

**MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE CEC (KAPİLER
ELEKTROKROMATOĞRAFI) SİSTEMİNDE HİDROFOBİK
AMİNO ASİT ENANTİYOMERLERİNİN AYRILMASI**

**SEPARATION OF HYDROPHOBIC AMINO ACID
ENANTIOMERS IN CEC (CAPILLARY
ELECTROCHROMATOGRAPHY) SYSTEM BY
MOLECULAR IMPRINTING TECHNIQUE**

KORAY ŞARKAYA

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

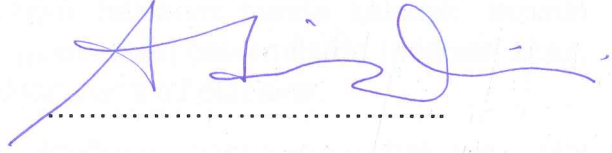
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalının Öngördüğü
DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

2018

KORAY ŞARKAYA'nın hazırladığı "Moleküler Baskılama Yöntemi ile CEC (Kapiler Elektrokromatografi) Sisteminde Hidrofobik Amino Asit Enantiyomerlerinin Ayrılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

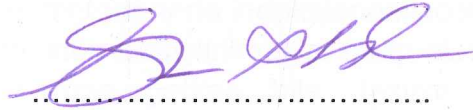
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Başkan



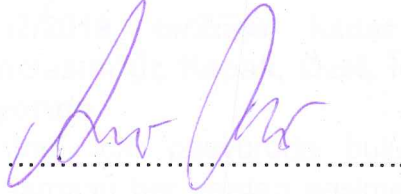
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Danışman



Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Üye



Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN
Üye



Yrd.Doç. Dr. Ceren HAKTANIR
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 09/02/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun 09/02/2019 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

09 /02 / 2018



KORAY ŞARKAYA

ETİK

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

- 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.

09/02/2018

KORAY ŞARKAYA

ÖZET

MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE CEC (KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFI) SİSTEMİNDE HİDROFOBİK AMİNO ASİT ENANTİYOMERLERİNİN AYRILMASI

Koray ŞARKAYA

Doktora, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Ocak 2018, 185 sayfa

Farklı biyolojik aktiviteler gösterebilmeleri sebebiyle enantiyomerlerin ayrılmaları kimya biliminde kromatografi araştırma konuları içerisinde önem taşımaktadır. Amino asit enantiyomer çiftleri, gerek ticari açıdan artan önemleri ve gerekse de kolaylıkla ulaşılabilmeleri gibi etmenler dolayısıyla son yıllardaki önemli araştırma konularından bir tanesi haline gelmiştir. Aminoasitlerin yüksek çözünürlüklü ayrılmalarının başarılmaması, amino asit analizinde önemli bir uygulama noktasını oluşturmaktadır. Aminoasit enantiyomerlerinin birçoğu, biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezlenme sürecinde başlangıç maddesi olarak ya da farklı görevler kapsamlı gerekli bileşikler olarak kullanılabilmektedir.

Kiral bileşiklerin ayrılması için çeşitli yöntemler bulunur. Tez kapsamında bu yöntemlerden elektroforez tekniklerinden bir tanesi olarak Kapiler Elektrokromatografi (CEC) yöntemi kullanılmıştır. CEC yöntemi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'nin yüksek seçiciliği ve Kapiler

Elektroforez (CE)'in etkin ayrımlılığı yönlerini temel almış ve bu iki yöntemin bileşke teknolojisi olarak son yıllardaki en verimli yöntemlerden bir tanesidir. Sahip olduğu farklı hidrodinamik özellikler sebebiyle CEC sisteminde son dönemlerde monolitik kolonlar, dolgu kolonlara göre daha fazla tercih edilmektedir. Monolitik kolonların gruplarından olan polimer kolonlar çeşitli organik monomerler ile hazırlanabilmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), moleküler tanımayla elverişli malzemeler olarak pratik olarak uygun şartlarda kolayca hazırlanabilmektedir. Ayrıca bu polimerlerin sahip olduğu mekaniksel özellikler, ısıya ve basınca karşı sağlam dirençlilik, fiziksel sağlamlıkları, asidik, bazik, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ortamlardaki yüksek kararlılıkları sebebiyle birkaç yıl boyunca performansında değişim gözlenmeksizin saklanabilmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasında hidrofobik amino asitlerin enantiyomerik formlarının CEC sisteminde birbirinden moleküler baskılama tekniği ile ayrılması hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda amino asidin L-formu baskılanacak kalıp molekül olarak seçilirken, fonksiyonel monomer olarak hidrofobik karakterli N-Metakriloil-(L)-fenilalanin monomeri tercih edildi ve hidrofobik karakterli monolitik CEC kolonu hazırlandı. Hazırlanan metakrilat bazlı monolitik kolonun geçirgenlik özelliklerinin artırılabilmesi için; monomer oranı, sıcaklığın etkisi, kalıp molekül oranı, çapraz bağlayıcı oranı, porojen oranı ve çeşidi gibi farklı parametrelerde denendi. Hazırlanan CEC kolonunun karakterizasyon çalışmaları, FTIR-ATR, SEM ve BET analizleri ile değerlendirildi. Optimum geçirgenlik elde edilmesi sonrasında alkil benzen türevli bileşikler kullanılarak monolitlerin kromatografik performansları tayin edildi. Optimum koşulları belirlemek üzere akımın, basıncın, organik çözücünün derişiminin etkisi ve enantiyomerik türün tespitine yönelik farklı koşullar altında enantiyomerik ayrımlar gerçekleştirildi. Sonuçların desteklenmesi bakımından teorik tabaka değerleri ve teorik tabaka yükseklikleri hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının yapılmasının ardından, moleküler baskılanmış kolon ile baskılanmamış (boş) kolonun ayırma performansı elektrokromatografik olarak karşılaştırıldı. Hidrofobik karakterli monolitik CEC kolonu kullanımıyla birlikte hidrofobik karakterli amino asitler triptofan, tirozin ve fenilalaninin CEC sisteminde enantiyomerik ayrımları başarıyla gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: Amino asit, enantiyomer, monolitik kolon, kapiler elektrokromatografi, moleküler baskılama

ABSTRACT

SEPARATION OF HYDROPHOBIC AMINO ACID ENANTIOMERS IN CEC (CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY) SYSTEM BY MOLECULAR IMPRINTING TECHNIQUE

Koray ŞARKAYA

Doctor of Philosophy, Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

January 2018, 185 pages

Because of their ability to show different biological activities, the separation of enantiomers is of importance in the field of chromatographic research in chemistry. Amino acid enantiomer pairs have become one of the important research topics in recent years due to factors such as increasing commercial importance and being easily accessible. The achievement of high resolution separations of amino acids is an important application point in amino acid analysis. Many of the amino acid enantiomers can be used as starting materials in the synthesis process of biologically active compounds or as complements of various tasks. There are various methods for separating of chiral compounds.

There are various methods for separating chiral compounds. Capillary electrochromatography (CEC) method was used as one of the electrophoresis techniques. The CEC method is based on the high selectivity of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the efficient discrimination of capillary

electrophoresis (CE) and is one of the most efficient methods in recent years as the resultant compounding technology. Because of the different hydrodynamic properties that it possesses, monolithic columns in the CEC system are preferred over filled columns. Polymer columns from groups of monolithic columns can be prepared with various organic monomers. Molecularly imprinted polymers (MIPs) can be easily prepared in practical terms as materials suitable for molecular identification. In addition, these polymers have mechanical properties, robustness against heat and pressure, physical stability, acidic, basic, metal-ions and organic solvents.

In this thesis, it was aimed to separate the enantiomeric forms of hydrophobic amino acids by molecular imprinting technique in CEC system. In this target, the hydrophobic N-Methacryloyl-(L) -phenylalanine monomer was preferred as the functional monomer, while the monolithic CEC column with hydrophobic character was prepared, while the L-form of amino acid was selected as the template molecule to be imprinted. In order to increase the permeability properties of the prepared methacrylate-based monolithic column, monomer ratio, temperature effect, template molecule ratio, crosslinking ratio, porogen ratio and type was examined. Characterization studies of the prepared CEC column were evaluated by FTIR-ATR, SEM and BET analyzes. After obtaining optimal permeability, the chromatographic performance of the monoliths was determined using alkyl benzene-derived compounds. To determine the optimum conditions, enantiomeric separations were carried out under different conditions for the effect of the concentration of the stream, the pressure, the organic solvent and the determination of the enantiomeric stream. Theoretical plate values and theoretical plate heights were calculated to support the results. After carrying out the reusability studies, the separation performance of the molecularly imprinted column and the non-imprinted column was compared electrochromatographically.

