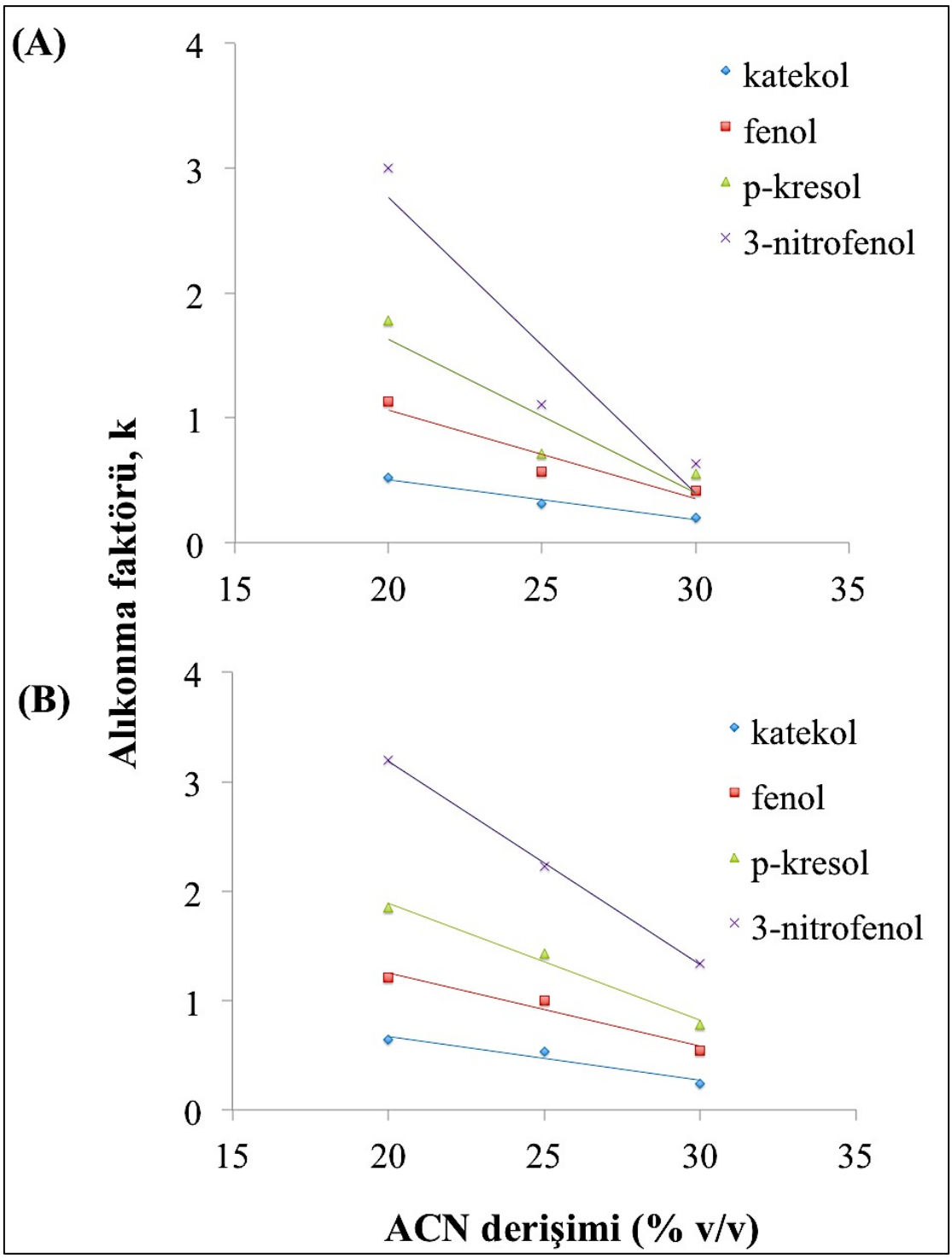
		Pik çözünürlüğü			
HPMA-Cl (% v/v)	**ACN/Tampon (mL/mL)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
50	20/80	2.05	1.57	1.32	1.25
50	25/75	1.91	1.51	0.64	1.50
50	30/70	1.14	1.34	0.56	0.51
60	20/80	2.55	1.87	1.76	1.61
60	25/75	2.11	1.63	1.42	1.52
60	30/70	1.84	1.43	0.74	0.63

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

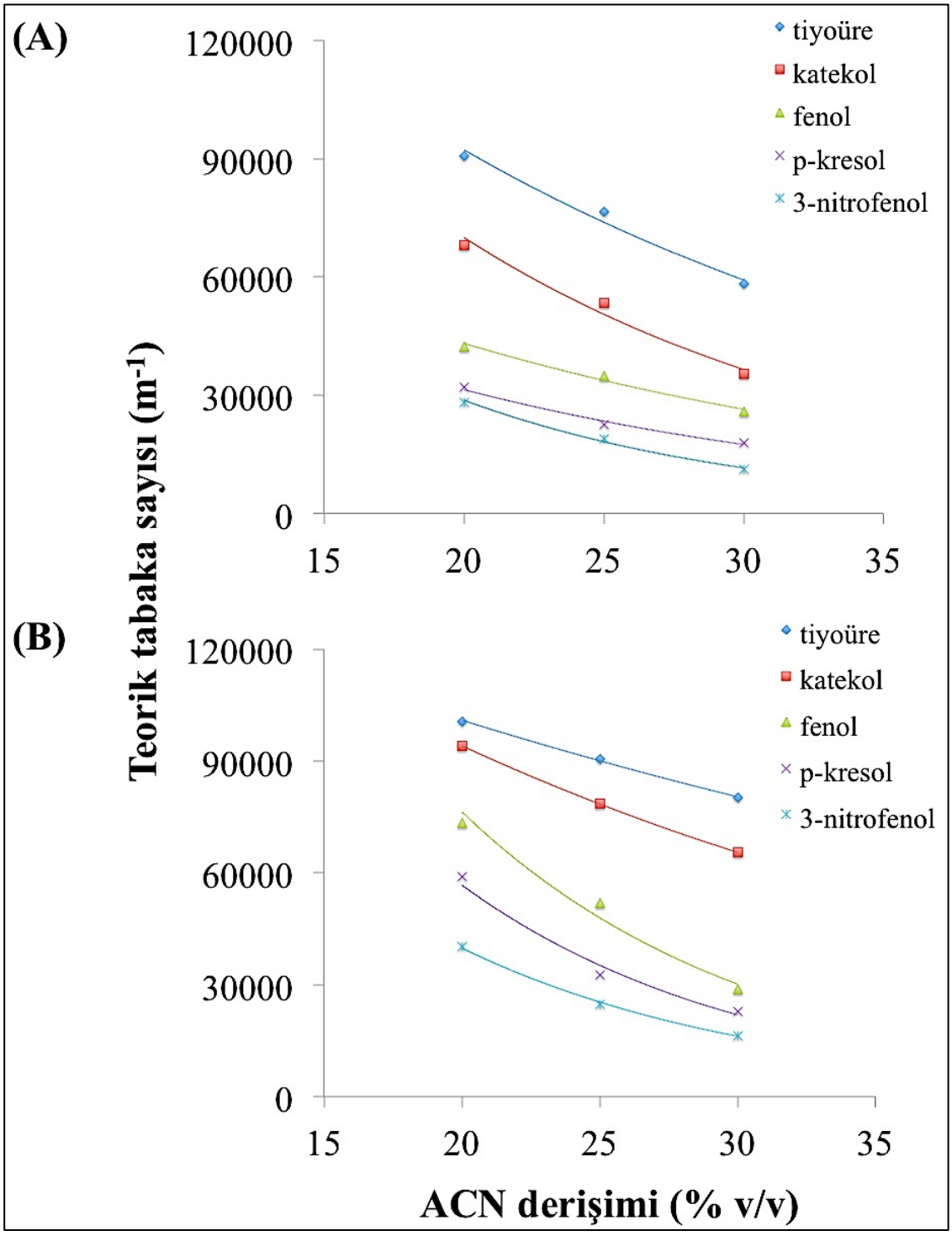
Sentezlenen katyonik monolitik kolonlar ile düşük ACN/fosfat tamponu değerlerinde daha iyi kromatografik ayrımların elde edilmesi bu monolitlerin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Literatürdeki mevcut monolitik kolonlar 70/30 ACN/ tampon gibi yüksek solvent içeriğinde iyi ayırma yeteneğine sahiptir [159,168,169]. Ancak sentezlenen yeni monolitik kolonların kullanımıyla mobil faz

için gerekli solvent ihtiyacı yaklaşık % 70 oranında azaltılmıştır. Bu özellik sentezlenen monolitlerin fenol ayrımı için de ‘‘yeşil kromatografiye’’ daha yakın olduğunu ortaya koymaktadır.

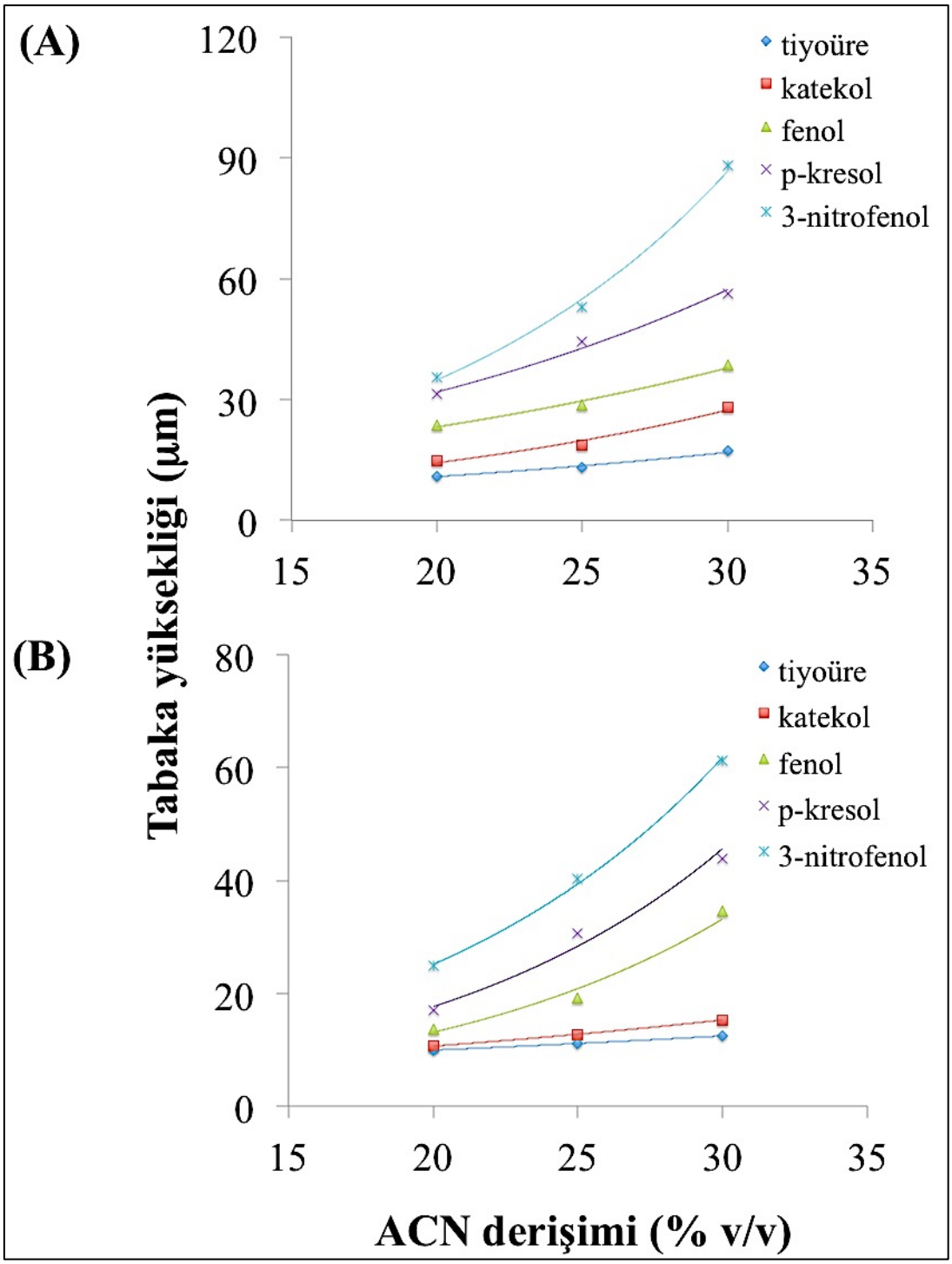
Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için fenol ayrımında alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.39.’da gösterilmektedir. Buradan görüldüğü gibi alıkonma faktörü ACN derişimi ile doğrusal olarak azalmaktadır. Analitlerin birbirlerine çok yakın sürelerde kolonu terketmeleri yani pik çözünürlüklerinin azalması, artan ACN derişimi ile elektrokromatografik ayrımın güçleştiğini göstermektedir. Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.40. ve 4.41’de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi fenol türevlerinin kromatografik ayrımında ACN derişimi arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Bunun sebebi artan ACN derişimi ile analitlerin kolondaki alıkonma süresinin azalmasıdır. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile 91.000 m^{-1} değerine ulaşan teorik tabaka sayıları ve 11 μm’ye kadar düşen tabaka yükseklikleri elde edilmiştir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile ise ilgili sınır değerler değerler 100.000 m^{-1}, ve 9.9 μm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonun fenol türevlerini daha iyi kromatografik performans ile ayırdığı söylenebilir.



Şekil 4.39. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



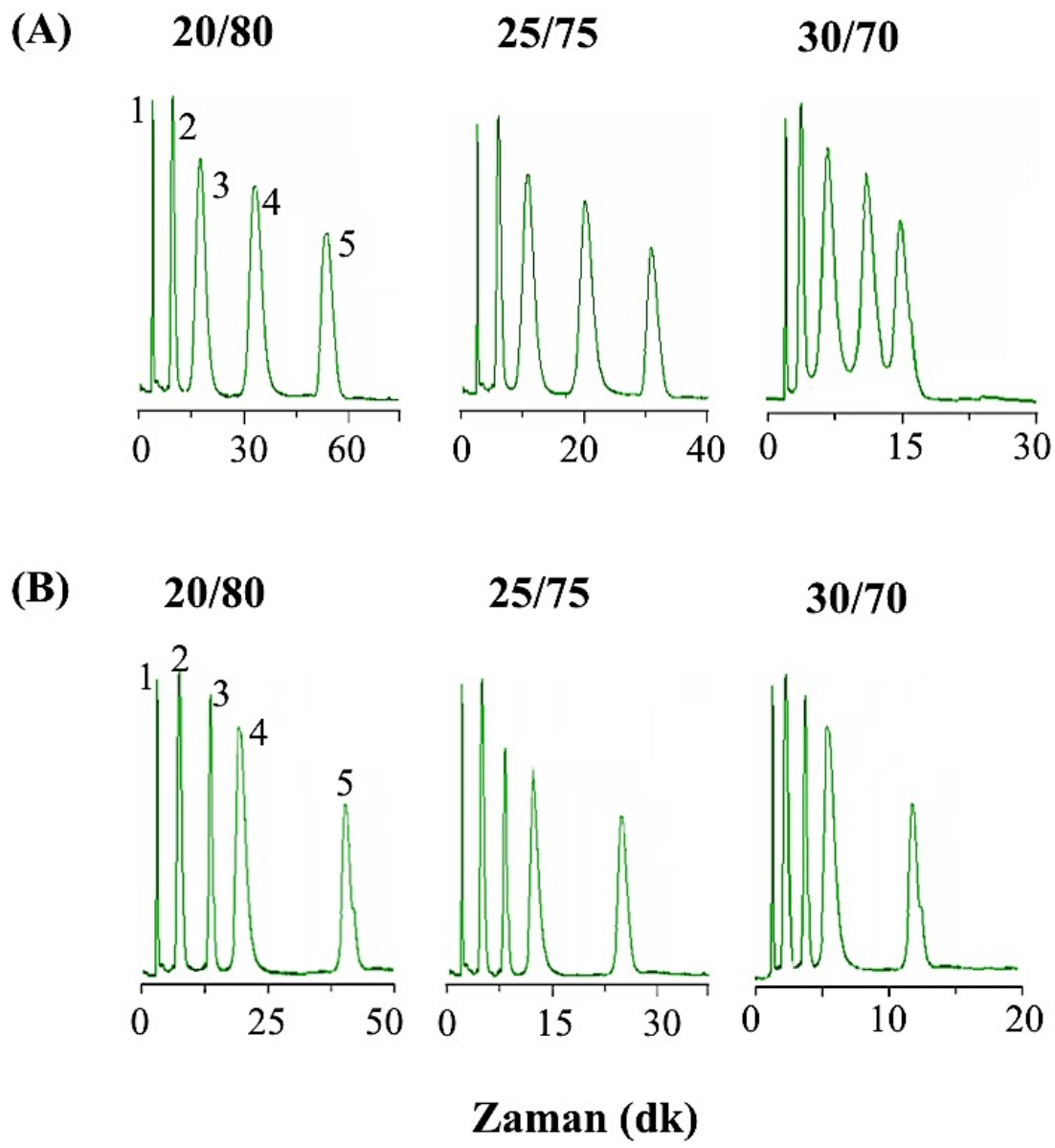
Şekil 4.40. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.41. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar (PAH) organik bileşiklerin eksik yanması sonucu ortaya çıkan toksik ve kanserojen etkiye sahip organik yapıda bileşiklerdir. Tezde katyonik ligand bağlı kolonlar ile PAH karışımının ayrımı da çalışılmıştır. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı ACN/5 mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.42.'de gösterilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.29.'da verilmiştir. Şekil 4.42.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen ve farklı monomer derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla PAH karışımı başarılı şekilde ayrılmıştır. Analiz sırasında negatif voltaj uygulanarak anodik EOF oluşturulmuştur. Hareketli fazda kullanılan tamponun pH'ı 2.5'a ayarlanarak, PEI yapısındaki amin gruplarının protonasyonu sağlanmıştır. ACN derişimi arttığında mobil faz polaritesi ve analitlerin kolondaki alıkonması azaldığı için analiz süresinin ve pik çözünürlüğünün azaldığı gözlenmektedir. PAH türevlerinin ayrımında monolitik yapı ve analitler arasında hidrofobik etkileşim gerçekleşmektedir. PAH'ların ayrılma mekanizmasın da da, alkilbenzen ve fenollere benzer olarak analit polaritesinin önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür [168].

Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında, % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Özellikle monolitik kolonlarda 25/75 ACN/5 mM tampon oranı ile elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında bu etki daha net farkedilmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonu ile 25/75 ACN/5 mM tamponu oranı kullanılarak PAH türevlerinin ayrımı 30 dakika gibi bir sürede gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.42. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/5mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren.