With the use of monolithic CEC column with hydrophobic character, the enantiomeric separations of the hydrophobic amino acids tryptophan, tyrosine and phenylalanine in CEC system were successfully carried out.

Keywords: Amino acid, enantiomer, monolithic column, capillary electrochromatography, molecular imprinting technique,



TEŞEKKÜR

BIOREG grubunun bir üyesi olmamı sağlayan, bilgi birikimi ve tecrübesiyle olaylara bilimsel açıdan bakmamda bana vizyon kazandırmış değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli' ye,

Danışmanlığı süresince güler yüzlü yaklaşımıyla pozitif duygular aşılayan Danışman Hocam Prof. Dr. Handan Yavuz' a,

Tezim süresince bilgisiyle ve özverisiyle yardımlarını benden esirgemeyerek desteğini hiçbir zaman unutmayacağım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

BIOREG grubunda geçirdiğim süre içerisinde tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Lokman Uzun, Doç. Dr. Deniz Türkmen, Kemal Çetin, Süleyman Aşır, Sabina Hüseyinli, Ilgım Göktürk, Monireh Bakhshpour, Duygu Çimen, Canan Armutçu, Fatma Kartal, Sevgi Aslıyüce Çoban, Yeşeren Saylan, Duygu Aydın ve Bioreg ailesinin diğer tüm üyelerine,

Ankara'da geçirdiğim tez dönemi süresince bana her türlü desteği veren ablam gibi gördüğüm Elvan Karav ve ailesine,

Bu süreçte en büyük destekçim olan annem ve babama teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER	xii
ÇİZELGELER	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xx
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kromatografiye Giriş	5
2.1.1. Kromatografi Çeşitleri	6
2.1.1.1. Kolon Kromatografisi	6
2.1.1.2. İyon Değişirme Kromatografisi	7
2.1.1.3. Jel Filtrasyonu (Moleküler Elek) Kromatografisi	8
2.1.1.4. Afinite Kromatografisi	9
2.1.1.5. Kağıt Kromatografisi	9
2.1.1.6. İnce Tabaka Kromatografisi	10
2.1.1.7. Gaz Kromatografisi	10
2.1.1.8. Boya-Ligand Kromatografisi	10
2.1.1.9. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)	11
2.1.1.10. Psödo Afinite Kromatografisi	11
2.1.1.11 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	11
2.1.2. Kromatografinin Uygulama Alanları	12
2.2. Elektroforez ve Kapiler Elektrokromatografi	12
2.2.1. Elektroforez	12
2.2.2. Kapiler Elektroforez (CE)	12
2.2.3. Kapiler Elektrokromatografi	18
2.2.3.1. Kapiler Elektrokromatografi (CEC) Sisteminin Tarihsel Gelişimi ...	20
2.2.3. Kapiler Elektrokromatografinin Uygulama Alanları	23
2.2.3.1. Nötral Moleküller	23
2.2.3.2. Asidik Moleküller	24
2.2.3.3. Bazik Moleküller	24
2.2.3.4. Eczacılık Analizleri	25
2.2.3.5. Biyoteknolojik Uygulamalar	26

2.2.3.5.1. Karbohidratların Ayırılması	26
2.2.3.5.2. Protein ve Peptidlerin Ayırılması	27
2.2.3.5.3. Aminoasitlerin Ayırımı	28
2.2.3.5.4. Lipidlerin Ayırımı.....	29
2.2.3.5.7. Nükleotitler ve Nükleozitlerin Ayırılması	30
2.2.3.6. Gıda ve Tarımsal Analizler	31
2.2.3.7. Çevre Analizleri	31
2.2.4. Nanoteknoloji ve Kapiler Elektrokromatografi	33
2.2.4.1. Nanoboyunların Kapiler Elektrokromatografide Kullanımı.....	33
2.2.5. Kapiler Elektrokromatografinin Dezavantajları	33
2.3. Kolon Teknolojisi	35
2.3.1. Açık Borusal Kolonlar.....	37
2.3.2. Dolgulu Kolonlar.....	38
2.3.3. Monolitik Kolonlar.....	40
2.3.3.1 Monolitik Kolonların Hazırlanışı	40
2.3.3.2. Monolitlerin Gözenek Yapısı	42
2.3.3.3. Monolitlerin Kütle Aktarım Özellikleri	42
2.3.3.4. Monolitlerin Akış Özellikleri.....	42
2.3.3.5. Monolitik Kolonların Gelişim Süreci ve Çeşitleri.....	43
2.3.4. CEC Sisteminde Monolitik Kolonların Uygulamaları	44
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	45
2.4.1. Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılan Kimyasallar	47
2.4.1.1. Monomerler	47
2.4.1.1.1. Asidik Monomerler.....	48
2.4.1.1.2. Bazik Monomerler	49
2.4.1.1.3. Nötral Monomerler.....	49
2.4.1.1.4. Çapraz Bağlayıcılar	50
2.4.1.1.5. Çözücüler	51
2.4.1.1.6. Başlatıcılar ve Sıcaklık Etkisi	52
2.4.2 Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	52
2.4.2.1. Kovalent Etkileşimler	53
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Etkileşimler	54
2.4.2.3. Metal İyon Değişikliği Yöntemi.....	55
2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları.....	56
2.4.3.1. Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)	56

2.4.3.2. Ayırma Tekniklerinde Moleküler Baskılanmış Polimerler	57
2.4.3.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Diğer Uygulamaları	58
2.5. Kiral Ayırımın Gerekliliği	58
2.5.1. Ayırma Teknikleriyle Kiral Tanımlama.....	59
3. MATERYAL VE YÖNTEM	61
3.1 Kromatografik Analiz Sistemleri	61
3.2 Kimyasal Malzemeler ve Yöntem	61
3.2.1. Deneysel Yöntemler.....	64
3.2.1.1. N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi.....	64
3.2.1.2. Kapiler Kolonun Kullanıma Hazırlanması	64
3.2.1.3. Fonksiyonel Monomer Seçilmesi	65
3.2.1.4. PMAPA Monolitik Kapiler Kolonunun Hazırlanması.....	65
3.3. Polimetakrilat Bazlı Monolitlerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	69
3.3.1. Monolitik Kolonların Morfolojik Özelliklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi.....	69
3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Özellikleri	69
3.3.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi.....	70
3.4. Kromatografik Performans Özellikleri.....	70
3.5. Elektrokromatografik Ayırım Koşulları	70
3.5.1. Elektrozmotik Akış (EOF).....	71
3.5.2. Alıkonma (Kapasite) Faktörü (k)	71
3.5.3. Teorik Tabaka Sayısı (N) ve Tabaka Yüksekliği (h)	72
3.6. Enantiyomerik Ayırımı Etkileyen Parametreler	73
3.6.1. Ayırma Elektrik Alanının Etkisinin İncelenmesi	73
3.6.2. Ayırma Basınç Etkisinin İncelenmesi	73
3.6.3. Ayırma Organik Fazın Etkisi	74
3.6.4. Enantiyomerik Türün Tespiti	74
3.7. Moleküler Baskılanma Faktörünün Belirlenmesi	74
3.8. Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)	74
4. BULGULAR	75
4.1. Aminoasit Baskılanmış P(MAPA) monolitik kolonların hazırlanışı	75
4.2. PMAPA Monolitik Kolonun Karakterizasyon Çalışmaları.....	81
4.2.1. PMAPA Bazlı Monolitik Kolonun Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi. 81	
4.2.2. PMAPA Bazlı Monolitik Kolonların Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Özelliklerinin İncelenmesi	83