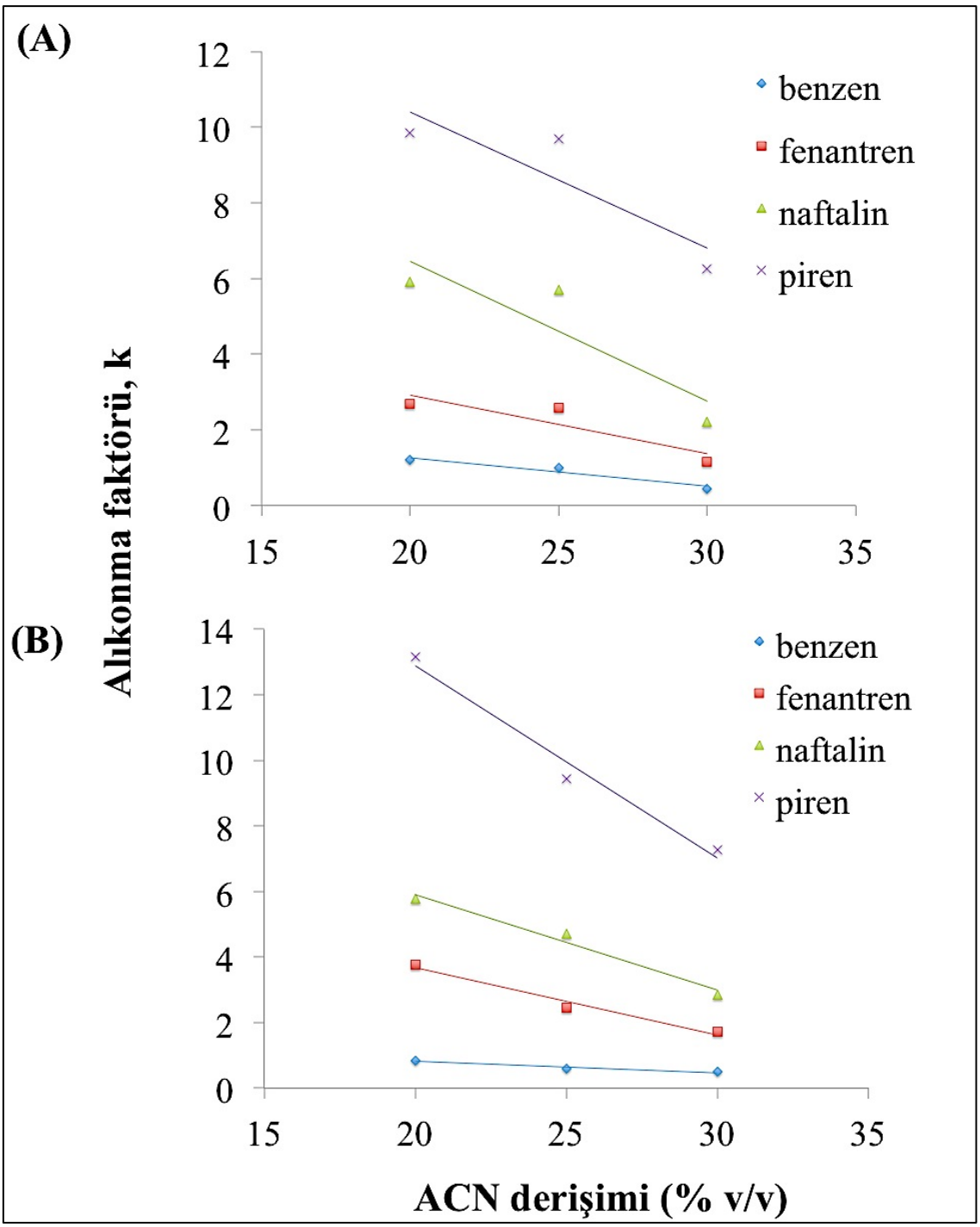
Çizelge 4.29.'da çözünürlük değerlerine bakıldığında artan ACN derişimi ile çözünürlük değerlerinin azaldığı görülmektedir. 20/80 ve 25/75 ACN/5 mM tampon oranlarında her iki kolonla da elde edilen çözünürlük değerleri 1.5'un üzerindedir. Bu durum kromatografik ayrımın gerçekleştiğini göstermektedir. Dolayısıyla analiz süresi ve elde edilen çözünürlük değerlerine göz önüne alındığında % 50 ve % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için PAH karışımının ayrımını sağlayan optimum değer 25/75 ACN/5 mM tampon olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.29. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, PAH karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

		Pik çözünürlüğü			
HPMA-Cl (% v/v)	**ACN/Tampon (mL/mL)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
50	20/80	3.23	2.97	3.92	4.25
50	25/75	3.11	2.86	3.85	3.95
50	30/70	1.64	1.32	1.14	1.07
60	20/80	4.25	3.27	4.06	4.98
60	25/75	4.07	2.93	3.94	4.52
60	30/70	1.94	1.83	1.78	2.63

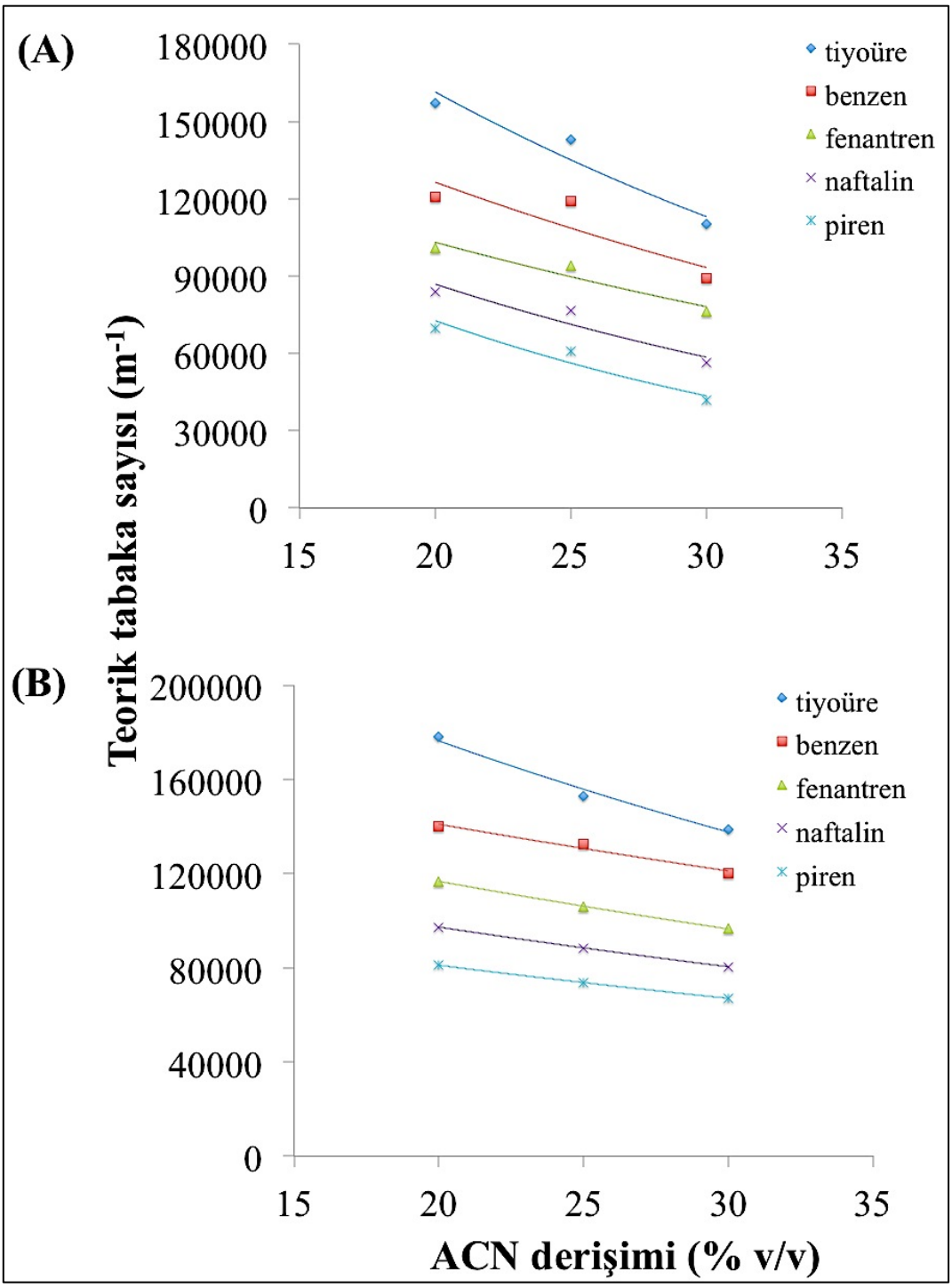
a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 2.5 tamponu, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 214 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için çoklu halkasal aromatik hidrokarbonların alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.43.'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi her bir analitin artan ACN derişimi ile alıkonma faktörleri birbirine yaklaşmaktadır. Bu davranış sentezlenen monolitlerin ters faz kolonu formatına uygun olduğunu göstermektedir [168]. Sentezlenen katyonik monolitik kolonlar ile düşük ACN/Tampon oranı değerlerinde iyi kromatografik ayrımların elde edilmesi bu monolitlerin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Literatürde mevcut kolonlara kıyasla, yeni monolitik kolonların kullanımıyla mobil faz için gerekli solvent ihtiyacı PAH ayrımı için yaklaşık % 65 oranında azaltılmıştır [168].

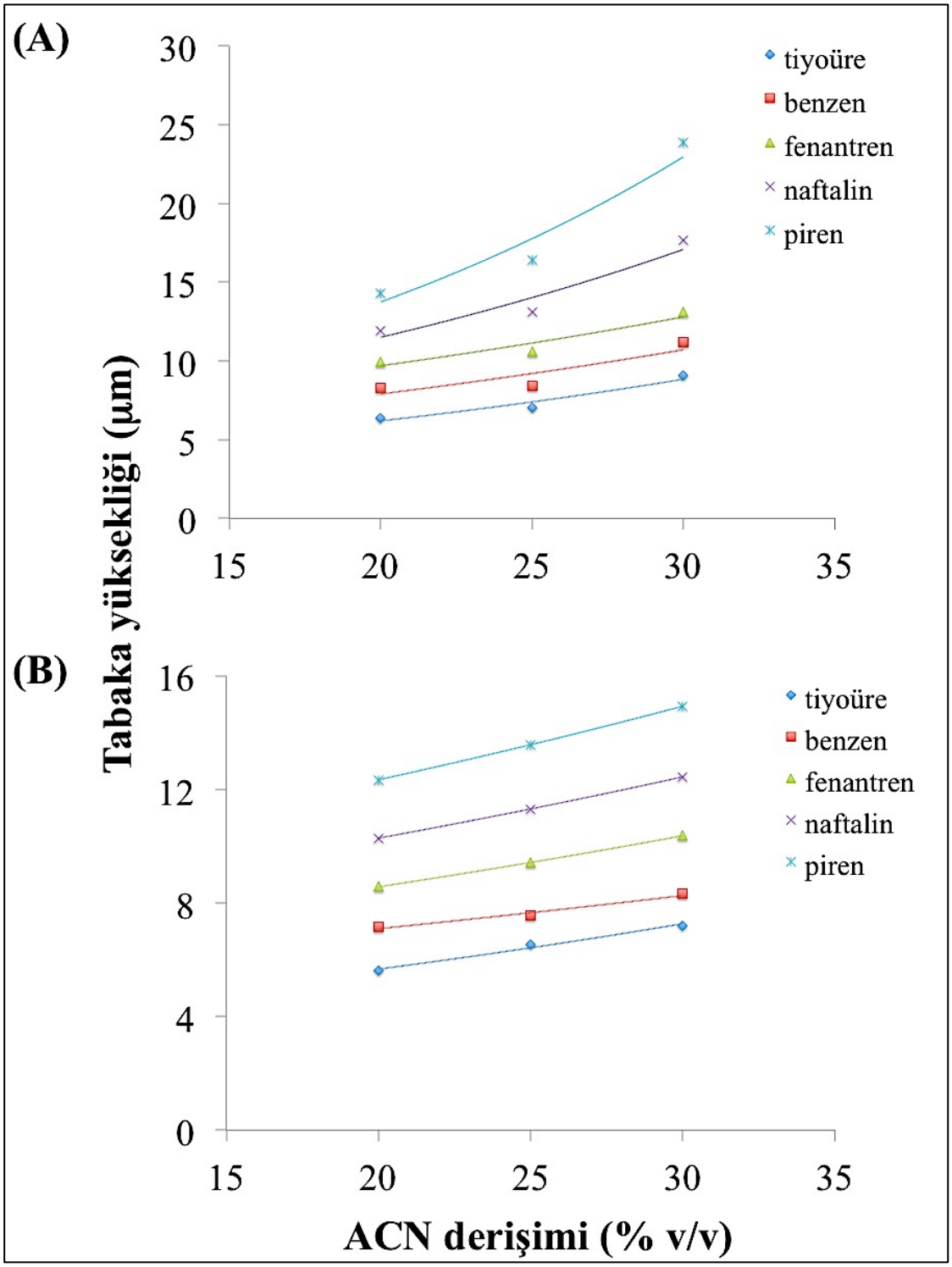


Şekil 4.43. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.

Kolon veriminin ACN derişimi ile değişimi sırasıyla Şekil 4.44. ve 4.45.'de verilmiştir. Bu grafiklerde kolon verimi hem teorik tabaka sayısı, hem de teorik tabaka yüksekliği cinsinden ifade edilmektedir. Grafiklerden görüldüğü gibi PAH türevlerinin kromatografik ayrımında ACN derişimi arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş; tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Analitlerin kolonu birbirlerine yakın sürelerde terketmesi ayırma performansının düşmesine sebep olmaktadır. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile elde edilen teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliği değerleri % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolona kıyasla daha iyidir. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen kolonda 157.000 m^{-1} maksimum teorik tabaka sayısı ve 6.4 μm minimum tabaka yüksekliği elde edilirken, aynı değerler % 60 monomer derişimi ile sentezlenen kolon için 178.000 m^{-1} ve 5.6 μm olarak elde edilmektedir. Bu sonuçlara göre % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonunun PAH türevlerini daha yüksek kromatografik performans ile ayırdığı anlaşılmıştır.



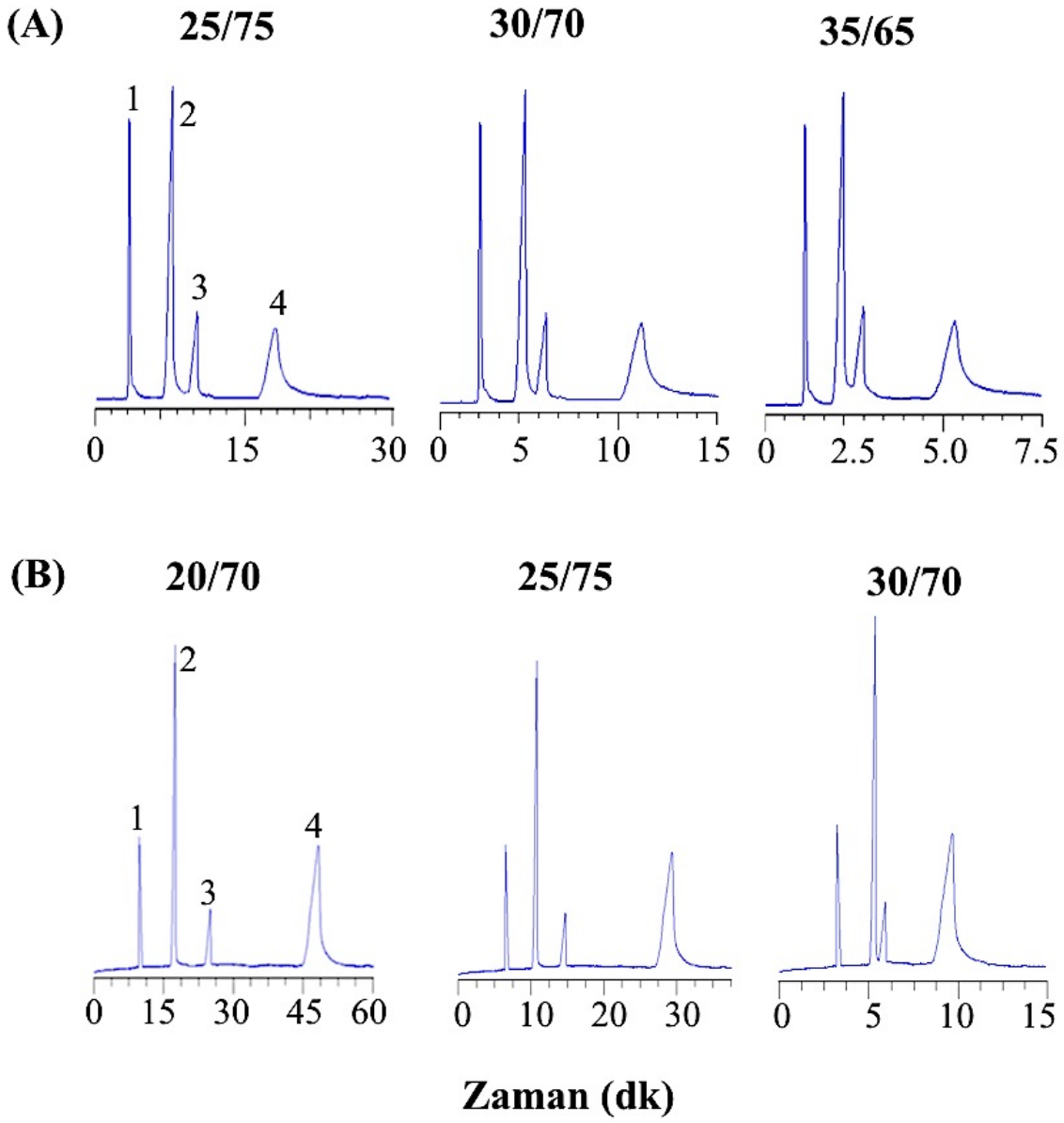
Şekil 4.44. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.45. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Katyonik ligand bağlı kolonlar ile nükleotid ve nükleosid içeren analit karışımlarının kromatografik ayrımı incelenmiştir. Bu tür analit karışımlarının ayrımının istenmeyen analit-sabit faz etkileşimleri nedeniyle zor gerçekleştirildiği bilinmektedir [171]. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı ACN/10 mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar Şekil 4.46.'da gösterilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.30.'da verilmektedir. Şekil 4.46.'daki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen ve farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla da nükleotid/nükleosid karışımı başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Analiz sırasında negatif voltaj uygulanarak anodik EOF oluşturulmuştur. Hareketli fazda kullanılan tamponun pH'ı 2.5'a ayarlanarak, PEI yapısındaki amin gruplarının protonasyonu sağlanmış ve analitler pozitif yüklenmiştir. Düşük ACN/Tampon oranlarında daha iyi bir kromatografik ayrım elde edilmektedir.

Kolonların ayırma performansı karşılaştırıldığında, % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Özellikle % 50 monomer derişimi ile sentezlenmiş kolonda 30/70 ACN/10 mM tampon oranı ve % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş kolonda 25/75 ACN/10 mM fosfat tamponu oranı ile elde edilen en iyi kromatogramlar karşılaştırıldığında bu davranış daha net gözlenmektedir.



Şekil 4.46. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 tampon oranları kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin.

Çizelge 4.30.'da, artan ACN derişimi ile çözünürlük değerlerinin azaldığı görülmektedir. Düşük ACN derişimlerinde her iki kolonla da elde edilen çözünürlük değerleri 1.5'un üzerindedir. Dolayısıyla analiz süresi ve elde edilen çözünürlük değerlerine göz önüne alındığında, % 50 ve % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları için nükleotid/nükleosid karışımının ayrımını sağlayan en uygun değerler sırasıyla 30/70 ve 25/75 ACN/Tampon olarak belirlenmiştir.

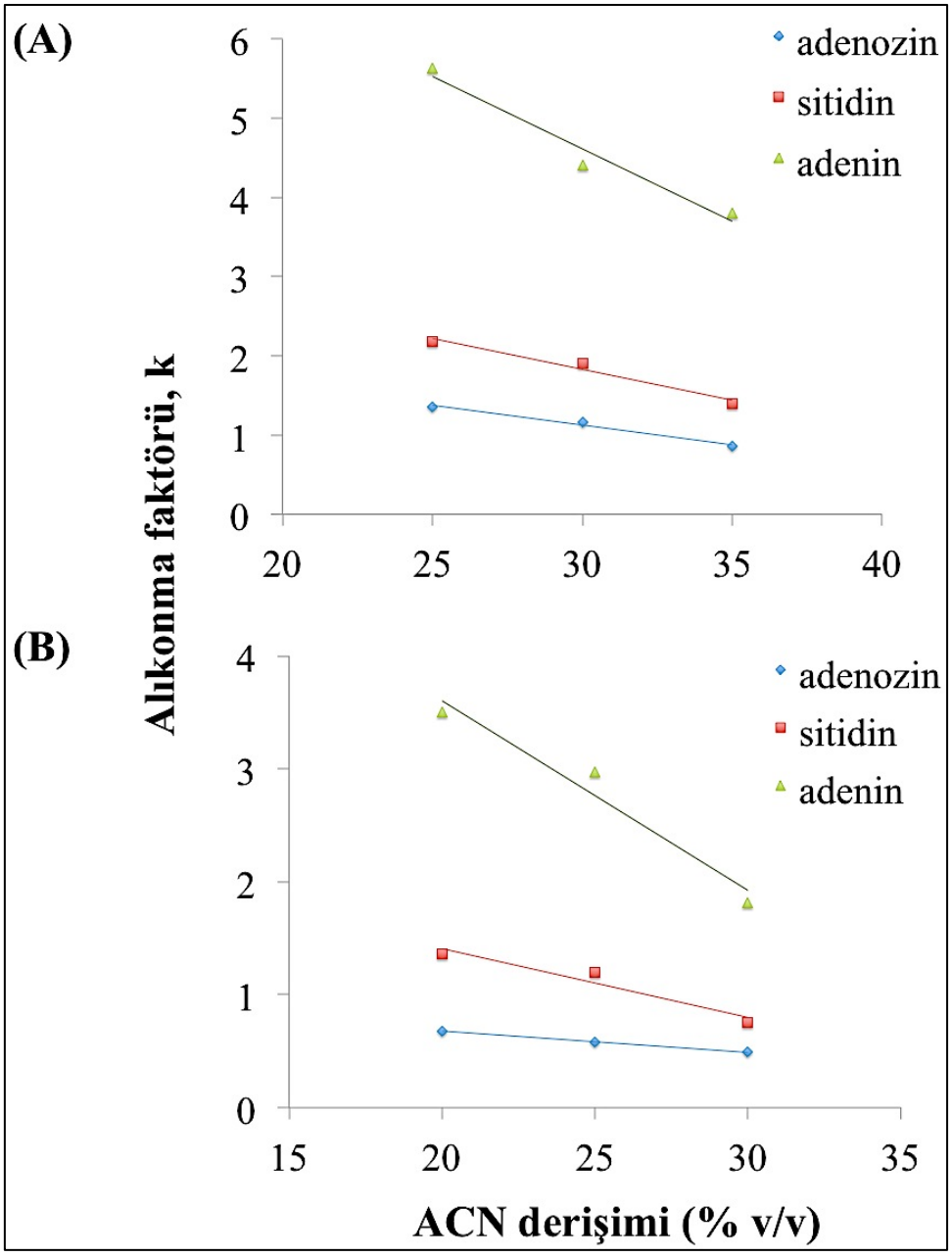
Çizelge 4.30. Farklı HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, nükleotid/nükleosid karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri.

		Pik çözünürlüğü		
HPMA-Cl (% v/v)	**ACN/Tampon (mL/mL)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**
50	25/75	4.63	1.57	3.92
50	30/70	4.11	1.51	3.87
50	35/65	3.84	1.44	3.66
60	20/80	4.85	4.54	4.32
60	25/75	4.58	4.21	4.25
60	30/70	4.34	1.56	3.93

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 260 nm. Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonlar kullanılarak nükleotid/nükleosid karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.47.'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi, her bir analitin artan ACN derişimi ile alıkonma faktörleri birbirine

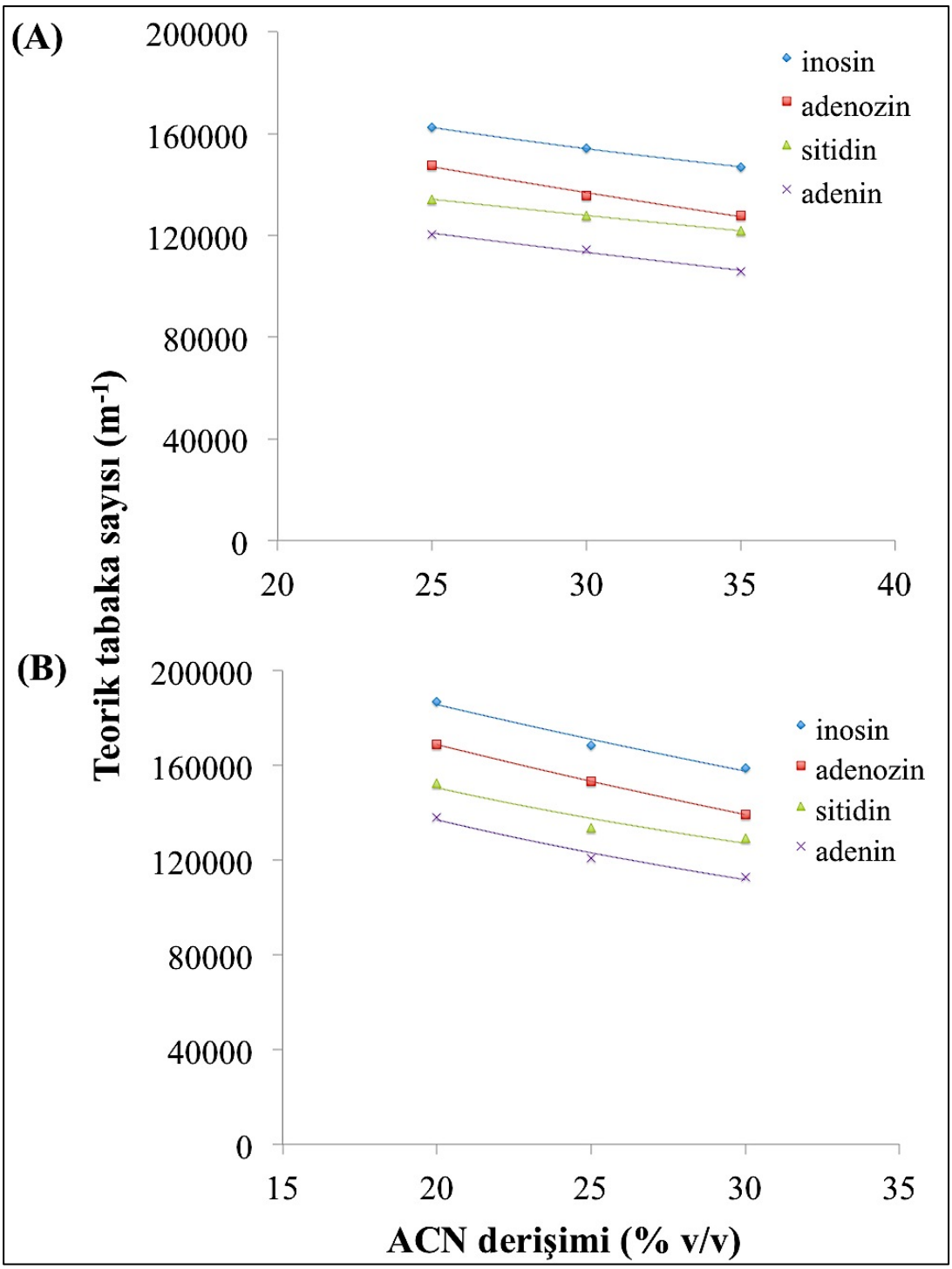
yaklaşmaktadır. Sentezlenen monolitler kullanılarak düşük ACN derişimlerinde daha iyi kromatografik performans alınabileceği bu sonuçlar ile bir kez daha doğrulanmıştır.



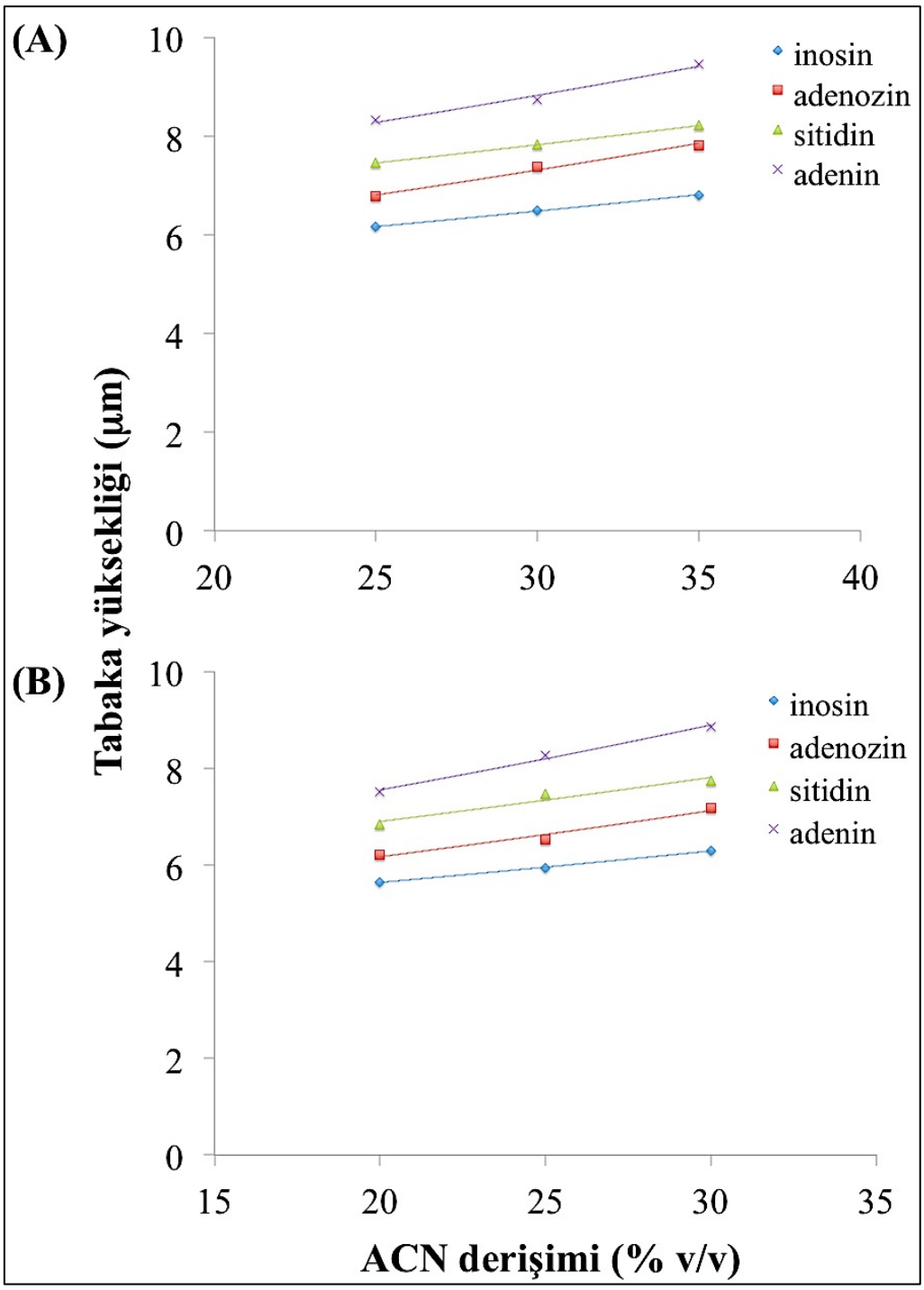
Şekil 4.47. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleotid ve nükleosid karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.

Kolon veriminin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.48. ve 4.49.'da verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi nükleotid/nükleosid karışımının kromatografik ayrımında ACN derişimi arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir.

% 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu ile elde edilen teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliği değerleri diğer kolona kıyasla daha iyidir. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen kolonda en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği 162.000 m^{-1} ve 6.1 μm olarak elde edilmiştir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen kolon ile bu değerler 187.000 m^{-1} ve 5.3 μm olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre hacimce % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonunun nükleotid-nükleosid karışımını daha yüksek verim ile ayırdığı anlaşılmıştır.



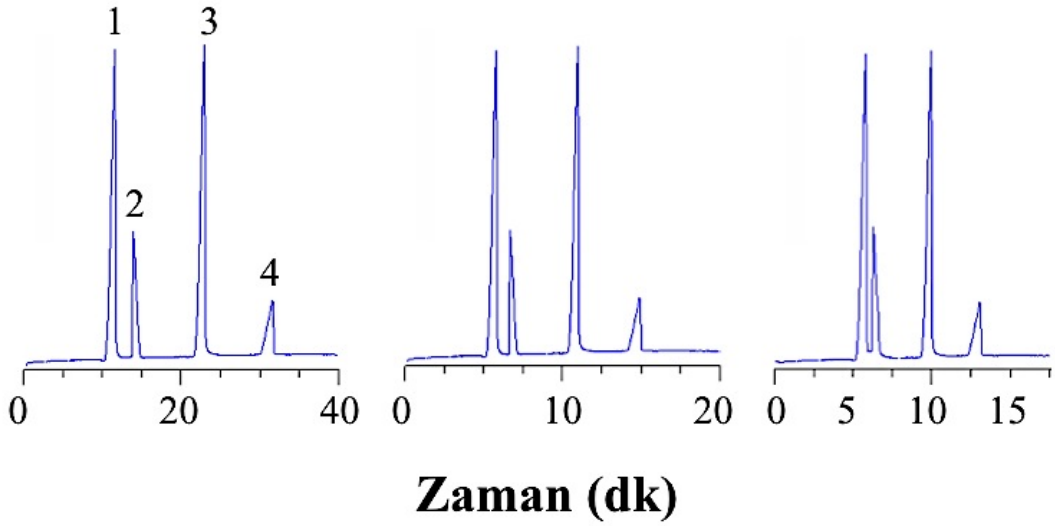
Şekil 4.48. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid-nükleotit karışımının teorik tabaka sayısının ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.49. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid-nükleotit karışımının tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Katyonik kolonlar ile nükleosidlerin ayrımı da çalışılmıştır. Genellikle bazik karakterli olan nükleosidler anyon değiştirici kolonlarda oldukça iyi ayrılır. Hazırlanan kolonun anyon değiştirici özelliği olduğu için CEC sisteminde uygun koşullarda nükleosidlerin ayırma çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmüştür. Ancak % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı monolitik kolon ile iyi ayırma performansı elde edilememiştir. Şekil 4.50.'de ve Çizelge 4.31.'de, % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı ACN/Tampon oranlarında elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar ve bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri verilmektedir.

Şekil 4.50.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi % 60 monomer derişimi ile sentezlenen ve PEI ile türevlendirilen monolitik kolonla nükleosidler başarılı bir şekilde ayrılmıştır. Analiz sırasında negatif voltaj uygulanarak anodik EOF oluşturulmuştur. Hareketli fazda kullanılan fosfat tamponunun pH'ı 2.5'a ayarlanarak, PEI yapısındaki amin gruplarının protonasyonu sağlanmış ve ayrım kolaylaştırılmıştır. Düşük ACN/fosfat tamponu oranlarında daha iyi bir kromatografik ayrım elde edilmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonu ile 25/75 ACN/10 mM tampon oranında nüklesidlerin ayrımı 15 dakika gibi bir sürede başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



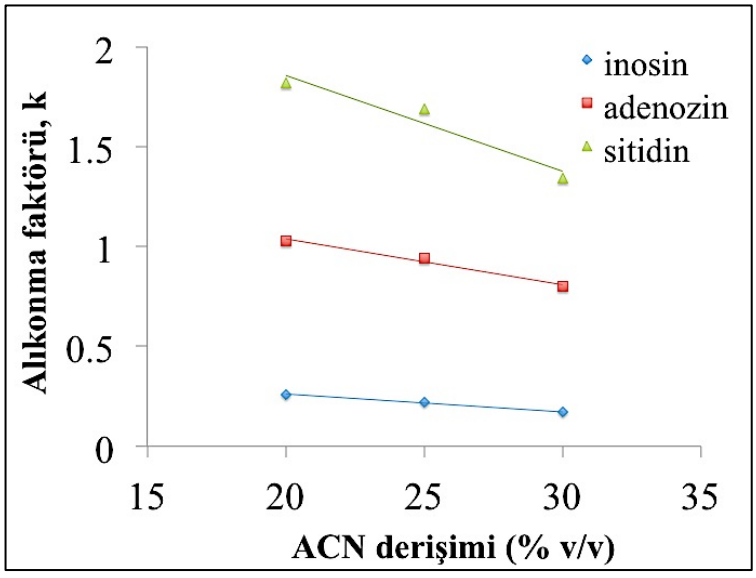
Şekil 4.50. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit kullanılarak farklı ACN/10 mM pH 2.5 tampon oranlarında elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/pH 2.5 tampon oranı (mL/mL): (A) 20/80, (B) 25/75, (C) 30/70. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör: 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.

Çizelge 4.31.'de, artan ACN derişimi ile çözünürlük azalmaktadır. Ancak elde edilen tüm çözünürlük değerleri iyi bir ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5'un üzerindedir. Analiz süresi ve elde edilen çözünürlük değerlerine göz önüne alındığında, % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon için nükleosidlerin ayrımını sağlayan en uygun değer 25/75 ACN/10 mM tampon olarak belirlenmiştir. % 60 monomer oranı ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon kullanılarak elde edilen ve nükleosidlerin alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimini gösteren grafik Şekil 4.51.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi artan ACN derişimi ile alıkonma faktörleri birbirine yaklaşmaktadır.

Çizelge 4.31. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, nükleosid karışımının kromatografik ayrımında farklı ACN/Tampon oranlarında[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

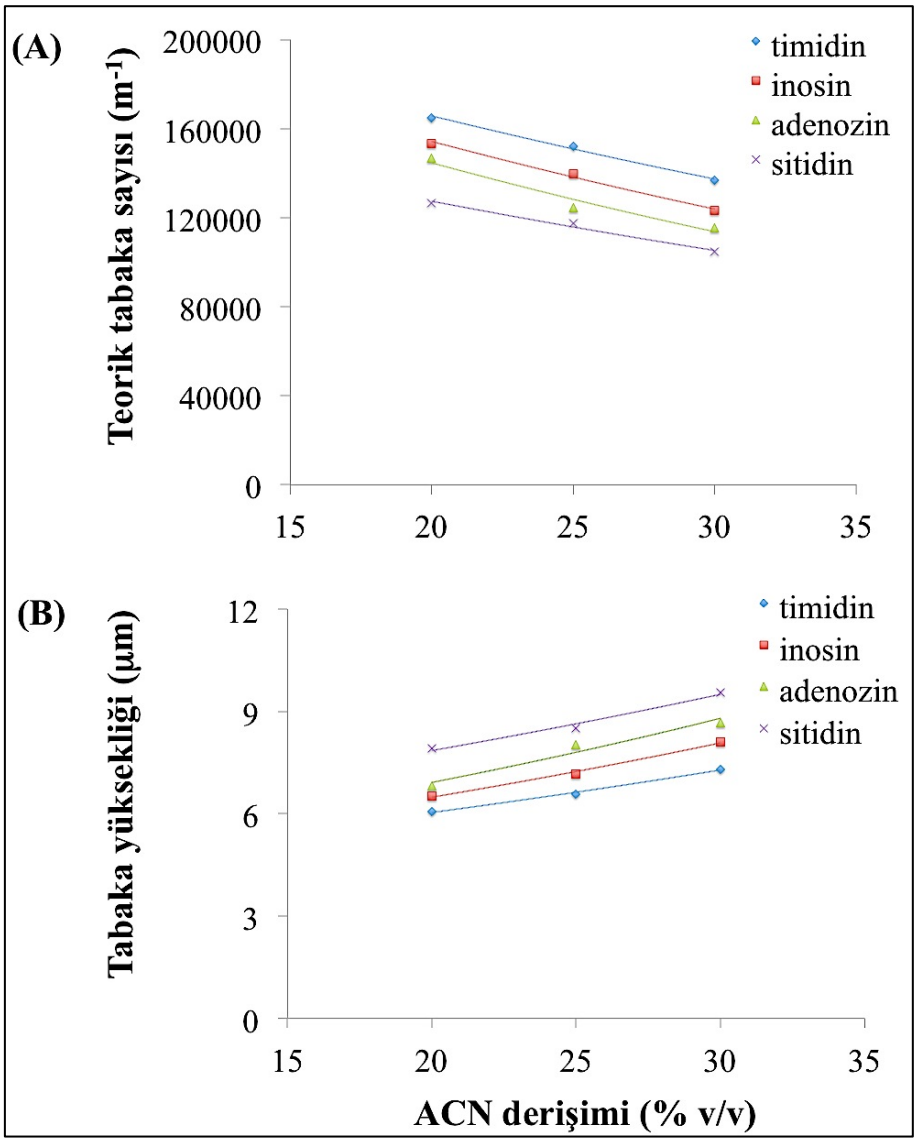
	Pik çözünürlüğü		
ACN/Tampon (mL/mL)	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**
20/80	3.85	4.54	4.37
25/75	3.46	4.33	4.15
30/70	1.54	4.26	3.95

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 260 nm. Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.



Şekil 4.51. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Kolon veriminin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.52.'de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi nükleosidlerin kromatografik ayrımında ACN derişimi arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen kolonda en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği 165.000 m^{-1} ve 6.1 μm olarak elde edilmektedir.



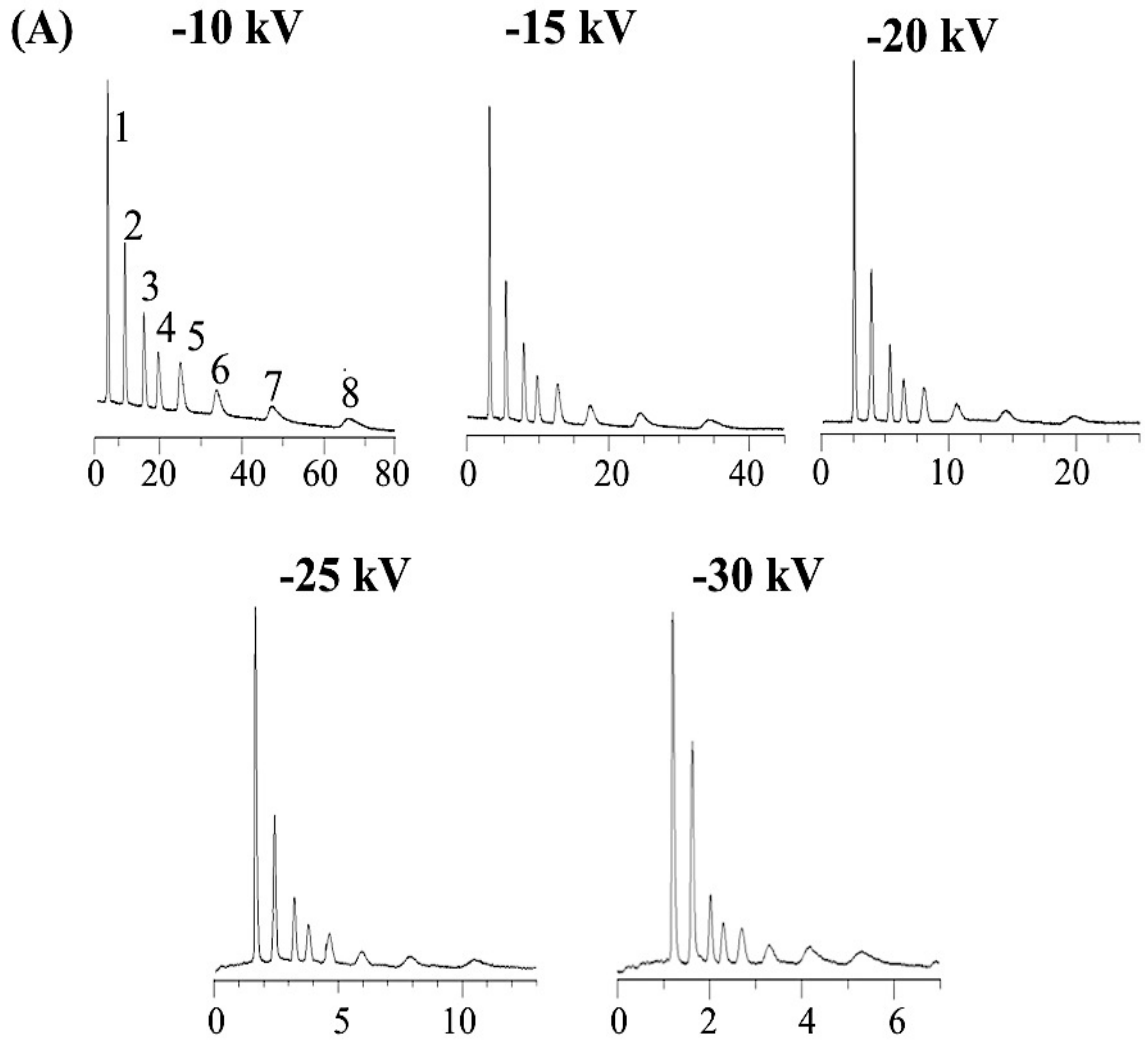
Şekil 4.52. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının (A) teorik tabaka sayısı (B) tabaka yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: değişken, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.