4.2.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi.....	83
4.3. Kolonların Kromatografik Performans Testi	84
4.4. Enantiyomerik Ayırımdaki Parametrelerin İncelenmesi	87
4.4.1. Ayırma Elektrik Alanının Etkisinin İncelenmesi	87
4.4.2. Enantiyomerik Ayırma Basınç Etkisinin İncelenmesi.....	94
4.4.3. Enantiyomerik Ayırma Organik Çözücü Etkisi.....	101
4.4.4. Enantiyomerik Türün Tespiti	107
4.4.5. Elektroozmotik Akış (EOF) Hesaplamaları.....	111
4.4.6. Kromatografik Ayırım Gücü Hesaplamaları.....	112
4.4.6.1. Alıkonma (Kapasite) Faktörü ve Seçicilik Hesaplamaları.....	112
4.4.6.2. Monolitik Kolonda Teorik Tabaka Sayısı ve Teorik Tabaka Yükseklikleri Hesaplamaları.....	116
4.6. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	125
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	127
6. KAYNAKLAR.....	138
7. ÖZGEÇMİŞ	159

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kolon Kromatografisi örneği.	7
Şekil 2.2. Jel Filtrasyonu örneği.....	8
Şekil 2.3. Afinite Kromatografisi.....	9
Şekil 2.4. Kapiler elektroforez sistemi.....	13
Şekil 2.5. Elektroozmotik akış (EOF) oluşumu [66].	14
Şekil 2.6. Kapiler kolon içerisine elektriksel alan uygulaması ve EOF ile analitlerin hareketi [66].....	14
Şekil 2.7. (A-D) Kapiler elektrokromatografi sisteminde farklı yüklere sahip analitlerin hareketi [67].....	15
Şekil 2.8. Silika duvarda Elektriksel Çifte Tabaka yapısı [68].	16
Şekil 2.9. Elektroozmotik (EOF) akış şeması [68].	19
Şekil 2.10. (A) HPLC ve (B) CEC sistemlerinde elde edilen akış profilleri ve analit pikleri [66].....	19
Şekil 2.11. CEC'de kullanılan kolonlar: a) Açık-Tübüler Kolon(OT) b) Monolitik kolonlar c) Dolgulu Kolonlar [179].....	36
Şekil 2.12. Kapiler Kolon SEM görüntüleri A) Boş kapiler B) Polietilen modifikasyonlu kapiler kolon [66].....	38
Şekil 2.13. Monolitik kolon hazırlanma süreci [205].....	41
Şekil 2.14. Farklı tip ve büyüklükte polimer bazlı monolitik kolonların SEM görüntüleri.....	41
Şekil 2.15. Moleküler Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi [217].	47
Şekil 2.16. Asidik fonksiyonel monomerler [217].	48
Şekil 2.17. Bazik fonksiyonel monomerler [217].	49
Şekil 2.18. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar [217].....	51
Şekil 2.19. Kovalent olmayan (A) ve Kovalent (B) baskılamanın karşılaştırılması [217].....	54
Şekil 2.20. Metal iyonlarının baskılama yönteminde kullanılmasıyla yaptıkları görevler: A: Kalıp olarak metal iyonları B: Metal iyon vasıtasıyla baskılama [217].	56
Şekil 2.21. Enantiyomerik Ayırım Şeması.	60
Şekil 3.1. Kapiler Elektrokromatografi sisteminde kullanılan Prince CEC-760 cihazı.	61

Şekil 3.2. Polimetakrilat monolitik kolon sentezinde kullanılmak üzere fonksiyonel monomer olarak seçilen N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA)'nın açık yapısı.	63
Şekil 3.3. MAPA bazlı monolitik kolonun kromatografik ayırımını test etmek için seçilmiş alkil türevleri.	63
Şekil 3.4. Kromatografik uygulama olarak enantiyomerik ayırımı gerçekleştirilen aminoasitlerin kimyasal yapıları.	63
Şekil 4.1. Fenilalanin baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri.	80
Şekil 4.2. Triptofan baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri	80
Şekil 4.3. Tirozin baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri	81
Şekil 4.4. MAPA bazlı monolitik kolonların kenar ve iç kısım SEM görüntüleri. A) boş kolon, B) fenilalanin, C) tirozin ve D) triptofan baskılanmış kolonlar	82
Şekil.4.5. MAPA monomeri ve PMAPA monolitik kolona ait IR Spektrumları	84
Şekil 4.6 Baskılanmamış (NIP) kolonunun elektrokromatografik karakterizasyonu. Uygulanan akım:10 Kv; Hareketli faz, %50:50 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); injeksiyon: 3s; dalgaboyu (λ)= 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; tiyoüre (0.5 mg/mL), alkil benzenler (2 μ L/mL) pik sırası, (1) tiyoüre (2) benzen (3) tolüen (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen	85
Şekil 4.7. Fenilalaninin D-, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5 kV b)10 kV c)15 kV d) D,L-fenilalaninin elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı akımlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7)..	88
Şekil 4.8. Triptofanın D-, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5kV b)10kV c)15kV d) D,L Triptofanın elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı akımlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali. (dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7)..	91
Şekil 4.9. Tirozinin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5kV b)10kV c)15kV d) D,L-tirozinin elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı akım oranları için	

gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali. (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7)).. 93

Şekil 4.10. Fenilalaninin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: a) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar; d) D,L-fenilalaninin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7))..... 96

Şekil 4.11. Triptofanın D,L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: A) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar d) D,L- Triptofanın basınç etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali. D,L-triptofanın basınç etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali. (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7))..... 98

Şekil 4.12. Tirozinin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: A) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar d) D,L-tirozinin enantiyomerik ayırımını incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7))..... 100

Şekil 4.13. Fenilalaninin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - % pH 7.0) c) D,L-tirozinin organik faz etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar). 102

Şekil 4.14. Triptofanın D, L, enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - & %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - %40 pH 7.0) C) D,L-triptofanın organik faz etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar)...... 104

Şekil 4.15. Tirozinin D-, L- enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - %40 pH 7.0) C) D,L-tirozinin organik faz etkisinin enantiyomerik ayırımında incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar)...... 106

Şekil 4.16. A) Fenilalaninin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L-formun kolona verildiği elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj:

- 10kV) B) Fenilalaninin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde
çakıştırılmış elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200
nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) C)
Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları..... 108
- Şekil 4.17. A) Triptofanın D-, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L-
formun kolona verildiği elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0;
dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10
kV) B) Triptofanın D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde
çakıştırılmış elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200
nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10kV) C)
Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları..... 109
- Şekil 4.18. A) Tirozinin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L-
formun kolona verildiği kromatogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0;
dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10
kV) B) Triptofanın D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde
çakıştırılmış kromatogram: (basınç: 0 mbar; pH:7.0; dalgaboyu: 200
nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) C)
Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları..... 110
- Şekil 4.19. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda fenilalaninin enantiyomerik
ayırımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar,
konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7
%50))...... 120
- Şekil 4.20. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda fenilalaninin çakıştırılmış
elektrogramda enantiyomerik ayırımı: uygulanan voltaj: 10 kV,
basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm;
(ACN %50 - pH 7 %50)..... 121
- Şekil 4.21. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda triptofanın enantiyomerik
ayırımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar,
konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7
%50))...... 121
- Şekil 4.22. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda çakıştırılmış elektrogramda
triptofanın enantiyomerik ayırımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0
mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 -
pH 7 %50))...... 122
- Şekil 4.23. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda tirozinin enantiyomerik ayırımı:
(uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL,
dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50)). 122
- Şekil 4.24. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda çakıştırılmış elektrogramda
tirozinin enantiyomerik ayırımı: uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0
mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 -
pH 7 %50)..... 123

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kapiler Elektrokromatografideki önemli gelişmeler [72].	22
Çizelge 2.2. Kovalent ve Kovalent olmayan bağlanma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlı yönlerinin karşılaştırılması	55
Çizelge 3.1. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.	66
Çizelge 3.2. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi	66
Çizelge 3.3. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer oranı etkisi.	66
Çizelge 3.4. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	67
Çizelge 3.5. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.	67
Çizelge 3.6. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi.	67
Çizelge 3.7. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer etkisi.	67
Çizelge 3.8. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	68
Çizelge 3.9. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.	68
Çizelge 3.10. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi.	68
Çizelge 3.11. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer etkisi.	68
Çizelge 3.12. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	69
Çizelge 4.1. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi	76
Çizelge 4.2. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	76
Çizelge 4.3. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	76