4.4.3. Sürücü Gücün Etkisi

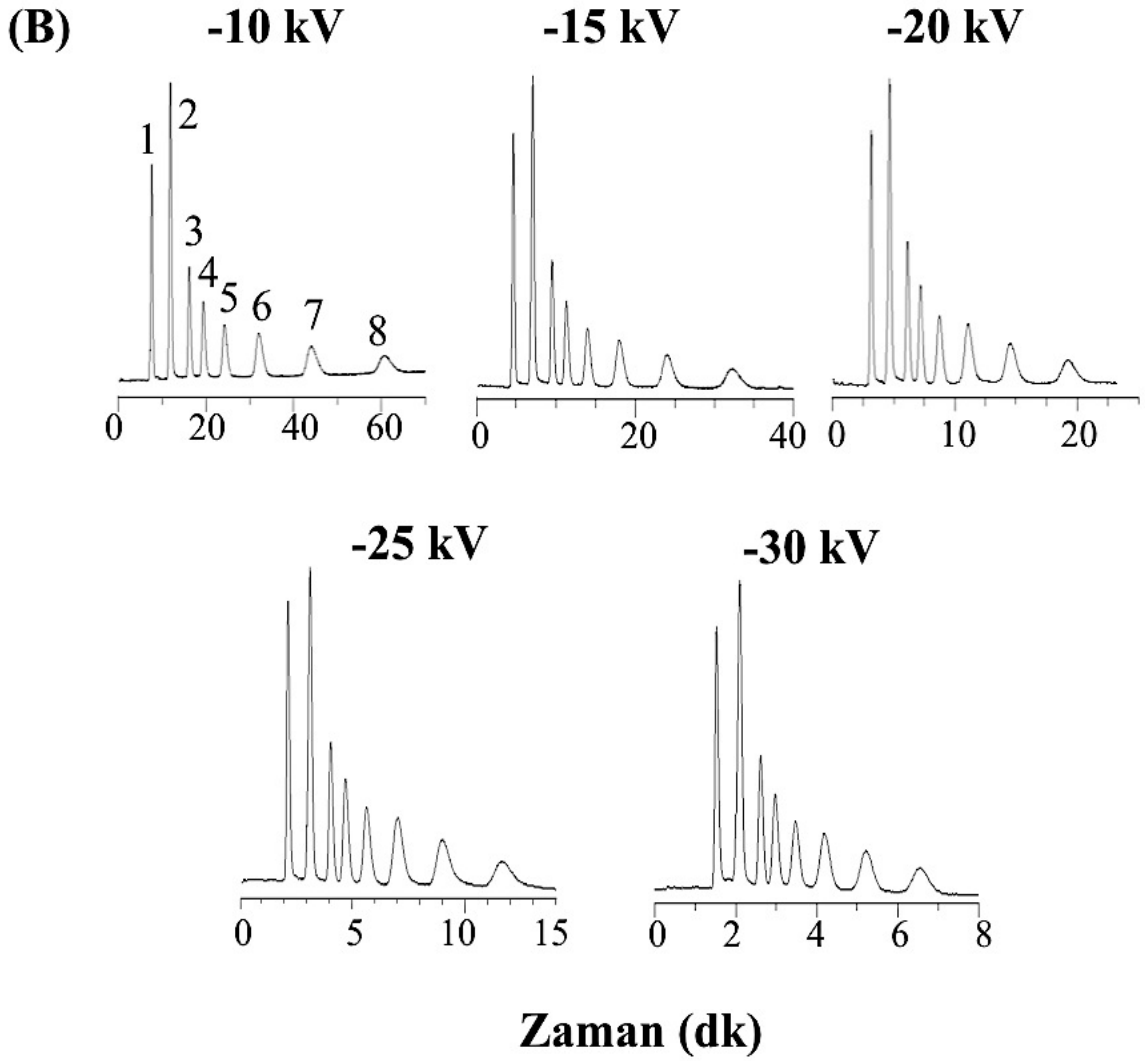
PEI bağlı monolitik kolonlara farklı ACN/Tampon oranlarının uygulanması sonucu, en ugun mobil faz bileşimi belirlenmiştir. Belirlenen mobil faz kullanılarak CEC sisteminde bütün kolonlara -10 ile -30 kV arasında voltaj uygulanmış ve sürücü gücün kromatografik ayrıma etkisi incelenmiştir.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak alkilbenzen karışımına ait farklı voltaj değerlerinde elde edilen elektrokromatogramlar Şekil 4.53.'de gösterilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla arklı voltaj değerlerinde hesaplanan pik çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.32.'de verilmektedir. Şekil 4.53.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen monolitik kolonlara uygulanan tüm voltaj değerlerinde alkilbenzenlerin ayrımı başarılı şekilde yapılmıştır. Bu sonuçlar -10 ile -30 kV aralığında 35/65 ACN/Tampon oranı ile alkilbenzenlerin elektro-kromatografik ayrımının başarıyla yapıldığını göstermektedir. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda, voltaj değerinin -10 kV'den -30 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 80 dakikadan 6 dakikaya kadar kısaltılabilmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda ise voltaj değerinin -10 kV'den -30 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 60 dakikadan 7 dakikaya indirilmiştir.

Çizelge 4.32.'de elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında, iyi bir kromatografik ayrım için gerekli olan ve eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin tüm voltaj değerlerinde sağlandığı görülmektedir. Uygulanan voltajın artışı ile analiz süresi kısalmakta ve çözünürlük değerlerinde önemli bir azalma oluşmamaktadır. Pik çözünürlükleri değerlendirildiğinde, % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolon ile daha iyi kromatogramlar elde edildiği görülmektedir. Bu fark özellikle sürücü gücün -20 kV olduğu durumda elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında daha net görülmektedir. % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonda, uygulanan voltaj -20 kV iken alkilbenzen türevlerinin ayrımı 25 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşmektedir.



Şekil 4.53. devam ediyor.



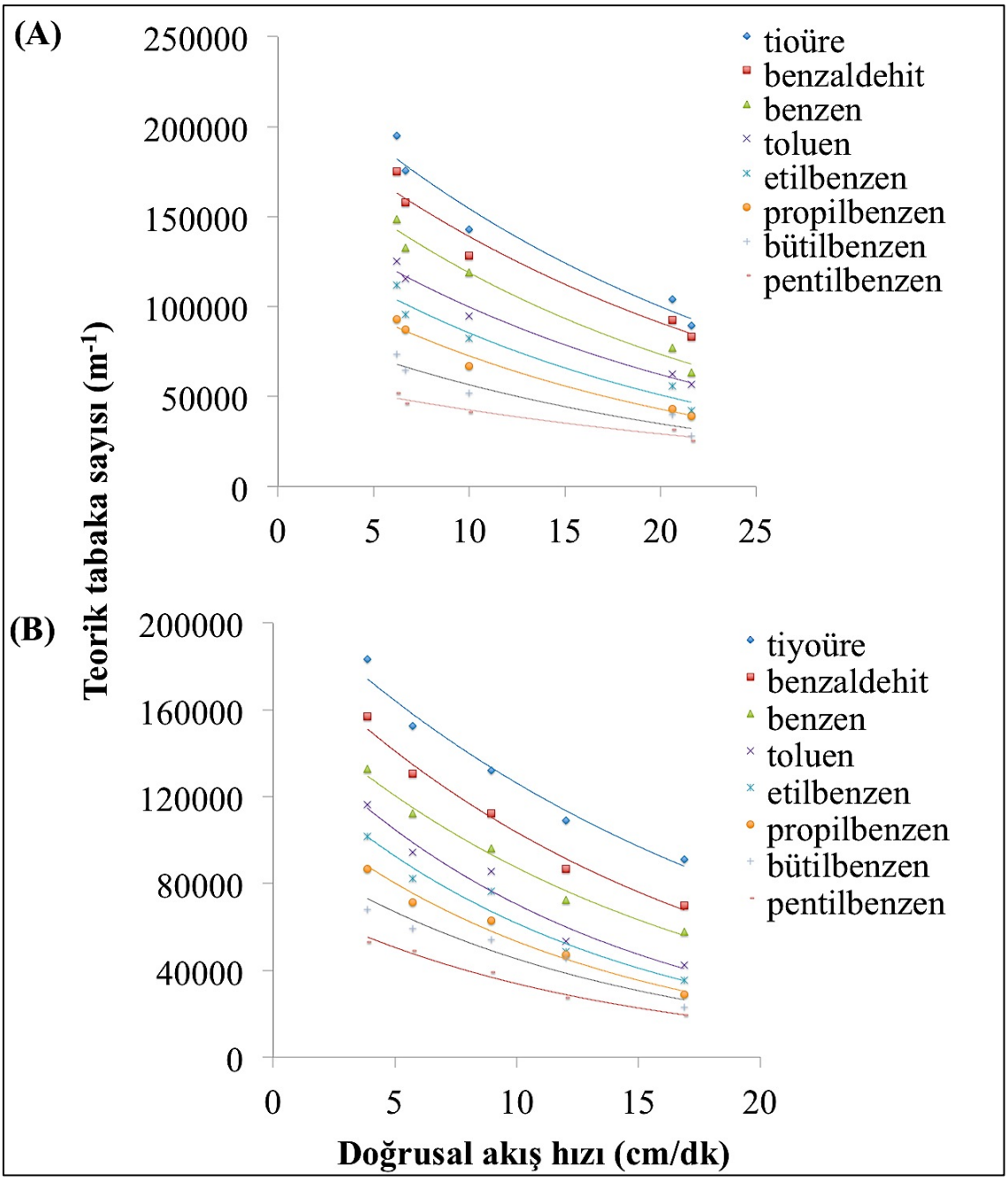
Şekil 4.53. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65 Enjeksiyon koşulları: -10 kV 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.

Çizelge 4.32. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonu kullanılarak, alkilbenzen türevlerinin kromatografik ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

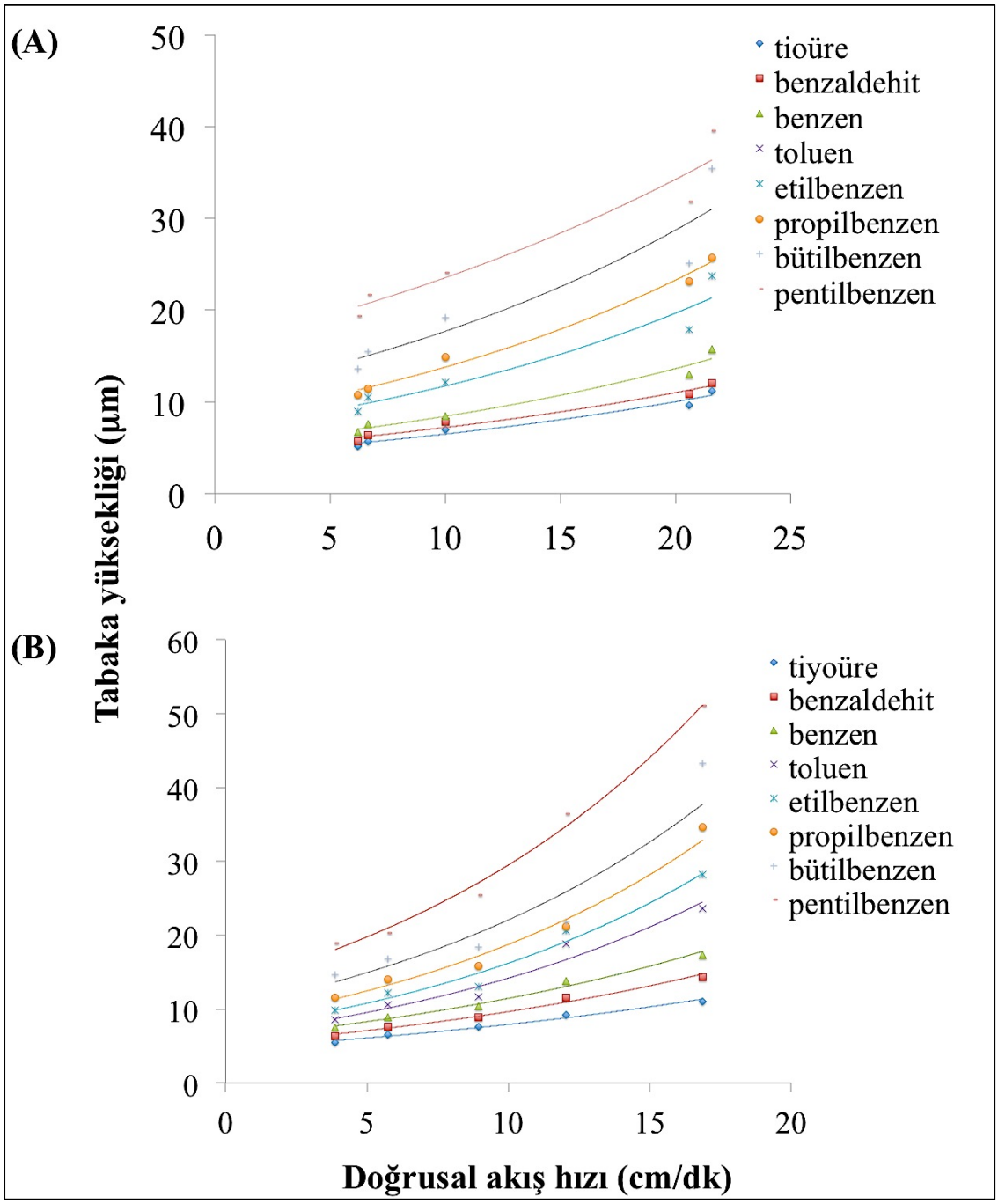
		Pik çözünürlüğü						
HPMA-Cl (% v/v)	**Voltaj (kV)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**	**R(6/5)**	**R(7/6)**	**R(8/7)**
50	-10	3.83	4.47	2.52	2.35	3.18	3.09	2.72
50	-15	3.64	4.23	2.45	2.26	2.95	2.83	2.41
50	-20	3.41	4.06	2.20	2.08	2.85	2.64	2.28
50	-25	3.14	3.78	1.85	1.98	2.48	2.49	2.14
50	-30	2.94	1.97	1.65	1.73	2.28	2.35	1.79
60	-10	3.76	4.35	2.29	2.13	3.15	2.88	2.42
60	-15	3.51	4.13	2.19	1.95	2.85	2.52	2.27
60	-20	3.23	3.82	2.00	1.83	2.51	2.23	2.06
60	-25	2.65	2.53	1.95	1.70	1.88	1.92	2.02
60	-30	1.81	1.88	1.79	1.63	1.68	1.83	1.71

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 35/65 ACN/5 mM pH 2.5 tampon, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 300 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzaldehit, (3) benzen, (4) toluen, (5) etilbenzen, (6) propilbenzen, (7) bütilbenzen, (8) pentilbenzen.

Kolon veriminin iki farklı ölçüsü olan teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.54. ve 4.55.'de verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi ve beklenildiği üzere, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında doğrusal akış hızı arttıkça teorik tabaka sayısında düşüş, tabaka yüksekliğinde ise artış gözlenmektedir. Tiyoüre kullanıldığı durumda % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği 183.400 m^{-1} ve 5.5 µm olarak edilmektedir. % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile bu değerler aynı analit kullanılarak 195.000 m^{-1}, ve 5.1 µm olarak hesaplanmaktadır.

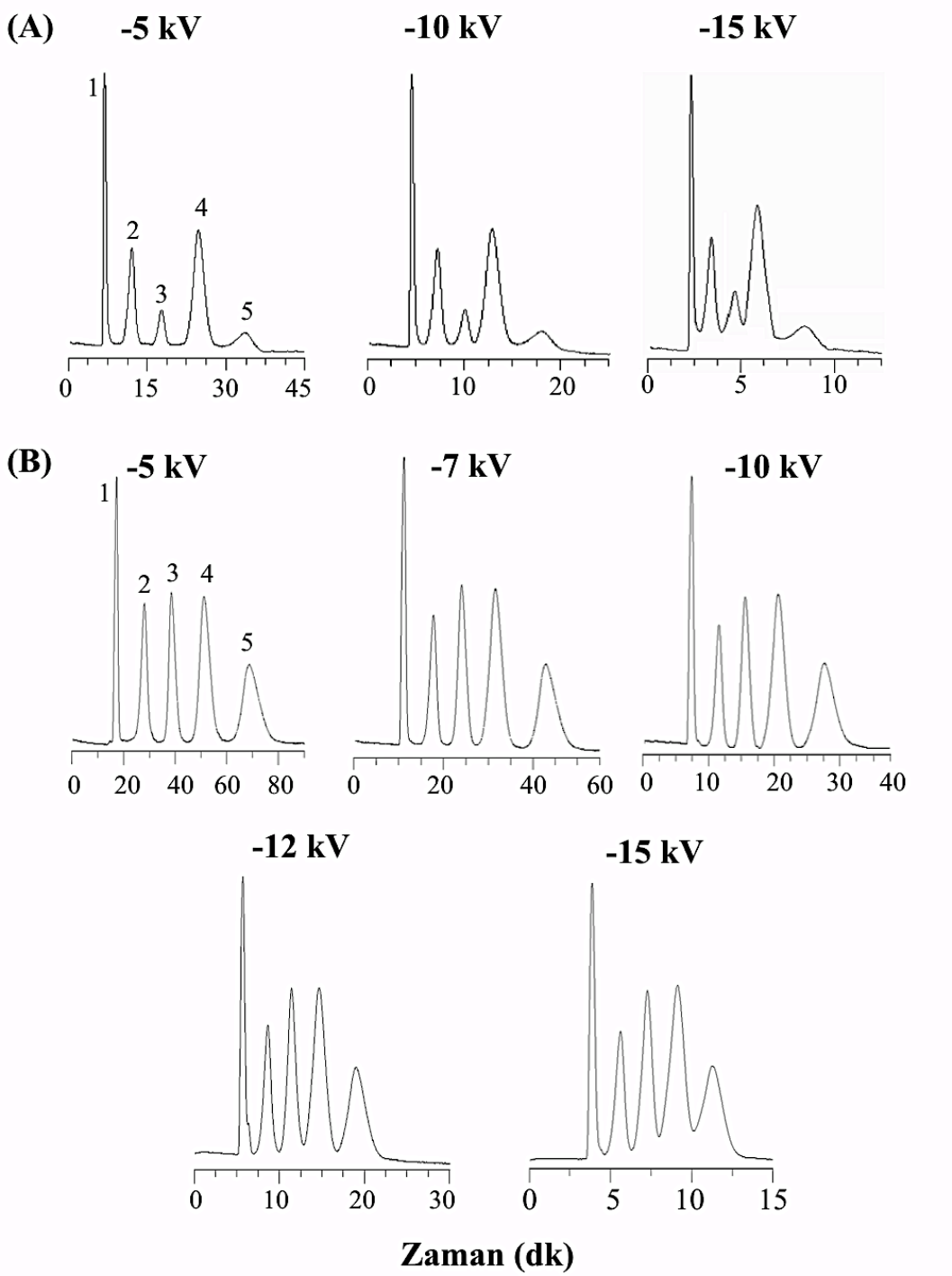


Şekil 4.54. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.



Şekil 4.55. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak alkilbenzen türevlerinin tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 35/65, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı voltaj değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.56.'da gösterilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.33.'de verilmiştir. Voltaj değeri arttığında analitlerin alıkonma süreleri azaldığı için analiz süresinin azaldığı gözlenmektedir. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda, voltaj değerinin -5 kV'den -15 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 45 dakikadan 10 dakikaya kadar kısaltılabilmiştir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda ise voltaj değerinin -5 kV'den -15 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 80 dakikadan 12 dakikaya kadar kısaltılabilmektedir. Çizelge 4.33.'de elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında her iki kolon için de iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin % 50 monomer derişimi ile sentezlenen kolonda 20/80 ACN/10 mM tampon oranında ancak -5 kV voltaj değeri ile sağlanabildiği görülmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen kolonda ise bu değer -5 kV ile -10 kV aralığında elde edilebilmiştir. Kolonların farklı voltaj değerlerinde çözünürlük değerleri karşılaştırıldığında, % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolona ait çözünürlük değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.