Çizelge 4.4.	Triptofan baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	76
Çizelge 4.5.	Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	77
Çizelge 4.6.	Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	77
Çizelge 4.7.	Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	78
Çizelge 4.8.	Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	78
Çizelge 4.9.	Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	78
Çizelge 4.10.	Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	79
Çizelge 4.11.	Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.	79
Çizelge 4.12.	Tirozin baskılanmış monolitik kolonda monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.	79
Çizelge 4.13.	CEC sisteminde optimize edilmiş baskılanmamış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.	85
Çizelge 4.14.	CEC sisteminde optimize edilmiş fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.	86
Çizelge 4.15.	CEC sisteminde optimize edilmiş triptofan baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.	86
Çizelge 4.16.	CEC sisteminde optimize edilmiş tirozin baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.	87
Çizelge 4.17.	Farklı voltajlarda (5 kV, 10kV, 15kV) gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri.	89
Çizelge 4.18.	Farklı voltajlarda (5kV, 10kV, 15kV) gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri.	92
Çizelge 4.19.	Farklı elektriksel akımlarda gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri.	94

Çizelge 4.20. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri	97
Çizelge 4.21. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri.....	99
Çizelge 4.22. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri.....	101
Çizelge 4.23. Farklı ACN derişimlerinde gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri	103
Çizelge 4.24. Farklı ACN derişiminde gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri	105
Çizelge 4.25. Farklı ACN derişiminde gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri	107
Çizelge 4.26. (5, 10 ve 15 kV'lık uygulanan elektriksel alan; basınç: 0 mbar; (ACN %50 pH - 7.0 %50); dalgaboyu: 200 nm, konsantrasyon: 0.5 mg/mL)'lik koşullarda hesaplanmış EOF değerleri.	112
Çizelge 4.27. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak fenilalaninin enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k').....	113
Çizelge 4.28. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak triptofanın enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k').....	114
Çizelge 4.29. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak tirozinin enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k').....	115
Çizelge 4.30. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak fenilalaninin enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri	117
Çizelge 4.31. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak triptofanın enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri.	118
Çizelge 4.32. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak tirozinin enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri.	119
Çizelge 4.33. Hidrofobik amino asitlerin baskılanmamış kolondaki enantiyomerik ayırımına ilişkin kromatografik parametrik değerler (alıkonma zamanları ve alıkonma faktörleri): (uygulanan voltaj: 10 kV,	

basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).....	123
Çizelge 4.34. Enantiyomerik ayırimda moleküler baskılanmış (MIP) kolon ve baskılanmamış (NIP) kolona ilişkin alıkonma faktörleri ve baskılama faktörünün etkinlik değerleri.....	124
Çizelge 4.35. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla fenilalaninin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri : (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalgaboyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7)	125
Çizelge 4.36. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla triptofanın D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri: (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalgaboyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7)	125
Çizelge 4.37. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla tirozinin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri : (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalgaboyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7)	126
Çizelge 5.1. 2004-2014 Yılları Arası Dolaylı Yöntemler ile Gerçekleştirilmiş Amino Asitlerin Enantiyomerik Ayırımları [249].....	134
Çizelge 5.2. 2004-2014 Yılları Arası Doğrudan Yöntemler ile Gerçekleştirilmiş Amino Asitlerin Enantiyomerik Ayırımları [249].....	136

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

σ	Yüzey Gerilimi
μ_{eo}	Elektro Ozmotik Hareketlilik
ε	Dielektrik Sabiti
ε_0	Vakum Dielektrik Sabiti
ζ	Yüzey Zeta Potansiyeli
η	Elektrolit Viskozitesi
t_D	D-Enantiyomerinin Alıkonma Zamanı
t_L	L-Enantiyomerinin Alıkonma Zamanı
R_s	Ayırıcılık
α	Seçicilik Faktörü

KISALTMALAR

CE	Kapiler elektroforez
CEC	Kapiler elektrokromatografi
Nano-LC	Nano sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
MEKC	Misellar elektrokinetik kromatografi
MAPA	Metakriloil fenilalanin
AIBN	Azoizobisbutironitril
TMSMP	Trimetoksisililpropilmetakrilat
HEMA	Hidroksi etilmetakrilat
HPMA-CI	3-kloro-2-hidroksi propil metakrilat

EDMA	Etilen dimetakrilat
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi
MAA	Metakrilik asit
EOF	Elektroozmotik akış
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
BET	Branuer-Emmet-Teller analiz cihazı
ACN	Asetonitril
L-phe	L-fenilalanin
L-trp	L-Triptofan
L-his	L-Histidin
L-tyr	L-Tyrozin

1. GİRİŞ

Her bir enantiyomerin farklı biyolojiksel aktiviteleri ve biyolojik süreçlerde farklı tanıma yollarına bağlı olarak farklı fizyolojik etkileri bulunmaktadır [1]. Bir enantiyomer arzu edilen terapitik aktiviteleri oluşturabilirken, enantiyomerin diğeri ise aktif olamayabileceği gibi hatta istenmeyen etkiler de gösterebilmektedir [2]. Örnek olarak, L-triptofan, esansiyel amino asitlerden bir tanesi olarak anti-depresan tedavisinde farmasötik bir ajan olarak kullanılabilecekken, D-triptofan'ın ise bilinen bir biyolojik aktivitesi bulunmadığı gibi L-triptofan örneklerinde safsızlık olarak ortaya çıkabilir [3].

Enantiyomerlerin kiral ayırımlarına yönelik çalışmalar neredeyse son yarım asırdır devam etmektedir. Kromatografik yöntemler, etkili, pratik, doğada kullanıma hazır durumda bulunması ve yöntemlerin verimlilikle geliştirilebilmesi açısından sıklıkla başvurulmaktadır [4]. Optiksel izomerlerin ayırımında ilk dönemlerde başlıca kullanılan yöntemler, Sıvı Kromatografisi (LC), Gaz Kromatografisi (GC), Süper Kritik Akışkan Kromatografisi (SFC)'dir [5-10]. Gassman ve ekibinin, enantiyomerlerin ilk kez elektrokinetik ayırımı amacıyla yapmış oldukları çalışmanın sonrasında ise Kapiler Elektroforez teknikleri arasında yer alan Kapiler Jel Elektroforez (CGE), Kapiler Alan Elektroforez (CZE) ve Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MECC) gibi yöntemlere dayalı çalışmalar literatürde yer bulmaya başlamıştır [11-17].

Enantiyomerlerin kiral ayırımlarını gerçekleştirmek üzere Kapiler Elektrokromatografi (CEC) sisteminin kullanılarak yapılan uygulamalara son yıllarda büyük ilgi duyulmaktadır. Hareketli fazın, sabit faz boyunca yürütücü kuvvet olarak elektriksel alan uygulanarak elde edilen elektroosmotik akış ile birlikte elektroforez yoluyla yalnızca yüksüz bileşiklerin değil, aynı zamanda yüklü bileşiklerin de etkili ve hızlı ayırımının hem de çok düşük ölçekli madde miktarlarında gerçekleştirilebiliyor olması, bu sistemin en önemli avantajlarından bir tanesidir [18].

Kapiler Elektrokromatografi (CEC) sistemi ile enantiyomerik ayırımlar üç farklı yöntem başlığı altında değerlendirilebilir. Bunlardan ilki, kiral selektörün fiziksel olarak yüzeye çekildiği ve termal olarak immobilize olduğu veya kovalent olarak iç

kapiler duvara tutturulduğu açık borusal-tübüler şeklindeki kapiler elektrokromatografi (o-CEC)'dir. Bir diğer yöntem ise kiral selektör modifiye edilmiş silika partiküller ya da kiral olmayan dolgulu malzeme ile doldurulmuş ve hareketli faza bir kiral selektör dâhil olmuş olan dolgulu kapiler elektrokromatografi (p-CEC) yöntemidir. Son dönemlerde kullanım sıklığı genişleyen, gözenekli katı parçacık içerikli kullanılan kiral sabit fazlar ise monolitik (rod) kapiler elektrokromatografi (rod-CEC) olarak tanımlanmaktadır [19].

Kapiler Elektrokromatografi (CEC) sistemiyle enantiyomerik ayrımlar ilk kez Açık-borusal kolonlar ile gerçekleştirilmiştir [20-24]. Mayer ve Schuring, 50 µm çapında permetilat-β-siklodekstrin modifiyeli dimetilpolisiloksanın kiral sabit faz (CSP) olarak kullanıldığı açık-tübüler kolonda non-steroid Antienflamatuvar enantiyomerlerinin ayrımını gerçekleştirmişlerdir [20,21]. Bu yöntem daha sonra, siklodekstrin ve türevleri, selüloz, peptidler ve proteinlerin yanı sıra moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) kiral sabit faz olarak kullanılmasıyla çeşitli enantiyomerik karışımların ayrılmasında o-CEC sisteminde kullanılmaya devam edilmiştir.

Dolgulu kolonlarda (p-CEC) sisteminde enantiyomer ayrımı ilk kez, Li ve Floyd'un 1992 yılında ortak yürüttüğü çalışma ile literatürde yer bulmuştur. Benzoin, heksobarbital, pentobarbital, ifosfomit, siklofosfoamit, diizopiramit, metoprolol, oksprenolol, alprenolol ve propranolol bileşikleri α₁-asidik glikoprotein (AGP)'in sabit faz olarak kullanıldığı dolgulu kolonda ayrımları gerçekleştirilmiştir [25,26].

Dolgulu kolonlarda yaşanan yavaş kütle aktarımı, parçacıklar arası boşlukların fazla oluşu ve yüksek basınç düşmesi gibi sebepler bu yöntemin verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. HPLC ve CEC sistemlerinde kullanımı günümüzde yaygın olarak devam eden ve diğer iki yöntem olan o-CEC ve p-CEC'e göre alternatif bir yöntem olarak 90'lı yılların başından itibaren literatüre giriş yapan monolitik kolonların yapısına bakacak olursak, ilk olarak tek parçalı gözenek yapısını görmekteyiz. Monolitin yapısında yer alan birbiriyle iç içe gözenekler, kanallar arası bir ağ meydana getirmektedir. Kanal içi kütle aktarımı, hareketli faz ile sabit faz arasındaki aktarımın yüksek doğrusal seviyede olması sebebi ile düşük geri basınçta dahi kütle aktarımını sağlayarak ayrımlar hızlı gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte dolgulu kolonlara ilişkin, sabit faz

parçacıklarının bir kapilerde doldurulma işlemi sırasında kolonun bir bölümünü sinterleyerek kolayca kırılmaların meydana gelebilmesi ve fritlerin hazırlanması sürecinde meydana gelen hava kabarcığı oluşumu gibi problemler göz önünde bulundurulduğunda monolitik kolonların tercih edilebilirliği daha çok kendini göstermektedir [27-30].

Polimer kolonlar ve silika tabanlı kolonlar, monolitik kolonların yapısal olarak iki temel grubunu oluşturmaktadır. Polimer kolonlar, CEC uygulamalarında monolitik silika kolonlara göre daha düşük fiziksel kararlılık göstermesine rağmen, yüksek kimyasal kararlılığa sahip olması ve iyonik gruplarla türevlendirilerek hızlı EOF sağlayışı sebebiyle daha çok tercih edilmektedir [31].

Moleküler Baskılama Teknolojisi (MIT), kalıp molekül varlığında polimerleşebilen monomerlerin kullanılmasıyla regio- ya da stereo- seçici matrislerin elde edilmesi için bir stratejidir. Bu yöntem ile birlikte, fiziksel ve kimyasal kararlılığı yüksek moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) basit, pratik, maliyeti düşük ve çevre dostu olması gibi avantajlarıyla hazırlanabilir. Dolayısıyla, moleküler baskılanmış polimerlerinin önemli bir araştırma alanı da kiral sabit faz (CSP) malzemeleri olarak başta HPLC ve CEC olmak üzere mikro ayırma kolon tekniklerinde kullanılabilmeleridir [32].

Kapiler elektroforezde (CE), mikro ölçekli analitik ayırımlarda enantiyomerlerin uygun ayırımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Kromatografik analizlerde moleküler baskılanmış kiral sabit faz malzemeler için zayıf seçicilik ve düşük çözünürlük gibi olumsuzluklar, seçilmiş moleküler baskılanmış polimerde, özellikle non-kovalent (kovalent olmayan) baskılama yönteminde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında seçici olmayan iyonik ve hidrofobik etkileşimlerin artırılması yoluyla seçiciliği geliştirilerek giderilebilmektedir [33].

Literatürde, CEC sistemine yönelik moleküler baskılanmış polimerlere ait çalışmaların büyük çoğunluğu, kiral ayırımlarda enantiyomerlerden bir tanesinin kalıp molekül olarak kullanıldığı ve moleküler baskılanmış polimerlerin ise seçici faz olarak kullanılmalarıyla ilgilidir. Bunun nedeni, gözlenen seçiciliğin gerçekten moleküler baskılamanın varlığı ile bağlantılı olduğunun ispatlanmasının basit olmasıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin seçici faz olarak CEC ayırımında kullanılmasına ilişkin ilk denemeler 1994 yılında gerçekleşmiştir [34]. Bu

çalışmanın hemen ardından ise MIP-CEC yöntemiyle enantiyomerik ayırım literatürde ilk kez yer almıştır. Bu ilk çalışmanın temeli, çeşitli yöntemler dâhilinde kapiler içerisinde yığın polimerizasyonu sonrası moleküler baskılanmış polimerlerin immobilize edilmesine dayanmaktaydı. Bu gelişme ile birlikte 1997 yılında ise ilk kez moleküler baskılanmış süper gözenekli monolitik kolonların üretildiği literatürde yer almıştır [35]. 1990'lı yılların sonlarına doğru Açık-Tübüler CEC uygulamalarına yönelik moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasına yönelik yeni girişimler rapor edilmiştir [36,37]. CEC sistemindeki kolon teknolojisine yönelik gelişmelerden bir yenisi ise nanopartikül dolgulu MIP'lerin, CEC sistemindeki uygulamalarda yer almaya başlamış olmasıdır [38].

Sunulan bu tez çalışması kapsamında fonksiyonel monomer olarak aminoasit tabanlı N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) monomeri seçilerek, moleküler baskılama yöntemi ile hidrofobik aminoasitlerin (fenilalanin, triptofan ve tirozinin) enantiyomerik ayırımında kullanılmak üzere hidrofobik karakterli monolitik CEC kolonu hazırlandı. Hazırlanan CEC kolonunun morfolojik özelliklerinin incelenmesi için Taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı kullanılmıştır. Monolitik kolonun, yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri için Brunauer-Emmet-Teller (BET) analizi gerçekleştirilmiştir. Monolitik kolonun karakterizasyon çalışmaları kapsamında yapılan bir diğer analiz işleminde FTIR-ATR spektrofotometre analizleri gerçekleştirildi. Kromatografik performanslarının yanı sıra monolitlerin geçirgenlik özelliklerinin artırılması için gözenek oluşturunca, çapraz bağlayıcı, monomer oranı ve polimerizasyon süresi gibi parametrelerin değiştirilmesiyle farklı sentez koşulları incelendi. Optimum geçirgenlik elde edilmesi sonrasında alkil benzen türevli bileşikler kullanılarak monolitlerin kromatografik performansları tayin edildi. Bu çalışmada, enantiyomerik ayırımları incelenmek üzere triptofan, fenilalanin ve tirozin, hidrofobik aminoasitler olarak seçildi ve hazırlanan MAPA bazlı CEC kolonunda optimizasyon parametrelerinin incelenmesi amacıyla, akımın, basıncın, organik çözücünün derişiminin etkisi ve enantiyomerik türün tespitine yönelik farklı koşullar altında enantiyomerik ayırımlar gerçekleştirildi. Çalışma kolonunun verimliliğini ve hızını incelenmesi amacıyla teorik tabaka değerleri ve teorik tabaka yükseklikleri hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının yapılmasının ardından, moleküler baskılanmış kolon ile baskılanmamış kolonun ayırma performansı elektrokromatografik olarak karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromatografiye Giriş

Kromatografi, karışımın içerisinde yer alan bileşenlerin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden sürüklenerek ayrılması prensibine dayanmaktadır. Adsorpsiyon (sıvı-katı), partisyon (sıvı-katı), afinite (iyon değişirme) ve molekül büyüklüklerinin farklı olması gibi moleküller arası birtakım ilişkilere bağlı parametreler, moleküllerin birbirinden ayrılması sürecindeki etkili olmaktadır [39,40]. Bu etmenlere bağlı olarak karışım içerisinde yer alan bileşenlerden bazıları sabit faz üzerinde daha fazla tutunarak kromatografik sistemi daha geç terk ederken, diğer bazı bileşenler ise sabit faz üzerinde daha az tutunarak ve buna bağlı olarak da sistemden daha hızlı ayrılmaktadır [41].