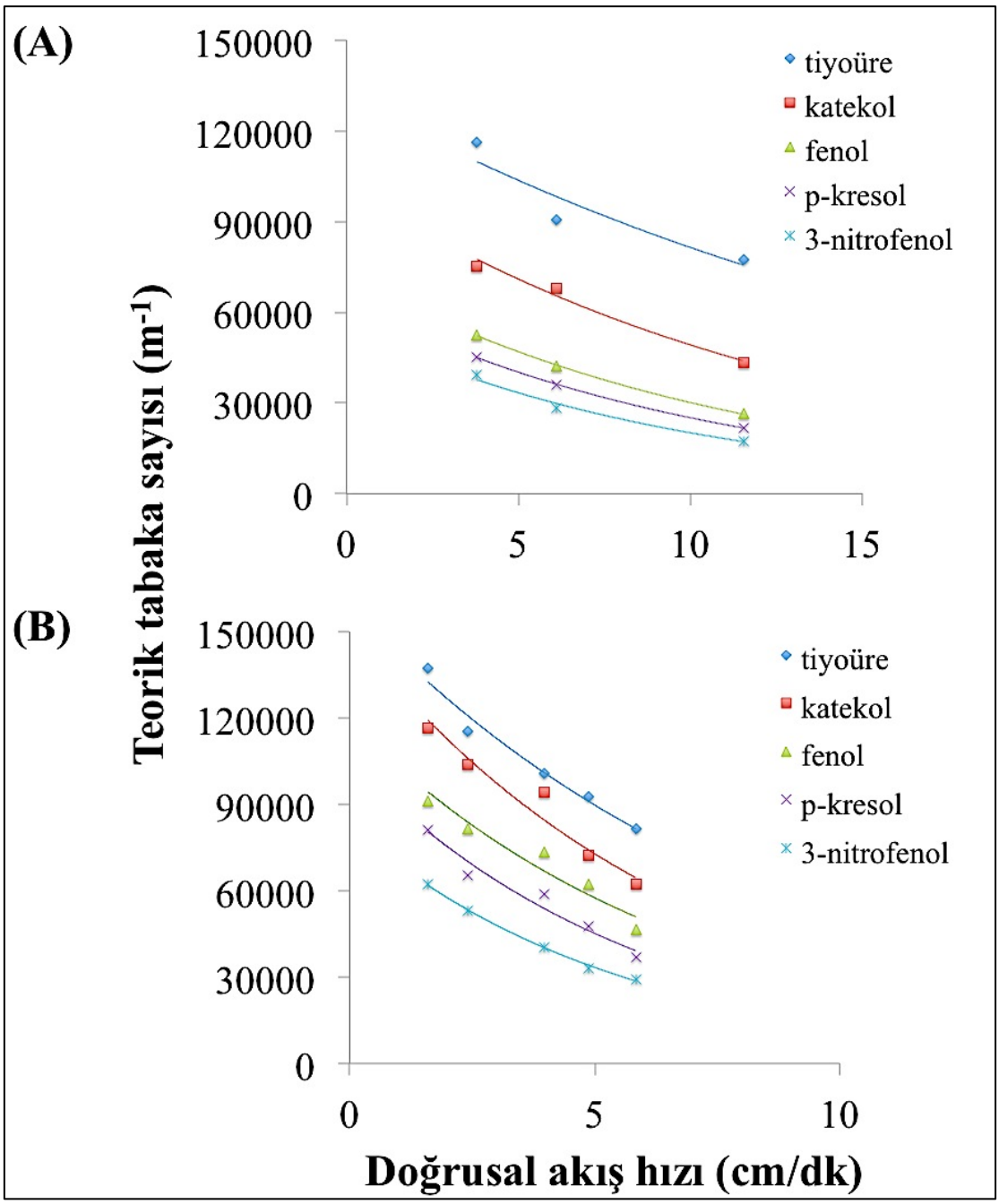
Şekil 4.56. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen fenol karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Çizelge 4.33. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak fenol karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri

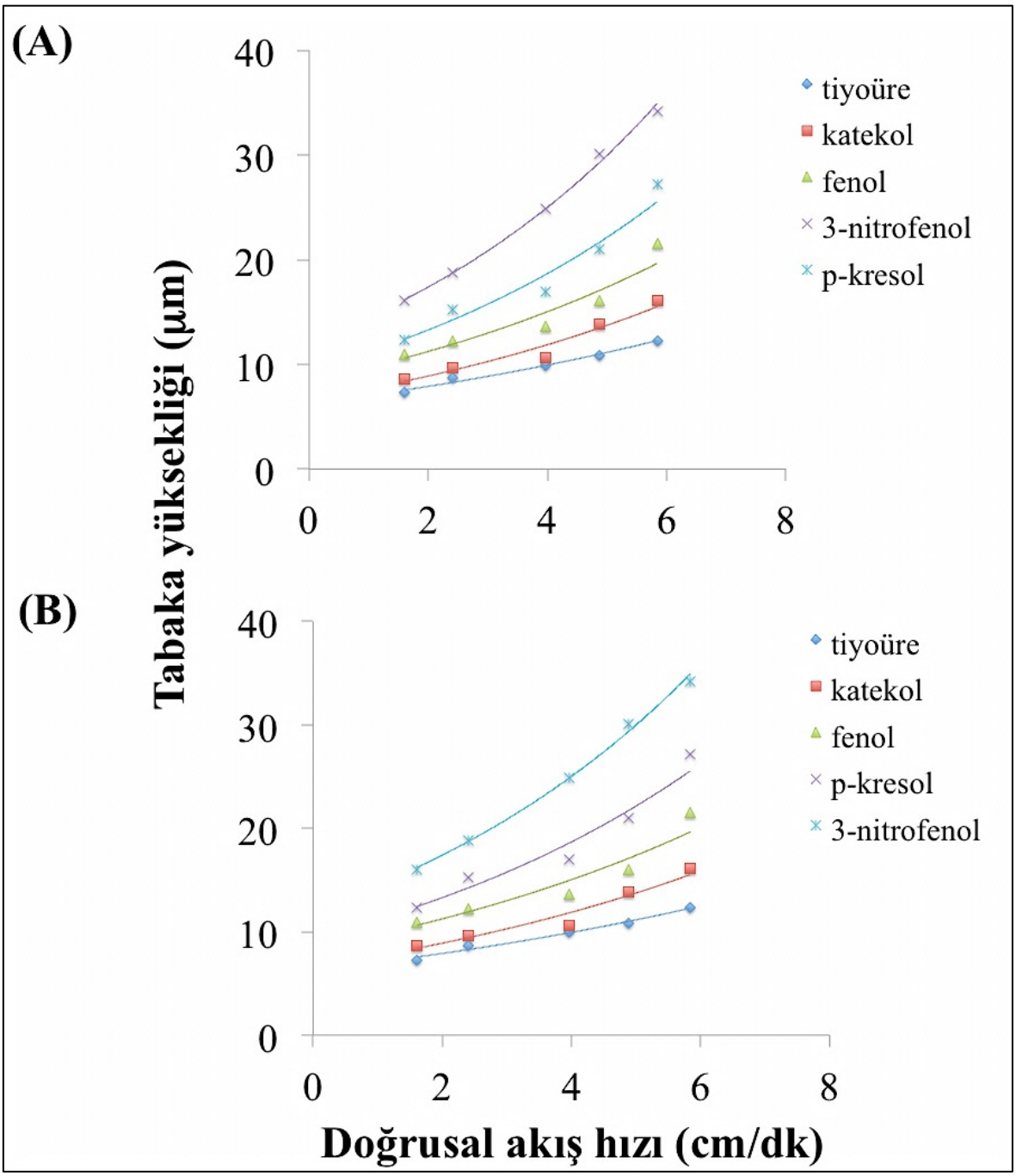
		Pik çözünürlüğü			
HPMA-Cl (% v/v)	**Voltaj (kV)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
50	-5	2.23	1.87	1.62	1.52
50	-10	2.05	1.57	1.32	1.25
50	-15	1.42	1. 02	0.87	0.63
60	-5	2.85	1.97	1.76	1.61
60	-7	2.63	1.91	1.62	1.53
60	-10	2.55	1.87	1.76	1.61
60	-12	1.83	1.51	1.42	1.37
60	-15	1.74	1.39	1.23	0.86

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 20/80 ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 200 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) katekol, (3) fenol, (4) p-kresol, (5) 3-nitrofenol.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.57.'da ve 4.58.'de verilmiştir. Tiyoüre analiti kullanılarak % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği 116.000 m^{-1} ve 8.6 µm olarak bulunmuştur. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile bu değerler 137.000 m^{-1} ve 7.3 µm olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonunun fenol türevlerini daha iyi ayırdığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.57. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.

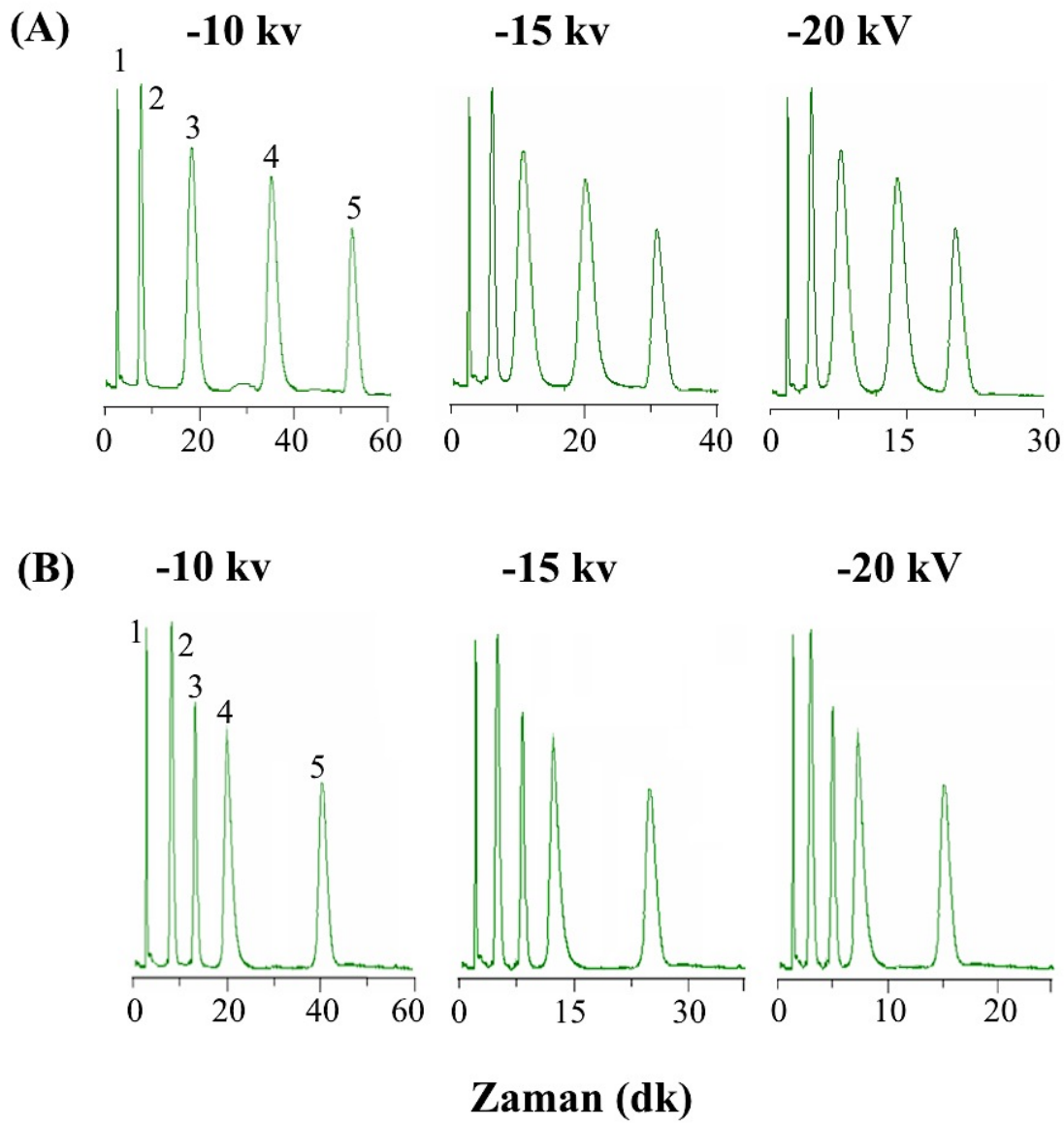


Şekil 4.58. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak fenol karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 20/80, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 200 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı voltaj değerlerinde elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.59.'da gösterilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.34.'de verilmiştir.

Şekil 4.59.'daki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen ve farklı monomer derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla da PAH karışımı başarılı bir şekilde ayrılmıştır. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda, voltaj değerinin -10 kV'den -20 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 60 dakikadan 30 dakikaya inmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda ise voltaj değerinin -10 kV'den -20 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 45 dakikadan 17 dakikaya kadar kısaltılabilmektedir.

Kolonların farklı voltaj değerlerinde çözünürlük değerleri karşılaştırıldığında % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı bağlı-poli (HPMA-Cl-co-EDMA) kolon kullanılarak elde edilen çözünürlük değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Çizelge 4.34.'de elde edilen pik çözünürlük değerlerine bakıldığında, her iki kolon için de iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin tüm voltaj değerlerinde sağlandığı görülmektedir. Çözünürlük değerlerinde artan voltaj değeri ile önemli bir düşmenin meydana gelmediği görülmektedir.



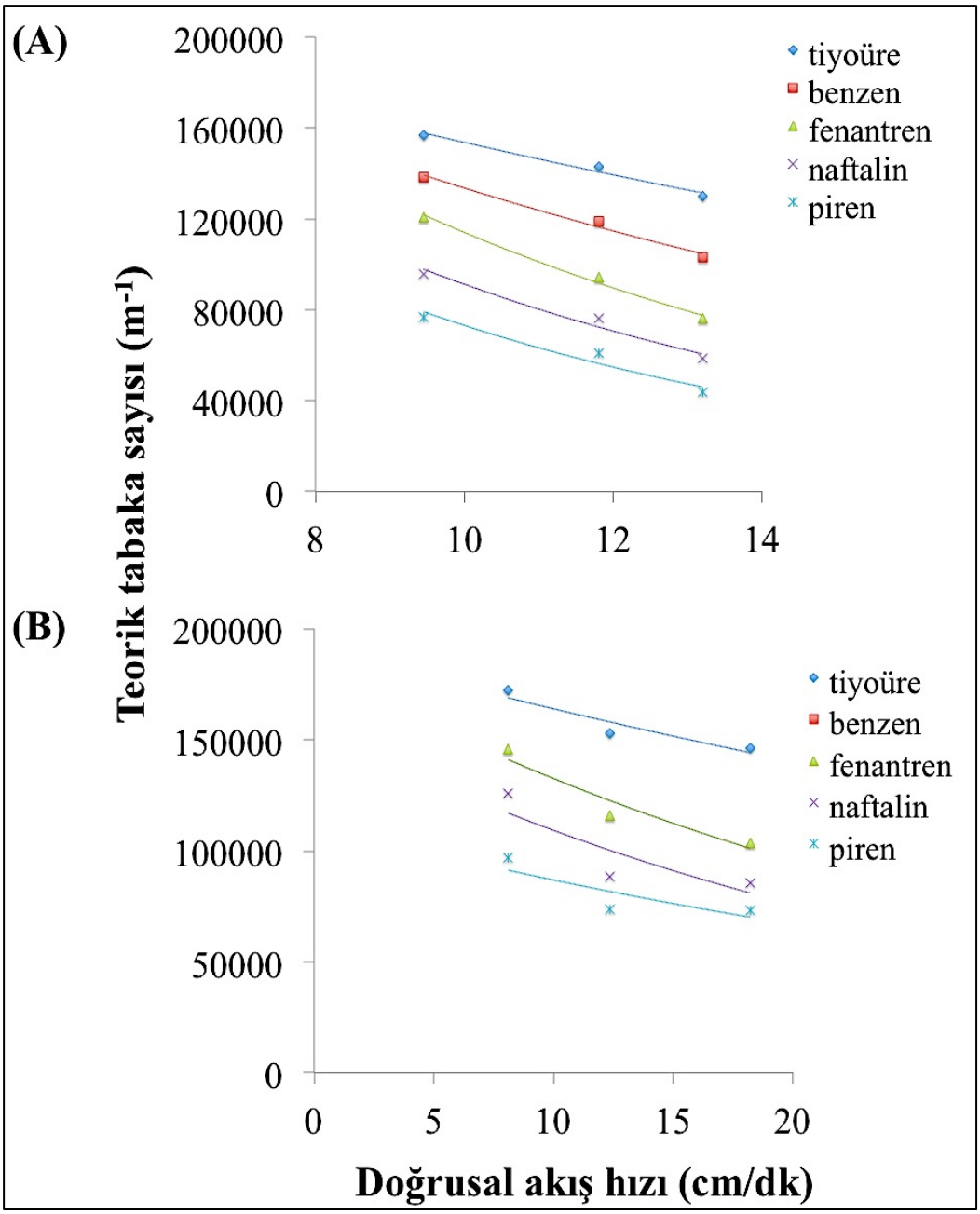
Şekil 4.59. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen PAH karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren.

Çizelge 4.34. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak PAH ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen pik çözünürlük değerleri

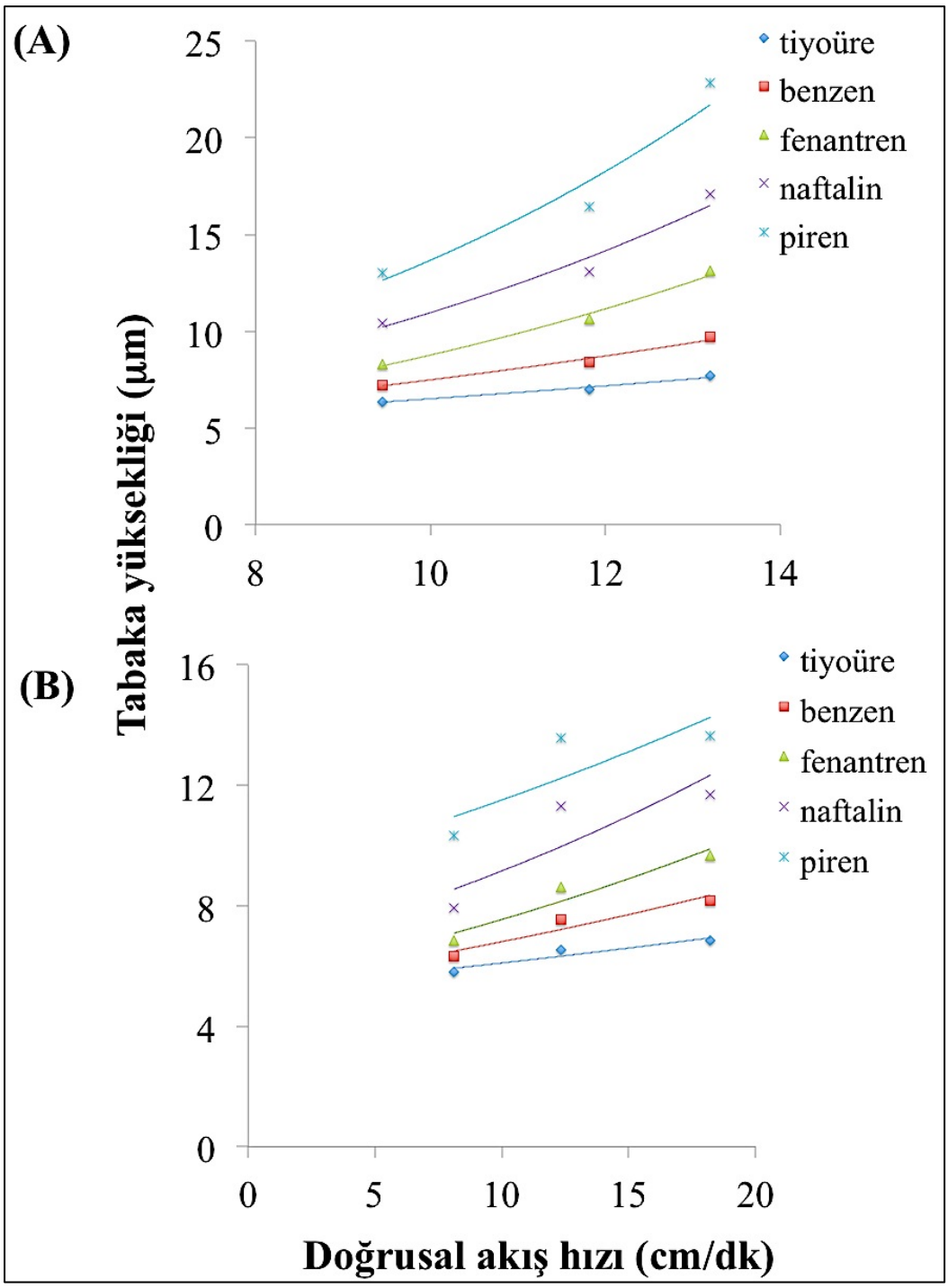
		Pik çözünürlüğü			
HPMA-Cl (% v/v)	**Voltaj (kV)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**	**R(5/4)**
50	-10	3.83	3.55	3.32	3.25
50	-15	3.11	2.86	3.85	3.95
50	-20	2.21	1.76	1.61	1.58
60	-10	4.27	3.35	4.18	4.86
60	-15	4.07	2.93	3.94	4.52
60	-20	2.63	1.94	1.88	2.98

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 25/75 ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 214 nm. Elüsyon sırası: (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) fenantren, (4) naftalin, (5) piren.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.60. ve 4.61.'de verilmiştir. Tiyoüre analiti kullanılarak, % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı 157.000 m^{-1} en düşük tabaka yüksekliği 6.4 µm olarak bulunmaktadır. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile bu değerler 172.000 m^{-1} ve 5.8 µm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonunun PAH karışımını daha iyi ayırdığı anlaşılmıştır.

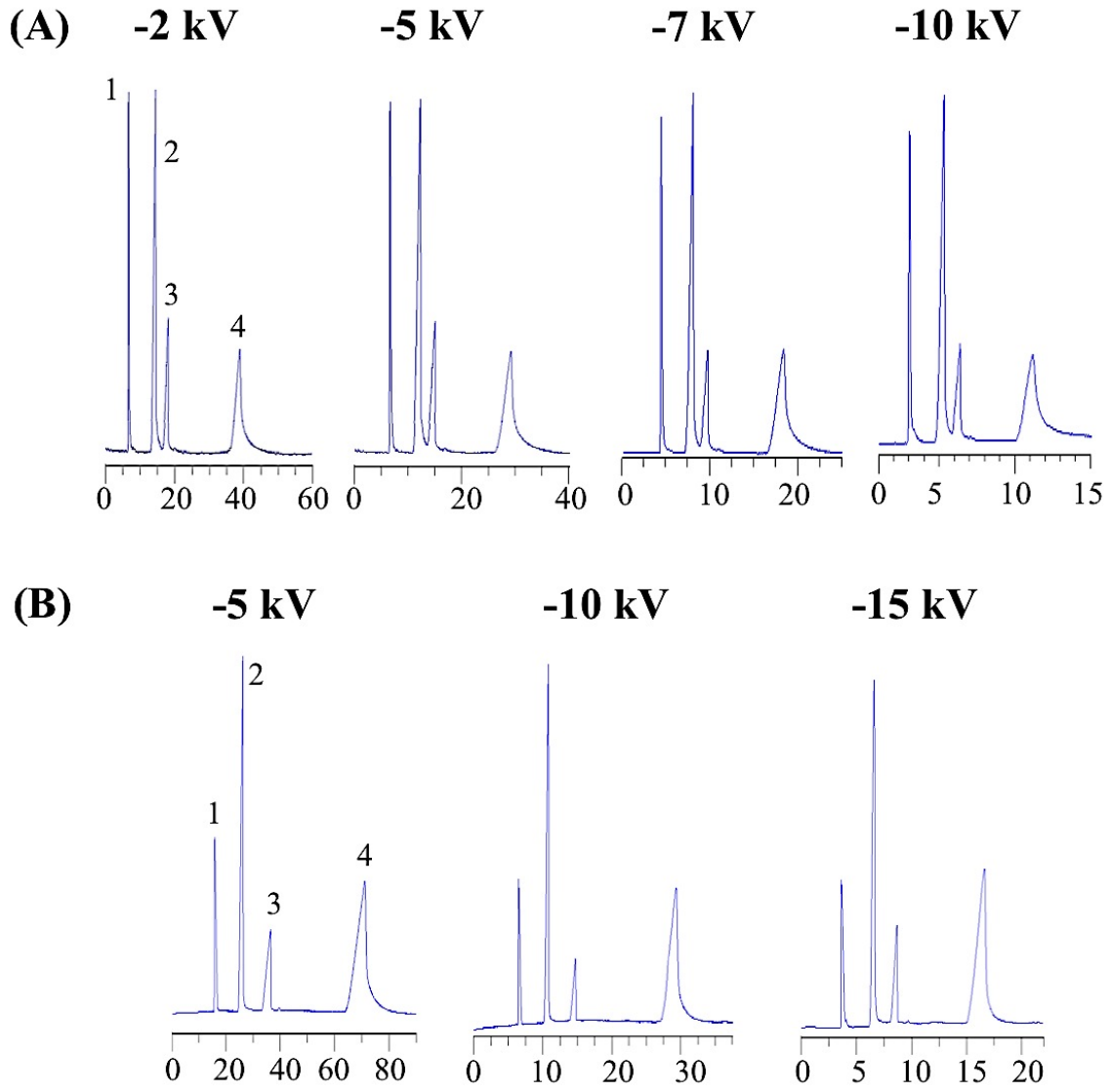


Şekil 4.60. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.61. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak PAH karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. ACN/5 mM pH 2.5 tampon: 25/75, HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, Uygulanan voltaj: -15 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 214 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler ile farklı voltaj değerlerinde elde edilen nükleotid-nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.62.'de gösterilmiştir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.35.'de verilmiştir. Şekil 4.62.'deki kromatogramlardan görüldüğü gibi PEI ile türevlendirilen ve farklı monomer derişimleri ile sentezlenen her iki monolitik kolonla da nükleosid-nükleotit karışımı -2 kV ile -15 kV değerleri aralığında başarılı bir şekilde ayrılmıştır. % 50 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda, voltaj değerinin -2 kV'den -10 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 50 dakikadan 15 dakikaya inmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen monolitik kolonda ise voltaj değerinin -5 kV'den -15 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 80 dakikadan 20 dakikaya kadar kısaltılabilmektedir. % 60 monomer derişimi ile sentezlenmiş PEI bağlı bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon kullanılarak elde edilen pik çözünürlük değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.



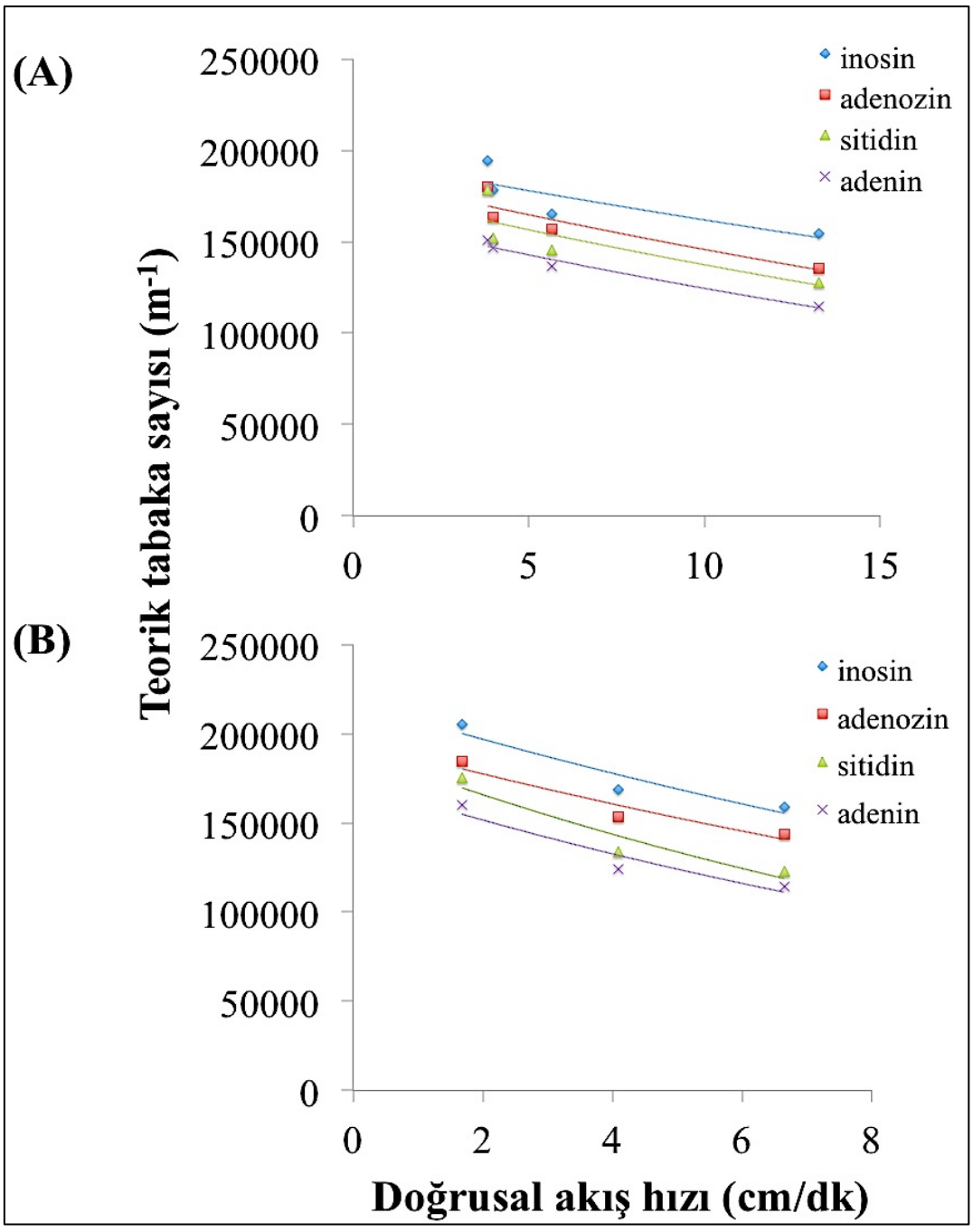
Şekil 4.62. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleosid-nükleotit karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap, Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin.

Çizelge 4.35. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak nükleotid-nükleosid karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri

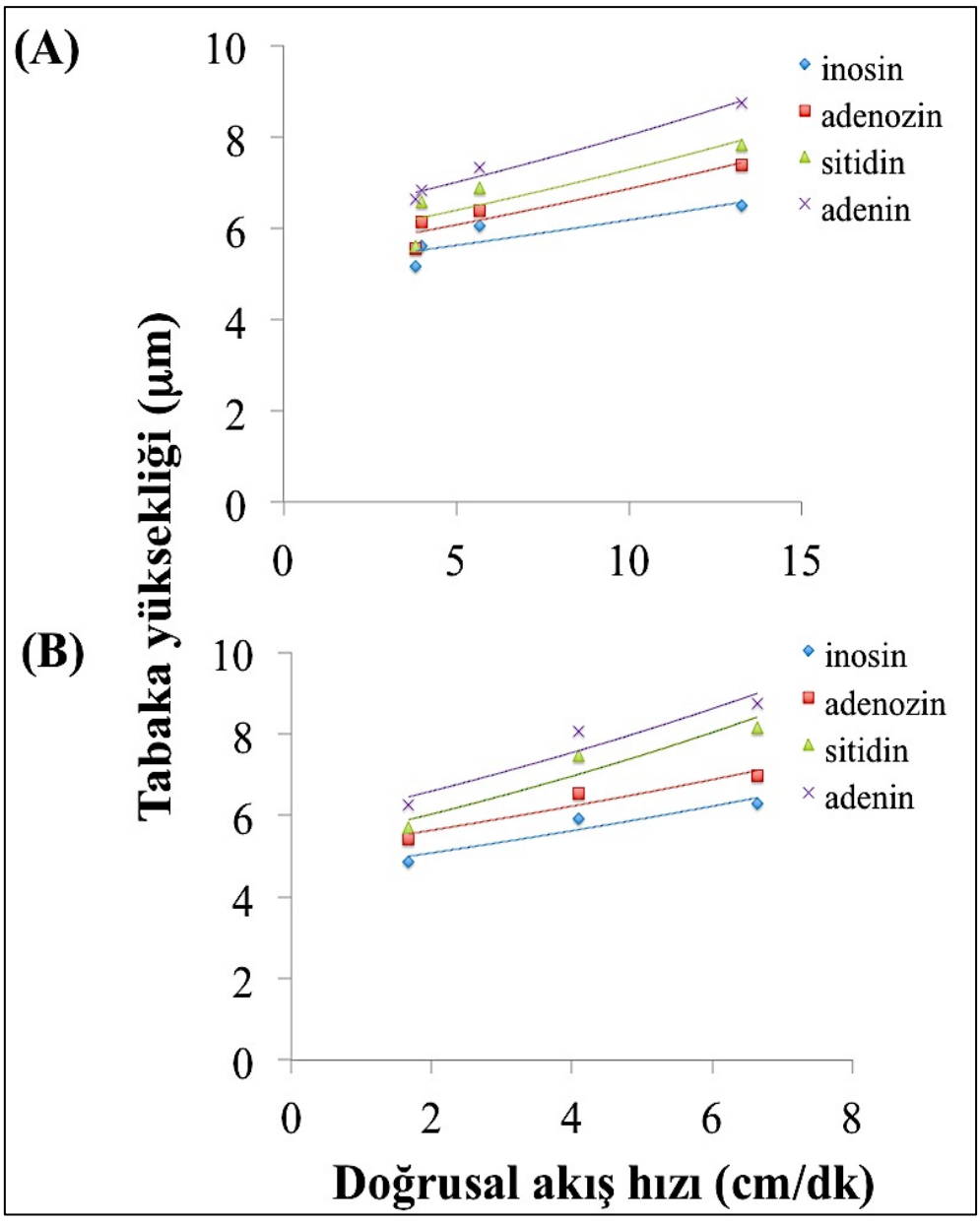
		Pik çözünürlüğü		
HPMA-Cl (% v/v)	**Voltaj (kV)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**
50	-2	4.53	1.67	4.52
50	-5	4.41	1.61	4.25
50	-7	4.29	1.56	3.94
50	-10	4.11	1.51	3.87
60	-5	4.63	4.57	4.84
60	-10	4.58	4.21	4.25
60	-15	4.24	4.10	4.04

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: % 50 HPMA-Cl derişimi: 30/70 ACN/10 mM pH 2.5 tampon, % 60 HPMA-Cl derişimi: 25/75 ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 260 nm. Elüsyon sırası: (1) inosin, (2) adenozin, (3) sitidin, (4) adenin.

Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.63. ve 4.64'de verilmiştir. Tiyoüre analiti kullanılarak % 50 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği sırasıyla 194.000 m^{-1} ve 5.1 µm olarak hesplanmıştır. % 60 monomer derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile bu değerler 205.000 m^{-1} ve 4.8 µm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre % 60 monomer derişimi ile sentezlenen kolonunun PAH karışımını daha yüksek verim ile ayırdığı görülmüştür.

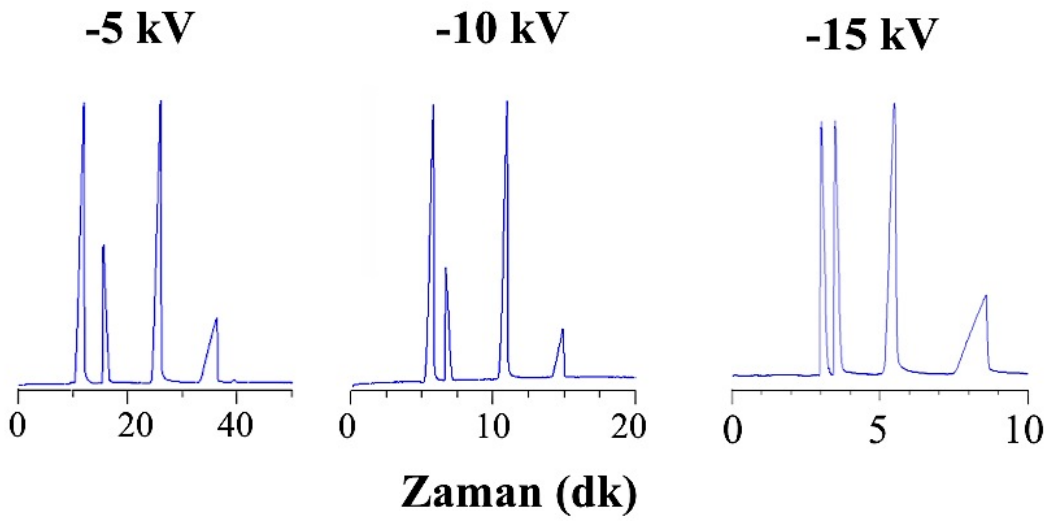


Şekil 4.63. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleotid-nükleosid karışımının teorik tabaka sayısının doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 μm iç çap.



Şekil 4.64. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleotid-nükleosid karışımının tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): (A) 50, (B) 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: (A) 30/70, (B) 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

Şekil 4.65.'de ve Çizelge 4.36.'da % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar ve bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri verilmektedir. Çizelge 4.36.'da elde edilen çözünürlük değerlerine bakıldığında, iyi bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin tüm voltaj değerlerinde sağlandığı ve artan voltaj değeri ile önemli bir düşmenin meydana gelmediği görülmektedir. Sentezlenen monolitik kolonda voltaj değerinin -5 kV'den -15 kV'ye çıkarılması ile analiz süresi 40 dakikadan 10 dakikaya kadar kısaltılabilmektedir. Bu sonuçlar farklı voltaj değerleri ve 30/70 ACN/tampon oranı ile nükleosid karışımının elektrokromatografik ayrımının başarıyla yapıldığını göstermektedir. Teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.66.'da verilmiştir. % 60 HPMA-Cl derişimi ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolonu ile en yüksek teorik tabaka sayısı ve en düşük tabaka yüksekliği sırasıyla 188.000 m^{-1} ve 5.3 µm olarak bulunmuştur.

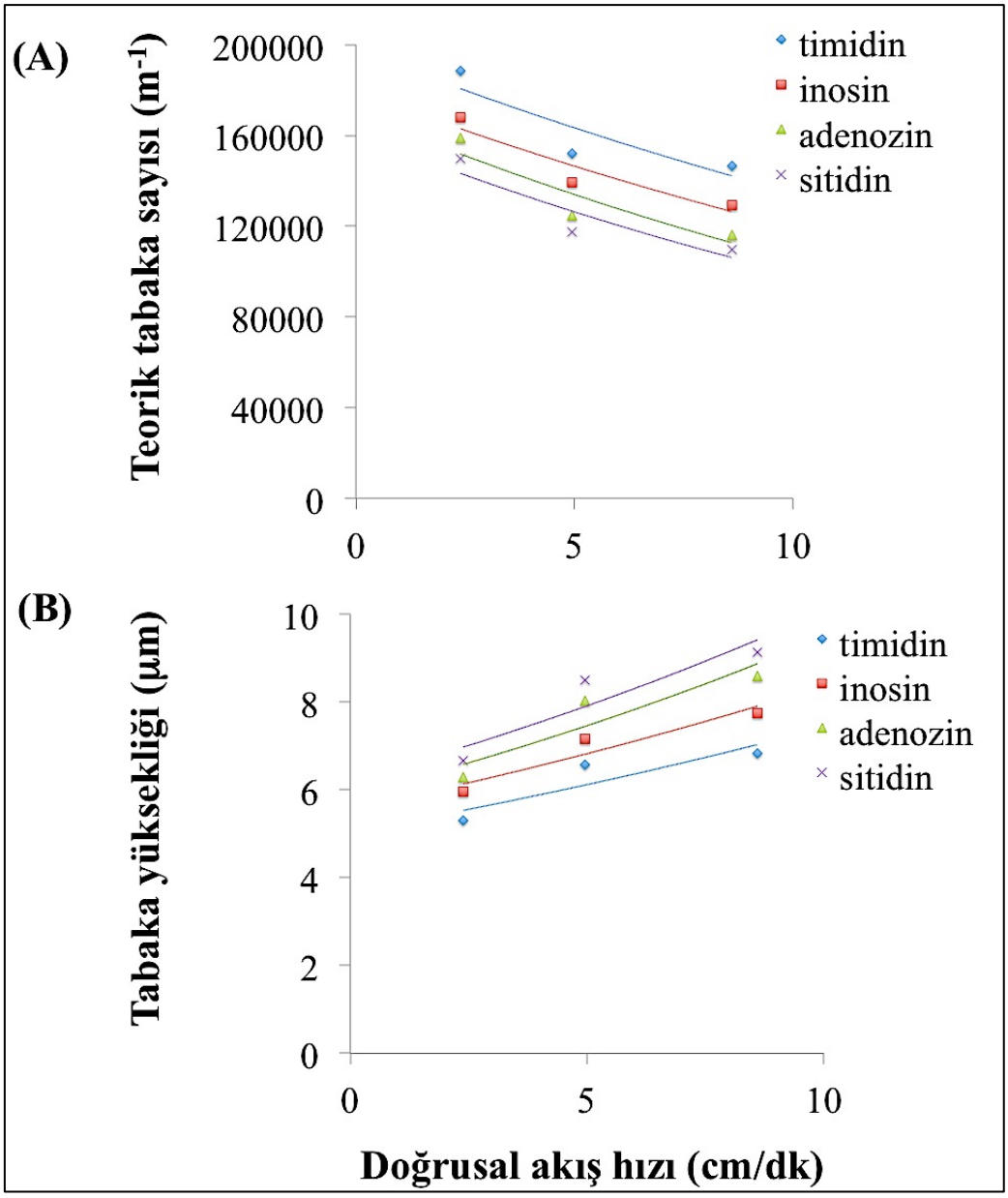


Şekil 4.65. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitlerin farklı voltaj değerleri kullanılarak elde edilen nükleosid karışımına ait elektrokromatogramlar. HPMA-Cl derişimleri (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.

Çizelge 4.36. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak nükleosid karışımının ayrımında farklı voltaj değerlerinde[a] elde edilen elde edilen pik çözünürlük değerleri

		Pik çözünürlüğü		
HPMA-Cl (% v/v)	**Voltaj (kV)**	**R(2/1)**	**R(3/2)**	**R(4/3)**
60	-5	3.73	4.67	4.54
60	-10	3.46	4.33	4.15
60	-15	3.24	4.03	3.92

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: 25/75 ACN/10 mM pH 2.5 tampon, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap, UV dedektör: 260 nm. Elüsyon sırası: (1) timidin, (2) inosin, (3) adenozin, (4) sitidin.



Şekil 4.66. Farklı HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenen PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonları kullanılarak nükleosid karışımının (A) teorik tabaka sayısı (B) tabaka yüksekliğinin doğrusal akış hızı ile değişimi. HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60, ACN/10 mM pH 2.5 tampon: 25/75, Uygulanan voltaj: -10 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3s, DAD dedektör 260 nm, Kolon boyutu: 270 mm x100 µm iç çap.

4.4.4. Katyonik Polimer Bazlı Monolitlerin Kromatografik Performanslarının Literatür Çalışmaları ile Kıyaslanması

Bu bölümde sentezlenen katyonik kolonların elektrokromatografik performanslarının literatür ile karşılaştırılması yapılmıştır. Farklı araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı monomerler kullanılarak elde edilen katyonik polimer bazlı monolitik kolonlar ile ulaşılan tabaka sayıları Çizelge 4.37.'de verilmiştir. Bu değerler ayırma verimi yönünden önerilen monomer ile sentezlenen ve PEI ile modifiye edilmiş kolonların literatürde mevcut monolitler ile yarışabilir nitelikte olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.37. Katyonik polimer bazlı monolitlerin kromatografik performanslarının literatür çalışmaları ile kıyaslanması

Kolon	Analit	Tabaka sayısı (m^{-1})	Referans
Poli(NAPM-co-EDMA)	Tiyoüre	150000	[159]
(250 mm x100 µm iç çap)	Toluen	115000	[159]
	Fenol	65300	[159]
	İnosin	9000	[159]
	Sitidin	8500	[159]
Poli(DMAEMA-co-HEMA-co-EDMA)	Fenol	25300	[167]
(350 mm x100 µm iç çap)			
Poli(OMA-co-SPMA-co-EDMA)	Tiyoüre	128200	[168]
(300 mm x100 µm iç çap)	Propilbenzen	70700	[168]
	Pentilbenzen	69500	[168]
	Adenosin	21350	[168]
	Adenin	11390	[168]

Poli(AETA-co-PEDAS)	Benzen	210000	[169]
(250 mm x100 µm iç çap)	Etilbenzen	185000	[169]
	Bütilbenzen	100000	[169]
	Pentilbenzen	72000	[169]
PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA)	Tiyoüre	195000	Bu çalışma
HPMA-Cl derişimi (%v/v): 50	Fenol	72000	Bu çalışma
(270 mm x100 µm iç çap)	İnosin	194000	Bu çalışma
	Adenosin	148000	Bu çalışma
PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA)	Tiyoüre	183000	Bu çalışma
HPMA-Cl derişimi (%v/v): 60	Fenol	95000	Bu çalışma
(270 mm x100 µm iç çap)	İnosin	205000	Bu çalışma
	Adenosin	169000	Bu çalışma

NAPM: N-(3-Aminopropil) metakrilamid hidroklorür, EDMA: Etilen dimetakrilat, DMAEMA: 2-(N,N-dimetilamino)etil metakrilat, HEMA: 2-hidroksietil metakrilat OMA: Oktadesil metakrilat, SPMA: 3-sülfopropil metakrilat AETA: 2-(Akriloksi)]etiltirimetilamonyum metil sülfat, PEDAS: Pentaeritrol Diakrilat Monostearat, HPMA-Cl: 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat.