Kromatografi prensibinde sabit faz, hareketli faz ve ayrılan moleküller olmak üzere 3 temel unsur bulunmaktadır. Sabit Faz faz daima katı bir faz olabileceği gibi, katı yüzeyinde adsorplanmış sıvı bir destek maddesi de olabilmektedir. Hareketli Faz ise Bu faz her zaman sıvı ya da gaz bileşenlerden oluşmaktadır. Bir diğer temel unsur ise ayrılması istenen moleküllerdir. Moleküllerin birbirinden ayrılmasında hareketli faz, sabit faz ve karışım içerisindeki moleküller arasındaki etkileşimler etkili olmaktadır. Partisyona dayalı kromatografi metdoları moleküllerin ayrılmasında etkili olduğu gibi, amino asitler, karbonhidratlar ve diğer yap taşlarını içeren küçük moleküllerin tanınmasını sağlar. Buna karşılık afinite kromatografisi ise nükleik asit ve proteinler gibi makro moleküler bileşiklerin ayrılmasında çok daha etkili olmaktadır. Kâğıt kromatografisi proteinlerin ayrılmasında kullanıldığı gibi protein sentez ile ilgili çalışmalarda uygulanabilmektedir. Gaz-sıvı kromatografisi alkollerin, esterlerin, lipidlerin ve amino gruplarının yanı sıra enzimatik reaksiyonların takibinde yararlanılabilmektedir. Proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde ise Moleküler-Elek kromatografisi işlev görmektedir. DNA, RNA parçacıkları ve virüslerin saflaştırılmasında Agar-Jel Kromatografisi uygulanabileceği literatürde yer almaktadır [42].

Kromatografide sabit faz olarak katı faz ya da katı fazın yüzeyinde yığılmış sıvı tabaka maddeler kullanılabilir. Hareketli faz, sabit faz üzerinden gaz ya da sıvı

maddeler olarak geçiş akışkanlık göstermektedir. Eğer hareketli faz sıvı ise bunun adını Sıvı Kromatografisi (LC) ya da gaz ise Gaz Kromatografisi (GC) adını almaktadır. Gaz kromatografisi, gazların yanı sıra uçucu sıvılar ve bazı katı malzemelerin ayrılmasında kullanılabilir. Sıvı kromatografisi ise termal açıdan kararsız ve uçucu olmayan malzemeler için uygulanabilir [43].

Kromatografi uygulamaları, moleküllerin ayırımını temel almasının dışında kantitatif analiz yapmayı ve ayırımın uygun bir zaman aralığı içerisinde gerçekleştirilmesini amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda yeni kromatografik sistemler geliştirilmektedir. Bu yöntemler içerisinde yer alan başlıca yöntemler şunlardır: Kolon Kromatografisi, İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), İyon Değişirme Kromatografisi, Kâğıt Kromatografisi, Gaz Kromatografisi, Jel Kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Afinite Kromatografisidir [44].

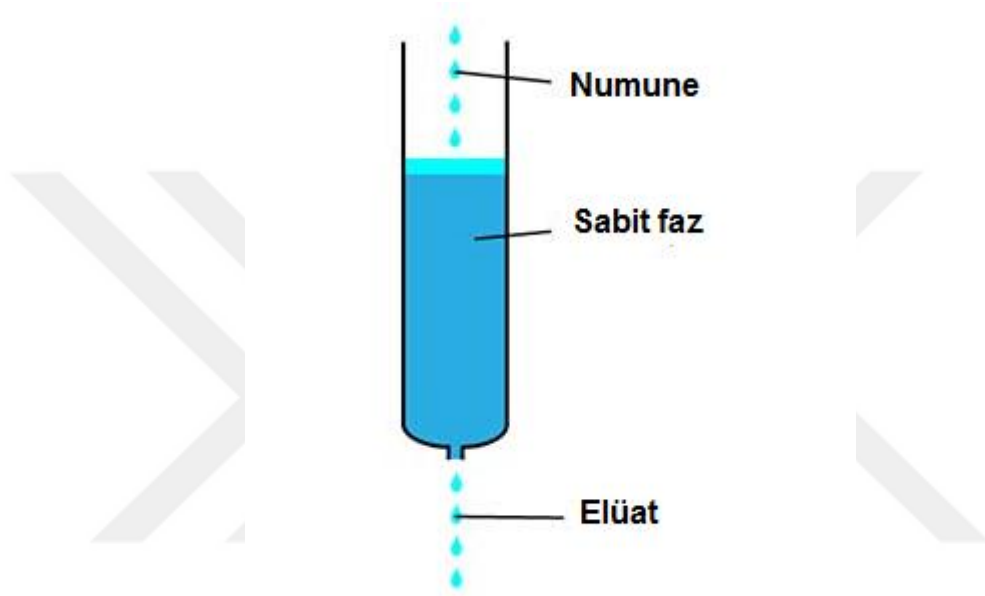
2.1.1. Kromatografi Çeşitleri

- Kolon Kromatografisi
- İyon Değişirme Kromatografisi
- Jel (Moleküler Elek) Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi
- Kağıt Kromatografisi
- İnce-Tabaka Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi
- Boya-Ligand Kromatografisi
- Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
- Psödo Afinite Kromatografisi
- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

2.1.1.1. Kolon Kromatografisi

Proteinlerin sahip olduğu yapısı, büyüklüğü, toplam net yük, sabit faz olarak kullanılabilmesi ve bağlanma kapasitesi gibi çeşitli karakteristik özellikler sebebiyle

kromatografik metodların kullanılması yoluyla saflaştırılması gerekmektedir. Kolon kromatografisi ise bu amaç doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Kolon kromatografisi, biyomoleküler bileşiklerin saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemde kolonda ilk önce madde ayrılır. Ardından, hareketli faz uygulanır. Kolondan hareketli faz geçirilmesi ardından numune zaman ve hacme bağlı olarak toplama kabına alınır [45].



Şekil 2.1. Kolon Kromatografisi örneği.

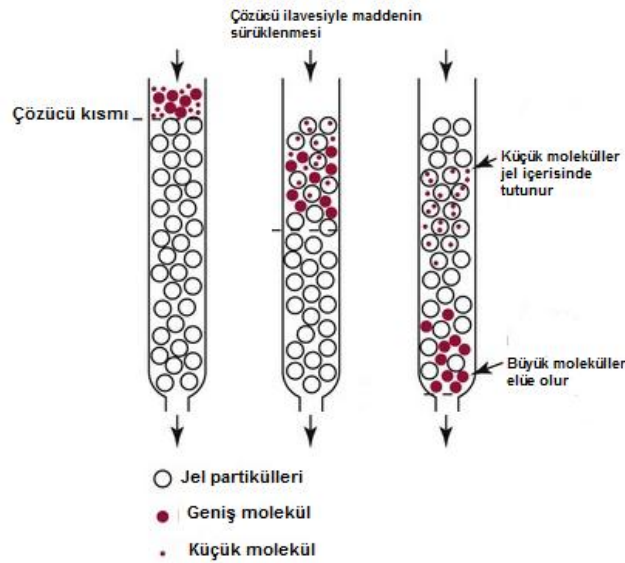
2.1.1.2. İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değişirme kromatografisi, yüklü protein grupları ile matriks olarak kabul edilen katı destek malzemesi arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanmaktadır. Proteinin ayrılabilmesi için matriksin iyon yükü ile ayrılacak numunenin yükü karşılıklı zıt olmalıdır ve protein ile kolon afinitesinin uyumluluğu iyonik etkileşimler ile gerçekleştirilebilir. Kolondan proteinlerin ayrılması ise pH değişikliği, tampon çözeltinin iyonik şiddeti ve tuz çözeltilerinin derişimine bağlı olarak gerçekleşir [46]. Pozitif yüklü iyon değıştirici matriksler anyon değıştirici matriks olarak tanımlanır ve negatif yüklü proteinleri adsorplar. Buna göre negatif yüklü iyon değıştirici

matriksler ise katyon değiştiriciler olarak pozitif yüklü proteinleri adsorplamaktadır [47].