4.4.5. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları

Kromatografik çalışmaların son bölümünde, sentezlenen monolitik kolonların kararlılığını test etmek amacıyla analizden analize ve kolondan kolona tekrarla-nabilirlik testleri yapılmıştır. Bu amaçla alkilbenzen türevleri günde dört kez kolona enjekte edilmiş ve analitlerin alıkonma süreleri kaydedilmiştir. Ayrıca aynı şartlarda ve modifikasyon koşullarında 3 paralel kolon hazırlanmış ve elektrokromatografik analizleri yapılmıştır. Farklı monomer oranları ile sentezlenmiş ve PEI ile modifiye edilmiş HPMA-Cl bazlı monolitik kolonlar ile alkilbenzen türevlerinin ayrımında analizden analize ve kolondan kolona hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.38.'de verilmektedir. Çizelge 4.38.'de görüldüğü üzere alıkonma süresi temel alınarak hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS); analizden

analize % 0.62-0.91 aralığında, kolondan kolona ise % 0.85-1.40 aralığında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar aynı sentez koşullarında elde edilen farklı kolonlar ile tekrarlanabilirliği yüksek kromatografik analiz yapılabildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar PEI ile modifiye edilmiş kolonların başarılı bir şekilde kapiler elektrokromatografi sisteminde kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.38. PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonlar kullanılarak analizden analize ve kolondan kolona elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri

Bileşen	**Analizden analize tekrarlanabilirlik (BSS%)**	**Kolondan kolona tekrarlanabilirlik (BSS%)**
	HPMA-Cl derişimi (% v/v): 50	
Tiyoüre	0.62	0.85
Benzaldehit	0.75	0.96
Benzen	0.72	1.21
Toluen	0.67	1.19
Etilbenzen	0.83	1.12
Propilbenzen	0.91	1.02
Bütilbenzen	0.83	1.20
Pentilbenzen	0.64	1.33
	HPMA-Cl derişimi (% v/v): 60	
Tiyoüre	0.57	0.75
Benzaldehit	0.65	0.91
Benzen	0.76	1.17
Toluen	0.61	1.39
Etilbenzen	0.69	1.18
Propilbenzen	0.73	1.22
Bütilbenzen	0.91	1.40
Pentilbenzen	0.64	1.26

a: Kromatografik koşullar: Mobil faz: ACN/5 mM pH 2.5 tamponu (% v/v): 35/65 Uygulanan voltaj: -20 kV, Enjeksiyon koşulları: -10 kV, 3 s, Kolon boyutu: 270 mmx 100 µm iç çap, DAD dedektör: 200 nm.

5. SONUÇLAR

- Tez kapsamında, yeni bir reaktif polimerik monomer, 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl) kullanılarak kapiler monolitlerin blok kopolimerizasyonu ile sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen monolitik kolonlar, yapısındaki ‘‘kloropropil’’ grubunun reaktif özelliği kullanılarak basit ve tek basamaklı reaksiyonlar ile anyonik ve katyonik kromatografik ligandları içeren formlara kolayca dönüştürülmüş ve kolonların CEC sisteminde elektro-kromatografik performansları incelenmiştir.

- Kolonlar silanize edilmiş 100 μm iç çapa sahip silika kolonlarda, termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir.

- Tez çalışmasının ilk kısmında, monolit sentezi için farklı zincir uzunluklarına ve polariteye sahip çapraz bağlayıcılar, gliserol dimetakrilat (GDMA), etilen dimetakrilat (EDMA) ve bütandiol dimetakrilat (BDDA) kullanılarak poli(HPMA-Cl) bazlı kapiler monolitler üretilmiştir.

- Farklı İso-PrOH/Dec-OH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-GDMA), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolitler sodyum bisülfit ile etkileştirilerek, sülfonik asit grubunun bisülfit ve kloropropil grupları arasındaki direkt reaksiyon ile polimerik yapıya bağlanması sağlanmıştır. Böylece anyonik ligand içeren elektrokromatografik sabit fazlar elde edilmiştir.

- Türevlendirme öncesi ve sonrası, SEM görüntüleri, geri basınç ve geçirgenlik değerleri göz önüne alınarak, % 31.3 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-GDMA) monolit, % 50 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit ve % 37.5 İso-PrOH derişimi ile sentezlenmiş poli(HPMA-Cl-co-BDDA) monolit sülfonik asit içeren elektrokromatografik sabit faz sentezi amacıyla çıkış materyali olarak seçilmiştir.

- Sülfonik asit grubu içeren farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenmiş kolonlar kullanılarak, kapiler elektrokromatografi sisteminde ters faz modunda alkilbenzen ve fenol türevlerinin ayrımı denenmiştir.

- Kolon performansları kıyaslandığında, sülfonik asit bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitik kolonunun en yüksek kromatografik ayırma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür.

- Tez çalışmasının ikinci kısmında farklı monomer derişimleri ile sentezlenen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler, PEI ile türevlendirilerek monolit üzerinde katyonik formda amin gruplarının oluşumu sağlanmıştır.

- Türevlendirme öncesi ve sonrası SEM görüntüleri, geri basınç ve geçirgenlik değerleri göz önüne alınarak PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler için % 50 ve 60 HPMA-Cl derişimleri ile sentezlenmiş monolitlerin elektrokromatografik performans testlerinde kullanılmasına karar verilmiştir.

- PEI bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) monolitler kapiler elektrokromatografi sisteminde ters faz modunda alkilbenzen, fenol, çoklu halkasal aromatik hidrokarbonlar, nükleosid-nükleotit ve nükleosid karışımlarının kromatografik ayrımında başarıyla kullanılmıştır.

- Bu çalışma ile literatürde poliakrilat formunda, hidrofilik özelliğe sahip, reaktif kloropropil grubu içeren yeni bir monolit türü geliştirilmiştir. Böylece literatürdeki yaygın reaktif monolitik yapılar olan poli(klorometilstiren-co-divinilbenzen) ve poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) formlarına alternatif ve fonksiyonel gruplu elektrokromatografik sabit sentezinde kullanılabilecek yeni bir çıkış materyali elde edilmiştir. Bu çıkış materyali hem anyonik, hem de katyonik özelliğe sahip elektrokromatografik sabit fazların sentezinde başarıyla kullanılmıştır. Sentezlenen sabit fazlar ile, literatürde mevcut benzerleri ile aynı büyüklük değerine sahip (yaklaşık 200.000 m^{-1}) kromatografik ayırma verimleri elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Colon, L.A., Burgos, G., Maloney, T.D., Cintron, J.M., Rodriguez, R.L., Recent progress in capillary electrochromatography, *Electrophoresis,* 21, 3965-3993, **2000**.

[2] Legido-Quigley, C., Marlin, N.D., Melin, V., Manz, A., Smith, N.W., Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science, *Electrophoresis*, 24, 917-944, **2003**.

[3] Preinerstorfer, B., Lindner, W., Lammerhofer, M., Polymethacrylate-type monoliths functionalized with chiral amino phosphonic acid-derived strong cation exchange moieties for enantioselective nonaqueous capillary electrochromatography and investigation of the chemical composition of the monolithic polymer, *Electrophoresis,* 26, 2005-2018, **2005.**

[4] Canto-Mirapeix, A., Herrero-Martinez, J.M., Mongay-Fernandez, C., Simo-Alfonso, E.F., Preparation and evaluation of butyl acrylate-based monolithic columns for CEC using ammonium peroxodisulfate as a chemical initiator, *Electrophoresis*, 29, 3866-3874, **2008**.

[5] Tian, Y., Yang, F., Yang, X., Fu, E., Xu, Y., Zeng, Z., Macrocyclic polyamine-modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 29, 2293-2300, **2008**.

[6] Plieva, F.M., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Characterization of polyacrylamide based monolithic columns, *Journal of Separation Science,* 27, 828-836, **2004**.

[7] Liu, Z.S., Xu, Y.L., Yan, C., Gao, R., Mechanism of molecular recognition on molecular imprinted monolith by capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1087, 20-28, **2005.**

[8] Augustin, V., Jardy, A., Gareil, P., Hennion, M.C., In situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: Study of polymerization conditions. *Journal of Chromatography A*, 1119, 80-87, **2006**.

[9] Ngola, S.M., Fintschenko, Y., Choi, W.Y., Shepodd, T.J., Conduct-as-cast polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 73, 849-856, **2001**.

[10] Kornysova, O., Maruska, A., Owens, P.K., Erickson, M., Non-particulate (continuous bed or monolithic) acrylate-based capillary columns for reversed-phase liquid chromatography and electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1071, 171-178, **2005**.

[11] Waguespack, B.L., Hodges, S.A., Bush, M.E., Sondergeld, L.J., Bushey, M.M., Capillary electrochromatography column behavior of butyl and lauryl acrylate porous polymer monoliths, *Journal of Chromatography A*, 1078, 171-180, **2005**.

[12] Eeltink, S., Rozing, G.P., Schoenmakers, P.J., Kok, W.T., Practical aspects of using methacrylate-ester-based monolithic columns in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1109, 74-79, **2006**.

[13] Jiang, T., Jiskra, J., Claessens, H.A., Cramers, C.A., Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 923, 215-227, **2001**.

[14] Sondergeld, L.J., Bush, M.E., Bellinger, A., Bushey, M.M., Butyl acrylate porous polymer monoliths in fused-silica capillaries for use in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1004, 155-165, **2003**.

[15] Barrioulet, M.P., Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J.L., Development of acrylate-based monolithic stationary phases for electrochromatographic separations, *Electrophoresis,* 26, 4104-4115, **2005**.

[16] Grafnetter, J., Coufal, P., Tesarova, E., Suchankova, J., Bosakova, Z., Sevcık, J., Optimization of binary porogen solvent composition for preparation of butyl methacrylate monoliths in capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*,1049, 43-49, **2004**.

[17] Bedair, M., El Rassi, Z., Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases- III. Evaluation of the electrochromatographic retention of neutral and charged solutes on cationic stearyl-acrylate monoliths and the separation of water-soluble proteins and membrane proteins, *Journal of Chromatography A*, 1013, 47-56, **2003**.

[18] Okanda, F.M., El Rassi, Z., Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 4. Preparation of neutral stearyl-acrylate monoliths and their evaluation in capillary electrochromatography of neutral and charged small species as well as peptides and proteins, *Electrophoresis*, 26, 1988-1995, **2005**.

[19] Karenga, S., El Rassi, Z., Naphthyl methacrylate-based monolithic column for RP-CEC via hydrophobic and pi interactions, *Electrophoresis,* 31, 991-1002, **2010**.

[20] Karenga, S., El Rassi, Z., Controlling retention, selectivity and magnitude of EOF by segmented monolithic columns consisting of octadecyl and naphthyl monolithic segments - applications to RP-CEC of both neutral and charged solutes, *Electrophoresis*, 32,1033-1043, **2011**.

[21] Buszewski, B., Szumski, M., Study of bed homogenity of methacrylate-based monolithic columns for micro-HPLC and CEC, *Chromatographia*, 60, 261-267, **2004**.

[22] Ueki, Y., Umemura, T., Iwashita, Y., Odake, T., Haraguchi, H., Tsunoda, K., Preparation of low flow-resistant methacrylate-based monolithic stationary phases of different hydrophobicity and the application to rapid reversed-

phase liquid chromatographic separation of alkylbenzenes at high flow rate and elevated temperature, *Journal of Chromatography A*, 1106, 106-111, **2006**.

[23] Zhang, K., Gao, R.Y., Yan, C., Zhang, Z.C., Wang, Q.S., Preparation and porous property of C-14-monolithic column for capillary electrochromatography, *Chromatographia,* 61, 55-60, **2005**.

[24] Wang, X., Lin, X., Xie, Z., Giesy, J.P., Preparation and evaluation of a neutral methacrylate-based monolithic column for hydrophilic interaction stationary phase by pressurized capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*,1216, 4611-4617, **2009**.

[25] Lerma-Garcia, M.J., Vergara-Barberan, M., Herrero-Martínez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Acrylate ester-based monolithic columns for capillary electrochromatography separation of triacylglycerols in vegetable oils, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7528-7533, **2011**.

[26] Lin, J., Liu, S.F., Lin, J., Lin, X.C., Xie, Z.H., Novel highly hydrophilic methacrylate-based monolithic column with mixed-mode of hydrophilic and strong cation-exchange interactions for pressurized capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 4671-4677, **2011**.

[27] Lin, X.C., Li, Y.P., Xu, D.J., Yang, C.M., Xie, Z.H., Rapid capillary electrochromatographic profiling of phytohormones on a hydrophilic interaction/strong anion-exchange mixed-mode monolith, *Analyst*, 138, 635-641, **2013**.

[28] Lin, X.C., Lin, J., Sun, Y.Y., Li, Y.P., Xie, Z.H., A facile versatile polymeric monolith for multiple separations, *Analyst*, 138, 771-774, **2013**.

[29] Zhang, S., Huang, X., Zhang, J., Horvath, C., Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith, *Journal of Chromatography A*, 887, 465-477, **2000**.

[30] Bedair, M., El Rassi, Z., Affinity chromatography with monolithic capillary columns - I. Polymethacrylate monoliths with immobilized mannan for the separation of mannose-binding proteins by capillary electrochromatography and nano-scale liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 177-186, **2004**.

[31] Dong, X., Dong, J., Ou, J., Zhu, Y., Zou, H., Capillary electrochromatography with zwitterionic stationary phase on the lysine-bonded poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary column, *Electrophoresis*, 27, 2518-2525, **2005**.

[32] Li, Y.J., Liang, G.H., Lv, R.J., Zhang, C.Y., Zhang, L.Y., Fu, H.G., Zhang, W.B., One-step preparation and properties of allyl-β-cyclodextrin chiral monolithic capillary electrochromatography column, *Science Sinica Chimica*, 40, 1682-1687, **2010**.

[33] Engelke, J.L., Strain, H.H., Electrical mobility of phosphate ions in paper electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 26, 1872-1874, **1954**.

[34] Mould, D.L., Synge, R.L., Separations of polysaccarides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes, *Biochemistry Journal*, 58, 571-585, **1954**.

[35] Bundschuh, G. J., Preparative separation of protein mixtures using sephadex gel filtration with simultaneous application of continuous current (electroretardation-filtration), *Journal of Chromatography A*, 56, 241-252, **1971**.

[36] Salak J., Roch B., Isolation of immunoglobulin m from human serum by gel chromatography and electrochromatography on a column of sephadex g-200, *Journal of Chromatography A*, 72, 459-463, **1972**.

[37] Pretorius, V., Hopkins, B.J., Schieke, J.D., Electro-osmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 99, 23-30, **1974**.

[38] Jorgenson, J.W., Lucas, K.D., Zone *Electrophoresis* in open tubular glass capillaries, *Analytical Chemistry*, 53, 1298-1302, **1981**.

[39] Bartle, K.D., Cikalo M.G., Robson M.M., An Introduction to Capillary Electrochromatography. *Capillary Electrochromatography*, (eds: Bartle, K.D., Myers, P.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-21, **2001**.

[40] Smith N.W., Evans M.B., The analysis of pharmaceutical compounds using electrochromatography, *Chromatographia*, 38, 649-657, **1994**.

[41] Smith N.W., Evans M.B., The efficient analysis of neutral and highly polar pharmaceutical compounds using reversed-phase and ion-exchange electrochromatography, *Chromatographia*, 41, 197-203, **1995**.

[42] Knox, J.H., Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems, *Journal of Chromatography A*, 680, 3-13, **1994**.

[43] Euerby, M.R., 2.9. Capillary electrochromatography (CEC): 2.9.1 Separation, detection and determination of impurities by CEC, *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 4, 346-358, **2000**.

[44] Jiskra, J., Claessens, H.A., Cramers, C.A., Stationary and mobile phases in capillary electrochromatography (CEC), *Journal of Separation Science*, 26, 1305-1330, **2003**.

[45] Xie, R., Oleschuk, R., Photoinduced polymerization for entrapping ofoctadecylsilane microsphere columns for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 79, 1529-1535, **2007**.

[46] Aydoğan C., *Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi ve Ters Faz Sıvı Kromatografisi İçin Yeni Polimetakrilat Bazlı Monolitik Kapiler Kolonların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Biyokromatografide Kullanımı*, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.

[47] Cikalo, M.G., Bartle, K.D., Myers, P., Influence of the electrical double-layer on electroosmotic flow in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 836, 35-51, **1999**.

[48] Bartle, K.D., Myers, P., Theory of capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 916, 3-23, **2001**.

[49] Horvath, C., Melander, W.R., Chapter 3 Theory of chromatography, *Journal of Chromatography Library*, 22, A27-A135, **1983**.

[50] Horvath, C., Lin, H.J., Band spreading in liquid-chromatography- general plate height equation and a method for evaluation of individual plate height contributions, *Journal of Chromatography*, 149, 43-70, **1978**.

[51] Adam, T., Lüdtke, S., Unger, K.K., Packing and stationary phase design for capillary electroendosmotic chromatography (CEC), *Chromatographia*, 49, S49-S55, **1999**.

[52] Lüdtke, S., Adam, T., Unger K.K., Application of 0.5-µm porous silanized silica beads in electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 786, 229-235, **1997**.

[53] Roulin, S., Dmoch, R., Carney, R., Bartle, K.D., Myers, P., Euerby, M.R., Johnson, C., Comparison of different packing methods for capillary electrochromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 887, 307-312, **2000**.

[54] Smith, N.W., Carter-Finch, A.S., Electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 892, 219-255, **2000**.

[55] Euerby, M.R., Johnson, C.M., Smyth, S.F., Gillott, N., Barrett, D.A., Shaw, P.N., Solvent and stationary phase selectivity in capillary electrochromatography method development: Comparison of C18, C8, and phenyl-bonded phases for the separation of a series of substituted barbiturates, *Journal of Microcolumn Separations*, 11, 305-311, **1999**.

[56] Wright, P.B., Lister, A.S., Dorsey, J.G., Behavior and use of nonaqueous media without supporting electrolyte in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 69, 3251-3259, **1997**.

[57] Chaiyasut, C., Takatsu, Y., Kitagawa, S., Tsuda, T., Estimation of the dissociation constants for functional groups on modified and unmodified silica gel supports from the relationship between electroosmotic flow velocity and pH., *Electrophoresis*, 22, 1267-1272, **2001**.

[58] Govindaraju, K., Ahmed, A., Lloyd, D.K., Electroosmotic flow mobilities in open and packed capillaries with spermine and other amine flow modifiers, *Journal of Chromatography A*, 768, 3-8, **1997**.

[59] Kitagawa, S., Tsuda, T., Effects of pH and organic solvent on chromatographic behavior in capillary electrochromatography, *Journal of Microcolumn Separations*, 6, 91-96, **1994**.

[60] McKeown, A.P., Euerby, M.R., Johnson, C.M., Koeberle, M., Lomax, H., Ritchie, H., Ross, P., An evaluation of unbonded silica stationary phases for the separation of basic analytes using capillary electrochromatography, *Chromatographia*, 52, 777-786, **2000**.

[61] Dittmann, M.M., Rozing, G.P., Capillary electrochromatography — a high-efficiency micro-separation technique, *Journal of Chromatography A*, 744, 63-74, **1996**.

[62] Engelhardt, H., Hafner, F.T., Porous and non-porous stationary phases for capillary electrochromatography under conditions of reversed phase chromatography, *Chromatographia*, 52, 769-776, **2000**.

[63] Altria K.D., Smith N.W., Turnbull, C.H., Analysis of acidic compounds using capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 717, 341-353, **1998**.

[64] Kitagawa, S., Tsuda, T., Estimation of the dissociation constant for unreacted silanol groups on the surface of ODS-silica from the relationship between ph and electroosmotic flow velocity in capillary electrochromatography, *Journal of Microcolumn Separations*, 7, 59-64, **1995**.

[65] Gillott, N.C., Barrett, D.A., Shaw, P.N., Euerby, M.R., Johnson, C.M., Separation of pharmaceutical bases from neutral and acidic components by capillary electrochromatography, *Analytical Communications*, 35, 217-220, **1998**.

[66] Behnke, B., Johansson, J., Bayer, E., Nilsson, S., Fluorescence imaging of frit effects in capillary separations, *Electrophoresis*, 21, 3102-3108, **2000**.

[67] Mistry, K., Cortes, H., Meunier, D., Schmidt, C., Feibush, B., Grinberg, N., Krull, I., Nonaqueous Capillary Electrochromatographic Separation of Synthetic Neutral Polymers by Size Exclusion Chromatography Using Polymeric Stationary Phases, *Analytical Chemistry*, 74, 617-625, **2002**.

[68] Liu, Y., Pietrzyk, D.J., Capillary electrochromatography with fused-silica capillaries packed with copolymeric reversed-phase adsorbent and ion exchangers, *Analytical Chemistry***,** 72, 5930-5938, **2000**.

[69] Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Frechet, J.M.C., Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. fine control of porous properties and surface chemistry, *Analytical Chemistry*, 70, 2288-2295, **1998**.

[70] Knox, J.H., Grant, I.H., Miniaturisation in pressure and electroendosmotically driven liquid chromatography: Some theoretical considerations, *Chromatographia*, 24, 135-143, **1987**.

[71] Knox, J.H., Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation, *Chromatographia*, 26, 329-337, **1988**.

[72] Neue U.D., *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, New York, **1997**.

[73] Tang, Q., Lee, M.L., Monolithic columns prepared from particles. *Monolithic Materials — Preparation, Properties and Applications,* (eds: Svec, F., Tennikova, T.B., Deyl, Z.), Elsevier, 197-211, **2003**.

[74] Unger, K.K., Skudas, R., Schulte, M.M., Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, *Journal of Chromatography A*, 1184, 393-415, **2008**.

[75] Zhang, S., Huang, X., Yao, N., Horvath, C., Preparation of monodisperse porous polymethacrylate microspheres and their application in the capillary electrochromatography of macrolide antibiotics, *Journal of Chromatography A*, 948, 193-201, **2002**.

[76] *Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns*, MAC-MOD Analytical, Chadds Ford, PA, **2008**.

[77] Neue U.D., Stationary phase characterization and method development, *Journal of Separation Science,* 30, 1611-1627, **2007**.

[78] Engelhardt, H., Jungheim, M., Comparison and characterization of reversed phases, *Chromatographia*, 29, 59-68, **1990**.

[79] Bartle, K.D., Carney, R.A., Cavazza, A., Cikalo, M.G., Myers, P., Robson, M.M., Roulin, S.C.P., Sealey, K., Capillary electrochromatography on silica columns: factors influencing performances, *Journal of Chromatography A*, 892, 279-290, **2000**.

[80] Turiel, E., Martin-Esteban, A., Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography, *Journal of Separation Science*, 28, 719-728, **2005**.

[81] Altria, K.D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 856, 443-463, **1999**.

[82] Miksik, I., Sedlakova, P., Capillary electrochromatography of proteins and peptids, *Journal of Separation Science*, 30, 1686-1703, **2007**.

[83] Kapnissi-Christodoulou, C.P., Zhu, X., Warner, I.M., Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 24, 3917-3934, **2003**.

[84] Chen, J.L., Comparision of succinate- and phthalate-functionalized etched silica hydride phases for open-tubular capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 6236-6244, **2009**.

[85] Cheong, W.J., Ali, F., Kim, Y.S., Lee, J.W., Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science, *Journal of Chromatography A*, 1308, 1-24, **2013**.

[86] Xu, L., Sun, Y., Protein separation by open tubular CEC employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows, *Journal of Chromatography A*, 1183, 129-134, **2008**.

[87] Guihen, E., Glennon, J.D., Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 67-81, **2004**.

[88] Huang, X., Zhang, J., Horvath, C., Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns, *Journal of Chromatography A*, 858, 91-101, **1999**.

[89] Forster, S., Kolmar, H., Altmaier, S., Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1265, 88-94, **2012**.

[90] Luo, Q., Yue, G., Valaskovic, G.A., Gu, Y., Wu, S.L., Karger, B.L., On-line 1D and 2D porous layer open tubular/LC-ESI-MS using 10-microm-i.d. poly (styrenedivinylbenzene) columns for ultrasensitive proteomic analysis, *Analytical Chemistry*, 79, 6174-6181, **2007**.

[91] Miyabe, K., Gulochon, G., Characterization of monolithic columns for HPLC, *Journal of Separation Science*, 27, 853-873, **2004**.

[92] Klodzinska E., Moravcova D., Jandera P., Buszewski B., Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations, *Journal of Chromatography A*, 1109, 51-59, **2006**.

[93] Kubin, M., Spacek, P., Chromecek, R., Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 32, 3881-3887, **1967**.

[94] Svec, F., Tennikova, T.B., Historical review. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, (eds: Svec, F., Tennikova, T.B., Deyl, Z.), Elsevier, Amsterdam, 1-14, **2003**.

[95] Tanaka, N., Motokawa, M., Kobayashi, H., Hosoya, K., Ikegami, T., Monolithic silica columns for capillary electrochromatography. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, (eds: Svec, F., Tennikova, T.B., Deyl, Z.), Elsevier, Amsterdam pp. 173-195, **2003**.

[96] Tanaka, N., Nagayama, H., Kobayashi, H., Ikegami, T., Hosoya, K., Monolithic silica columns for HPLC, micro-HPLC, and CEC, *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 111-116, **2000**.

[97] Liapis, A.I., Meyers, J.J., Crosser, O.K., Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths: Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *Journal of Chromatography A*, 865, 13-25, **1999**.

[98] Svec, F., Peters, E.C., Sykora, D., Frechet, J.M.J., Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 887, 3-29, **2000**.

[99] Smith, N.W., Jiang, Z., Developments in the use and fabrication of organic monolithic phases for use with high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184, 416-440, **2008**.

[100] Smith, J.H., Chromatographic Properties of Silica-Based Monolithic HPLC Columns, PhD Thesis, The Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, **2002**.

[101] Dulay, M.T., Quirino, J.P., Bennett, B.D., Kato, M., Zare, R.N., Photopolymerized Sol−Gel Monoliths for Capillary Electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 73, 3921-3926, **2001**.

[102] Jiang, Z., Smith, N.W., Ferguson, P.D., Taylor, M.R., Preparation and characterization of long alkyl chain methacrylate-based monolithic column for capillary electrochromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 39-45, **2007**.

[103] Buchmeiser, M.R., Polymeric monolithic materials: syntheses, properties, functionalization and applications, *Polymer*, 48, 2187-2198, **2007**.

[104] Eeltink, S., Svec, F., Recent advances in the control of morphology and surface chemistry of porouspolymer-based monolithic stationary phases and their application in CEC, *Electrophoresis*, 28, 137-147, **2007**.

[105] Hu, R., Dimonie, V.L., Sudol, E.D., El-Aasser, M.S., Monodisperse poly(butadiene/styrene) particles by dispersion polymerization, *Journal of Applied Polymer Science*, 55, 1411-1415, **1995**.

[106] Tanaka, N., Nagayama, H., Kobayashi, H., Ikegami, T., Hosoya, K., Monolithic silica columns for HPLC, micro-HPLC, and CEC, *Journal of High Resolution Chromatography*, 6, 965-970, **1999**.

[107] Hiroshi, Aoki., Tanaka, N., Kubo, T., Hosoya, K., Polymer-based monolithic columns in capillaryformat tailored by using controlled in situ polymerization, *Journal of Separation Science*, 32, 341-358, **2008**.

[108] Shu, X., Chen, L., Yang, B., Guan, Y., Preparation and characterization of long methacrylate monolithic column for capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1052, 205-209, **2004**.

[109] Coufal, P., Cihak, M., Suchankova, J., Tesarova, E., Bosakoa, Z., Stuik, K., Methacrylate monolithic columns of 320 μm I.D. for capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 946, 99-106, **2002**.

[110] Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Frechet, J.M.J., Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 69, 3646-3649, **1997**.

[111] Gusev, I., Huang, X., Horvath, C., Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 855, 273-290, **1999**.

[112] Huck, W., Bonn, G.K., Poly (styrene-divinylbenzene) based media for liquid chromatography, *Chemical Engineering Technology*, 28, 1457-1472, **2005**.

[113] Palm, A., Novotny, M.V., Macroporous Polyacrylamide/Poly (ethylene glycol) Matrixes as Stationary Phases in Capillary Electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 69, 4499-4507, **1997**.

[114] Soroush, M., Grady, M.C., Kalfas, G.A., Free-radical polymerization at higher temperatures: systems impacts of secondary reactions, *Computers and Chemical Engineering*, 32, 2155-2167, **2008**.

[115] Huo, Y., Schoenmarkers, P.J., Kok, W.T., Efficiency of methacrylate monolithic columns in reversed-phase liquid chromatographic separations, *Journal of Chromatography A*, 1175, 81-88, **2007**.

[116] Legido-Quigley, C., Marlin, N., Smith, N.W., Comparison of styrene–divinylbenzene-based monoliths and Vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis for protein analysis, *Journal of Chromatography*, 1030, 194-200, **2004**.

[117] Xie, S., Svec, F., Frechet, J.M.J., Preparation of porous hydrophilic monoliths: effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly(acrylamide-co-N,N-methylenebisacrylamide) monolithic rods, *Journal of Polymer Science Part A*, 35, 1013-1021, **2000**.

[118] Santora, B.P., Gagne, M.R., Moloy, K.G., Radu, N.S., Porogen and crosslinking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization 3, *Macromolecules*, 34, 658-661, **2001**.

[119] Nischang, I., Svec, F., Frechet, J.M.J, Effect of capillary cross-section geometry and size on the separation of proteins in gradient mode using monolithic poly (butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) columns, *Journal of Cromatography A*, 1216, 2355-2361, **2009**.

[120] Svec, F., Frechet, J.M.J., Rigid macroporous organic polymer monoliths prepared by free radical polymerization. *Monolithic Materials Preparation, Properties and Applications*, (eds: Svec, F., Tennikova, T.B., Deyl, Z.), Elsevier, 19-50, **2003**.

[121] Aoki, H., Tanaka, N., Kubo, T., Hosoya, K., Polymer based monolithic columns in capillary format tailored by using controlled in situ polymerization, *Journal of Separation Science*, 32, 341-358, **2009**.

[122] Xu, Z., Yang, L., Wang, Q., Different alkyl dimethacrylate mediated stearyl methacrylate monoliths for improving separation efficiency of typical alkylbenzenes and proteins, *Journal of Chromatography A*, 1216, 3098-3106, **2009**.

[123] Hemström, P., Nordborg, A., Irgum, K., Svec, F., Frechet, J.M.J, Polymer-based monolithic microcolumns for hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Separation Science*, 29, 25-32, **2006**.

[124] Vlakh, E.G., Tennikova, T.B., Preparation of methacrylate monoliths, *Journal of Separation Science*, 30, 2801-2813, **2007**.

[125] Zhang, S., Zhang, J., Horvath, C., Rapid separation of peptides and proteins by isocratic capillary electrochromatography at elevated temperature, *Journal of Chromatography A*, 914, 189-200, **2001**.

[126] Peterson, D.S., Rohr, T., Svec, F., Frechet, J.M.J., Dual-function microanalytical device by in situ photolithographic grafting of porous polymer monolith: integrating solid-phase extraction and enzymatic digestion for peptide mass mapping, *Analytical Chemistry*, 75, 5328-5335, **2003**.

[127] Zhang, S., Zhang, J., Horvath, C., Capillary electrochromatography of proteins with polymer-based strong-cation-exchanger microspheres, *Journal of Chromatography A*, 965, 83-92, **2002**.

[128] Rohr, T., Hilder, E.F., Donovan, J.J., Svec, F., Frechet, J.M.J., Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths, *Macromolecules*, 36, 1677-1684, **2003**.

[129] Belenkii, B.G., Monolithic stationary phases: yesterday, today, and tomorrow, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32, 323-332, **2006**.

[130] Geiser, L., Eeltink, S., Svec, F., Frechet, J.M.J., Stability and repeatability of *capillary columns based on porous monoliths of poly (butyl methacrylate-co*-ethylene dimethacrylate), *Journal of Cromatography A*, 1140, 140-146, **2007**.

[131] Hilder, E.F., Svec, F., Frechet, J.M.J., Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 3-22, **2004**.

[132] Aydoğan, C., Yılmaz, F., Çimen, D., Uzun, L., Denizli, A., Enantioseparation of aromatic amino acids using CEC monolith with novel chiral selector, N-methacryloyl-L-histidine methyl ester, *Electrophoresis*, 34, 1908-1914, **2013**.

[133] Zhong, H., El Rassi, Z., Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including N-glycans, *Journal of Separation Science*, 32, 10-20, **2009**.

[134] Tetala, K.K.R., T.A., Van Beek, T.A., Bioaffinity chromatography on monolithic supports, *Journal of Separation Science*, 33, 422-438, **2010**.

[135] Arrua, R.D., Causon, T.J., Hilder, E.F., Recent developments and future possibilities for polymer monoliths in separation science, *Analyst*, 137, 5179-5189, **2012**.

[136] Gu, B., Armenta, J.M., Lee, M.L., Preparation and evaluation of poly (polyethylene glycol methyl ether acrylate-co-polyethylene glycol diacrylate) monolith for protein analysis, *Journal of Chromatography A*, 1079, 382-391, **2005**.

[137] Robson, M.M., Cikalo, M.G., Myers, P., Euerby, M.R., Bartle, K.D., Capillary electrochromatography: a review, *Journal of Microcolumn Separations*, 9, 357-372, **1997**.

[138] Dermaux, A., Sandra, P., Applications of capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 20, 3027-3065, **1999**.

[139] Bandilla, D., Skinner, C.D., Protein separation by monolithic capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1004, 167-179, **2003**.

[140] Mangelings, D., Heyden, Y.V., Enantioselective capillary electro-chromatography recent developments and new trends, *Electrophoresis*, 32, 2583-2601, **2011**.

[141] Sigma-Aldrich, Kimyasal yapılar, http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html (Ağustos, **2014**).

[142] Yurtsever, A., Saraçoğlu, B., Tuncel, A., CEC with new monolithic stationary phase based on a fluorinated monomer, trifluoroethyl methacrylate, *Electrophoresis*, 30, 1-10, **2009**.

[143] Urban, J., Jandera, P., Kucerova, Z., Straten, M.A.V., Claessens, H.A., A study of the effects of column porosity on gradient separations of proteins, *Journal of Chromatography A*, 1167, 63-75, **2007**.

[144] Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Nagayama, H., Hosoya, K., Tanaka, C.K., Performance of a monolithic silica column in a capillary under pressure-driven and electrodriven conditions, *Analytical Chemistry*, 72, 1275-1280, **2000.**

[145] Kele, M., Guiochon, G., Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: I. Experimental protocol, *Journal of chromatography A,* 830, 41-54, **1999.**

[146] Asshauer, J., Halasz, I., Reproducibility and efficiency of columns packed with 10 µ silica in liquid chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, 12, 139-147, **1974**.

[147] Kele, M., Guiochon, G., Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: III. Results obtained with Kromasil C_{18} columns, *Journal of chromatography A*, 855, 423-453, **1999.**

[148] Dulay, M. T., Yan, C., Rakestraw, D. J., Zare, N. R., Automated capillary electrochromatography: reliability and reproducibility studies, *Journal of Chromatography A,* 23, 361-366, **1996.**

[149] Alpert, A. J., Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*, 499, 177-196, **1990**.

[150] Hemström, P., Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science*, 29, 1784-1821, **2006**.

[146] Boguslaw, B., Sylwia, N., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a powerful separation technique, *Analytical and BioAnalytical Chemistry*, 402, 231-247, **2012**.

[147] Guo, Y., Gaiki, S., Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5920-5938, **2011**.

[148] Rathore, A.S., Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 23, 3827-3846, **2002**.

[154] Bedair, M., El Rassi, Z., Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 1. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes, *Electrophoresis*, 23, 2938-2948, **2002**.

[155] Huang, H.Y., Lin, H.Y., Lin, S.P., CEC with monolithic poly (styrene-divinylbenzene-vinylsulfonic acid) as the stationary phase, *Electrophoresis*, 27, 4674-4681, **2006**.

[156] Wu, R., Zou, H., Fu, H., Jin, W., Ye, M., Separation of peptides on mixed mode of reversed-phase and ion-exchange capillary electrochromatography with a monolithic column, *Electrophoresis*, 23, 1239-1245, **2002**.

[157] Schwer, C., Kenndler, E., *Electrophoresis* in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta potential, *Analytical Chemistry*, 63, 1801-1807, **1991**.

[158] Gölgelioğlu, Ç., Tuncel, A., Butyl methacrylate based monoliths with different crosslinking agents using DMF-aqueous buffer as porogen, *Electrophoresis*, 34, 331-342, **2012**.

[159] Gunasena, D.N., El Rassi, Z., Neutral, charged and stratified polar monoliths for hydrophilic interaction capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A,* 1317, 77-84, **2013**.

[160] Wang, X., Lin, X., Xie, Z., Preparation and evaluation of a sulfoalkylbetaine-based zwitterionic monolithiccolumn for CEC of polar analytes, *Electrophoresis,* 30, 2702-2710, **2009.**

[161] Yoshida, T., Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods,* 60, 265-280, **2004**.

[162] Chen, M.L., Li, L.M., Yuan, B.F., Ma, Q., Feng, Y.Q., Preparation and characterization of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1230, 54-60, **2012**.

[163] Fu, H., Xie, C., Dong, J., Huang, X., Zou, H., Monolithic column with zwitterionic stationary phase for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 76, 4876-4874, **2004**.

[164] Cikalo, M.G., Bartle, K.D., Robson, M.M., Myers, P., Euerby, M.R., Capillary Electrochromatography, *Analyst*, 123, 87R-102R, **1998**.

[165] Karenga, S., El Rassi, Z., A novel, neutral hydroxylated octadecylacrylate monolith with fast electroosmotic flow velocity and its application to the separation of various solutes including peptides and proteins in the absence of electrostatic interactions, *Electrophoresis,* 31, 3192-3199, **2010**.

[166] Karenga, S., El Rassi, Z., Neutral octadecyl monolith for reversed phase capillary electrochromatography of a wide range of solutes, Journal of Seperation Science, 31, 2677-2685, **2008**.

[167] Lammerhofer, M., Svec, F., Frechet, J.M.J., Lindler, W., Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 925, 265-277, **2001**.

[168] Lin, J., Wu, X., Lin, X., Xie Z., Preparation of polymethacrylate monolithic stationary phases having bonded octadecyl ligands and sulfonate groups: Electrochromatographic characterization and application to the separation of polar solutes for pressurized capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A,* 1169, 220-227, **2007**.

[169] Bedair, M., El Rassi, Z., Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases II. Preparation of cationic stearyl-acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization, *Journal of Chromatography A,* 1013, 35-45, **2003**.

[170] Fu, H., Xie, C., Dong, J., Huang, X., Zou, H., Monolithic column with zwitterionic stationary phase for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 76, 4876-4874, **2004**.

[171] Helboe, T., Hansen, H.S., Separation of nucleosides using capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 836, 315-324, **1999**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı:	Ayşe Aslıhan GÖKALTUN
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Evli
E-posta:	asbay@hacettepe.edu.tr
Adres:	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, BEYTEPE/ ANKARA

Eğitim

Lise:	Bursa Şükrü Şankaya Anodolu Lisesi
Lisans:	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans:	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Doktora:	Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce:	İleri düzey
Almanca:	Başlangıç

İş Deneyimi

21/05/2009 - Devam ediyor	Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü BEYTEPE/ANKARA
04/09/2006 - 22/09/2006	Oyak Renault Otomobil Fabrikaları, BURSA (staj)
01/07/2005 - 01/08/2005	Nergis Tekstil Sanayi ve Ticaret A.Ş., BURSA (staj)

Deneyim Alanları

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
- Nano-Sıvı Kromatografisi (Nano-LC)
- Micro-Sıvı Kromatografisi (Micro-LC)
- Kapiler Elektrokromatografi (CEC)
- Brunauer-Emmet-Teller (BET) Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçer
- Zeta Sizer Boyut ve Molekül Ağırlığı Dağımı Ölçer
- Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) spektrofotometre

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden üretilmiş proje bulunmamaktadır.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. **Gokaltun, Aslihan**; Aydogan, Cemil; Celebi, Bekir, Denizli, Adil, Tuncel, Ali, Preparation of an electrochromatographic stationary phase using a new polymethacrylate monolith with chloropropyl functionality, *Chromatographia*, 77, 459-469, **2014**.

2. **Gokaltun, Aslihan**; Celebi, Bekir; Tuncel, Ali; Preparation of a new cationic stationary phase using a reactive polymethacrylate monolith for capillary electrochromatography of neutral and polar analytes, *Electrophoresis* (Sunuldu).

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. **Gökaltun**, **Aslıhan;** Sağ, Ebru; Hamaloğlu, K. Özlem; Tuncel, Ali; Effect of Crosslinking Agent Type on the Electrochromatographic Separation Performance of Hydrophilic Polymethacrylate Monoliths, *HPLC 2014, 41st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, New Orleans, USA, 11-15 Mayıs, **2014**.

2. **Gökaltun, Aslıhan;** Aydoğan, Cemil; Çelebi, Bekir; Denizli, Adil; Tuncel, Ali; Poly(3-Chloro-2-Hydroxypropyl Methacrylate) Based Reactive Monolith with Derivatization Flexibility as a New Separation Medium for Capillary Electrochromatography. Part I: Sulfonic Acid Functionalized Strong Cation Exchance Stationary Phase, *HPLC 2013*, Amsterdam, NETHERLANDS, 16-20 Haziran, **2013.**

3. Aydoğan, Cemil; Çelebi, Bekir; **Gökaltun**, **Aslıhan;** Denizli, Adil; Tuncel, Ali ; Poly(3-Chloro-2-Hydroxypropyl Methacrylate) Based Reactive Monolith with Derivatization Flexibility as a New Separation Medium for Capillary Electrochromatography. Part III: Polyethylenimine Functionalized Strong Anion Exchange Stationary Phase, *HPLC 2013*, Amsterdam, NETHERLANDS, **2013.**