2.1.1.3. Jel Filtrasyonu (Moleküler Elek) Kromatografisi

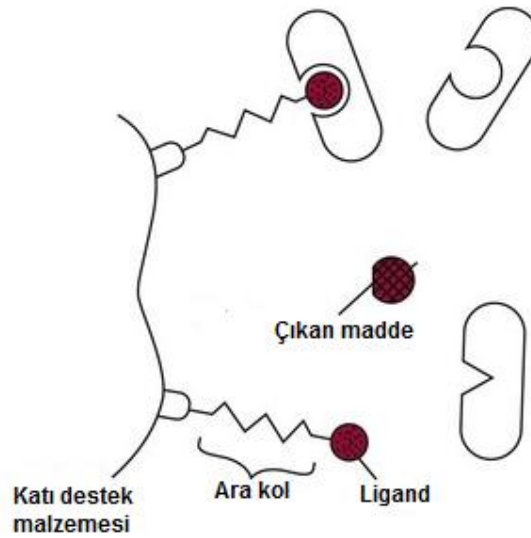
Jel Filtrasyonu (Moleküler Elek) kromatografisinde makromoleklerin ayrılması için bu moleküler yapıların büyüklüklerinden doğan farklılıklara bağlı olarak dekstran içeren malzemelerin kullanılması prensibi yatmaktadır. Bu yöntem, proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi ve protein zltilerinin iyon derişimlerinin azaltılmasında kullanılır [48]. Jel Filtrasyonu kromatografisindeki kolonlarında kullanılan sabit faz malzemeleri, küçük gözenekli inert moleküller içermektedir. Farklı boyutlardaki moleküller içeren karışım, sabit akış hızı ile kolondan sürekli olarak geçirilmektedir. Gözenek boyutundan daha büyük çaplı moleküller jel parçacıklarında nüfuz edilemezken, moleküller parçacıklar arasında sınırlı bir alanda tutulmaktadır. Geniş boyutlu moleküller kolon içerisinde gözenekli parçacıklar arasında kalan boşluk kısımdan geçer. Gözenek boyutundan küçük moleküller ise gözenekler içerisinde tutulurken, moleküllerin boyutları küçüldükçe alıkonma süreleri de ona bağlı olarak uzamaktadır [49]. Sephadex G tipi malzeme en sık kullanılan kolon malzemesidir. Dekstran, agaroz, poliakrilamid grubu bileşikler ise diğer yaygın olarak kullanılan kolon malzemeleridir [50].



şekil 2.2. Jel Filtrasyonu rneği.

2.1.1.4. Afinite Kromatografisi

Bu kromatografi yöntemi enzimler, hormonlar, antibadiler, nükleik asit ve bazı özel proteinlerin saflaştırılması işleminde kullanılmaktadır [51]. Dekstran, poliakrilamid ya da selüloz gibi yapılar içeren çeşitli özel proteinler ile kompleks oluşturabilen ligandlar kolonun dolgu malzemesi ile bağlanırlar. Ligandlar ile kompleks oluşturabilen proteinler matrikse tutunur ve kolonda yeniden alıkonurken, serbest protein ise kolondan ayrılır. Bu ayrılma işlemi pH değişikliği, iyonik şiddet etkisi ya da tuz çözeltisi ilavesiyle gerçekleşir [52].



Şekil 2.3. Afinite Kromatografisi.

2.1.1.5. Kağıt Kromatografisi

Kâğıt kromatografisinde destek malzemesi olarak suyla doyurulmuş selüloz tabakası kullanılmaktadır. Bu yöntemde destek malzemesi olarak filtre kağıt su ile desteklenerek gözenekleri su damlaları ile dolar ve sabit faz sıvı faz halini alır. Tankın içerisinde yer alan uygun sıvı ise hareketli fazı oluşturur. Kâğıt kromatografisi aynı zamanda sıvı-sıvı kromatografisidir [53].

2.1.1.6. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, yapılış tekniği açısından kağıt ve adsorpsiyon kromatografisi ile benzerlikler göstermektedir. Bu yöntemde, sabit faz olarak silikajel, talk, aliminyum oksit, toz sellüloz, diatomeli topraklar gibi maddeler kullanılır. Bu malzemeler su ile bulamaç haline getirilerek özel olarak hazırlanmış cam veya metal levhalar üzerine ince bir tabaka halinde yayılarak kurutulur. Kurutma işlemi oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Eğer bu işlem oda sıcaklığında gerçekleştirildiği takdirde tabaka da ince bir su filmi kalabilir ve bu durumda bu kromatografi yöntemi sıvı-sıvı kromatografisi olarak da adlandırılabilir. Daha yüksek sıcaklıkta gerçekleştiği halde ise bu kez tabaka üzerinde su filmi kalmayacağından kromatografi yöntemi katı-sıvı (adsorpsiyon) kromatografisine benzer [54].

2.1.1.7. Gaz Kromatografisi

Bu yöntemde sabit faz, cihaz içerisine yerleştirilmiş ve inert katı yüzey üzerinde adsorplanmış sıvı faz içeren kısmı temsil etmektedir. Gaz kromatografisi, Gaz-sıvı kromatografisidir. Hareketli faz, neon ya da azot gazlarından oluşur. Kolon boyunca yüksek basınç altında gaz geçirilmektedir. Analiz edilecek numune buharlaştırılarak gaz haline dönüşür ve hareketli faza girer. Numunedeki bileşenler, katı faz ile hareketli faz arasındaki kısımda dağılmış halde bulunurlar. Gaz kromatografisi basit, çok yönlü uygulamalarının yanı sıra son derece hassas ve hızlı uygulanabilen bir teknik olması ile birlikte çok düşük seviyedeki numunelerin ayrımında kullanılabilmektedir [55].

2.1.1.8. Boya-Ligand Kromatografisi

Bu tekniğin geliştirilmesi, Cibacron Blue F3GA boyası için birçok enzimin, pürin nükleotitlerine bağlanma kabiliyetinin ispatlaması amacına dayandırılmıştır [56]. Negatif yüklü gruplu düzlemsel halka yapısı, NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotitin)'in yapısına benzerdir. Bu benzerlik, Cibacron Blue F3GA boyasının NAD'nin bağlanma bölgelerinden adenin ve riboz bölgesine bağlanmasıyla kanıtlanmıştır. Boya, ADP(Adenozin difosfat)-riboz yapısına benzer

davranmaktadır. Diğer adsorbentlerin aksine ise 10-20 kat daha fazla bağlanma kapasitesine sahiptir. Uygun pH seçimi, yüksek iyonik şiddete dayalı çözeltilerle ve adsorbentlerin iyon değiştirme özelliğinden yararlanılarak adsorbe olmuş proteinlerin kolondan ayrılması gerçekleştirilebilmektedir [57,58].

2.1.1.9. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)

Afinite kromatografisinde ligand bağlayıcı olarak kullanılmış adsorbentler, bu yöntemde kolon malzemesi olarak hazırlanır. HIC yöntemi, kromatografi matriksine bağlı yan zincirler arasındaki etkileşimlere dayalıdır [59,60].

2.1.1.10. Psödo Afinite Kromatografisi

Azo boyalar ya da antrakinon boya ları gibi bazı bileşikler, transferaz, dehidrojenaz, redüktazlar ve kinazlar gibi bazı enzimlere karşı afiniteleri sebebiyle ligand olarak değerlendirilebilirler. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC), bu tip kromatografi yöntemi olarak en yaygın olarak bilinen kromatografik yöntemdir [61].

2.1.1.11 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bu yöntemi kullanarak birçok molekülün yapısal performansının ve fonksiyonel analizinin gerçekleştirilmesinin yanı sıra çok daha kısa süreler içerisinde birçok molekülün saflaştırılması mümkündür. Aminoasitler, karbohidratlar, yağlar, nükleik asitler, proteinler, steroidler ve birçok biyolojikçe aktif moleküllerin ayrılması ve belirlenmesi işleminde HPLC mükemmel sonuçlar verebilmektedir. HPLC’de hareketli faz, 10-400 atmosfer basıncı arasında değişen basınç ve 0.1-5.0 cm/sn aralığındaki akış hızı ile kolondan geçirilmektedir. Bu yöntemde çok küçük miktarda parçacıkların kullanılması ve çözücünün akış hızında yüksek basıncın uygulanması, HPLC’nin ayırma gücünü arttırmakta ve analiz süresini de kısalmasını sağlar. HPLC için gerekli başlıca bileşenler; çözücü deposu, yüksek basınç tankı, ticari kolon, dedektör ve kaydedicidir. Analiz işlemi bilgisayar ortamında takip edilerek kaydedilir [62].

2.1.2. Kromatografinin Uygulama Alanları

İlk zamanlarda kromatografi, maddelerin renkleri vasıtasıyla birbirlerinden ayrılması için kullanılmaktayken, uygulama alanı gün geçtikçe genişlemektedir. Günümüzde ise oldukça hassas ve etkili ayırma yöntemi olarak kabul edilmektedir. Kromatografi yöntemi biyokimyacılar için çok değerli bir teknik olmasıyla birlikte tıbbi laboratuvar çalışmalarında kolaylıkla uygulanabilmektedir. En kullanışlı ve ayırma ve belirleme yöntemlerinden olan kolon kromatografisi vasıtasıyla, proteinlerin sahip olduğu karakteristik özellikler üzerinden saflaştırılmaları mümkün olmaktadır. Daha küçük biyolojik yapı taşları olarak amino asitler, karbohidratlar, nükleik asitler, karbohidratlar antibiyotikler ve ilaçların saflaştırılmasında, yüksek derecede hassaslık, hızlı sonuç alabilme gibi sahip olduğu özelliklerle en etkili kantitatif metotlardan bir tanesi şüphesiz HPLC'dir. Diğer yandan, kağıt kromatografisi kalıtsal metabolizma bozukluklarının belirlenmesinde vücut sıvılarında bulunan çeşitli şeker ve amino asit türevlerinin tespitinde kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi, laboratuvarlarda lipid, steroid ve barbitürat ölçümünde kullanılır [63].

2.2. Elektroforez ve Kapiler Elektrokromatografi

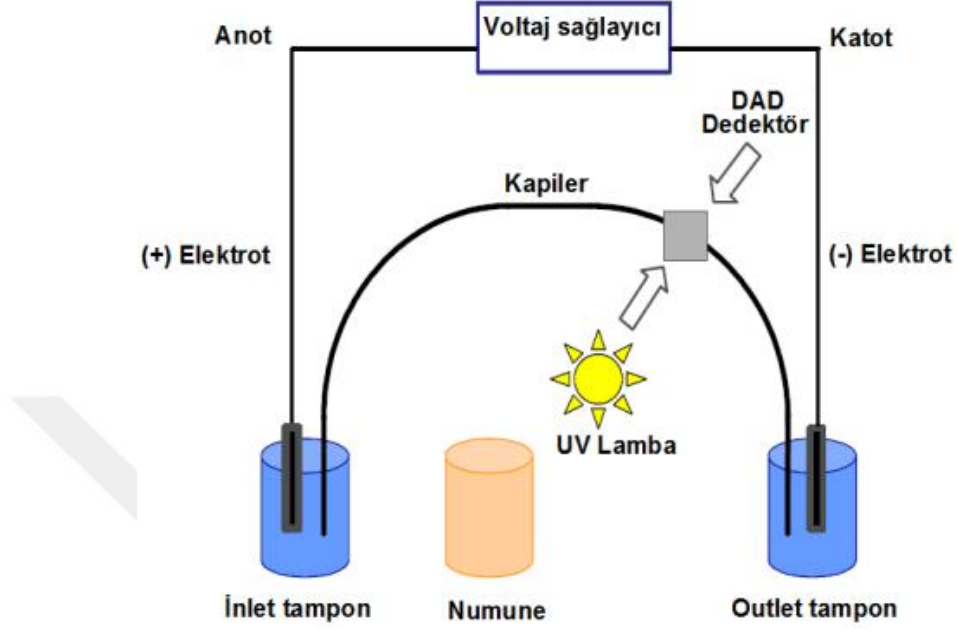
2.2.1. Elektroforez

Bir çözeltideki iyonların uygulanan elektrik potansiyeli vasıtasıyla göç etme olayına elektroforez denir. İyonların hareketliliği esnasında katyonlar, eksi yüklü elektrod olarak katoda ve anyonlar ise artı yüklü elektrod olan anoda doğru göç ederler. Uygulanmakta olan elektrik potansiyellere karşılık, her iyonun kendine özgü göç etme hızı bulunmaktadır [64].

2.2.2. Kapiler Elektroforez (CE)

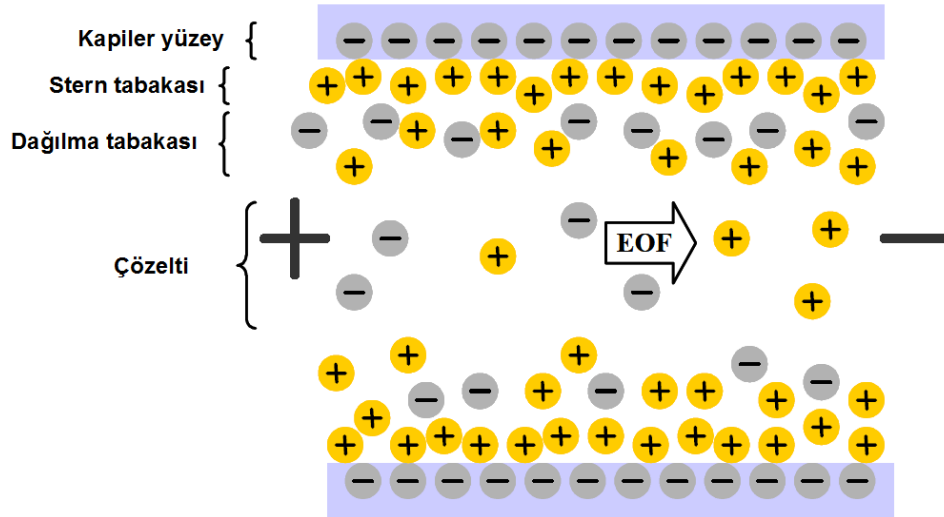
Uygulanan elektriksel alan yardımıyla, silika kapiler kolon içerisindeki biyo moleküllerin hareket ederek göç etmesi esaslı kapiler elektroforez olarak bilinir [65]. Kapiler elektroforez sisteminin çalışma prensibi genel itibarı ile Şekil 2.4.'de gösterilmiştir. Buradan anlaşılacağı gibi, silika kapiler kolon, elektriksel voltaj uygulayıcı, dedektör, UV lamba, elektrolit çözeltisi ve numune sistemin temel

bileşenlerini oluşturur. Kapiler elektroforezde analitlerin ayırmında temel sürücü güç elektroozmotik akış (EOF)'dir.



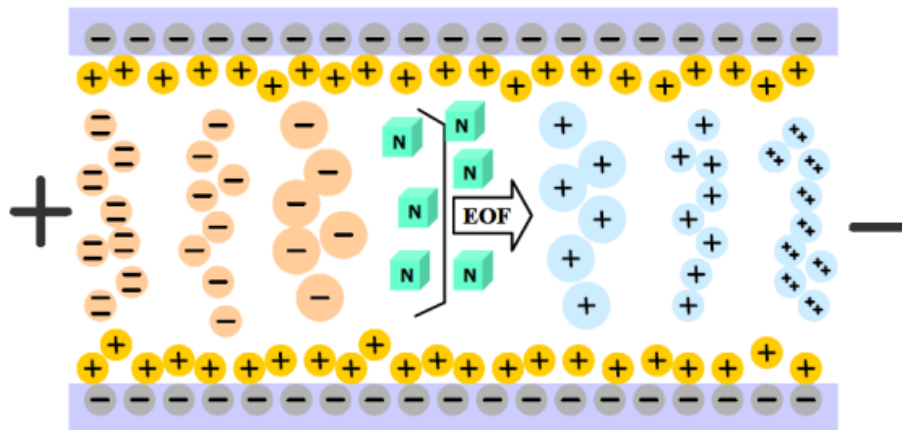
Şekil 2.4. Kapiler elektroforez sistemi

Şekil 2.5.'de silika kapiler kolon içerisindeki EOF oluşumunu göstermektedir. Bazı koşullarda (veya $pH > 3.5$), silika kapiler yüzeyinde silanol grupları, negatif yüklü silanat şekline dönüşür ve elektrolit çözeltisinin pozitif iyonları negatif yüzey tarafından çekilerek elektrostatik etkileşim ile elektriksel çift tabaka oluşur. Elektrolit çözeltisi içerisinde bulunan pozitif iyonların çoğu ikinci bir dağılma tabakasında bulunur ve elektriksel alan uygulanması ile pozitif iyonların katoda, negatif iyonların anoda doğru hareket etmesi EOF olarak açıklanır.



Şekil 2.5. Elektroozmotik akış (EOF) oluşumu [66].

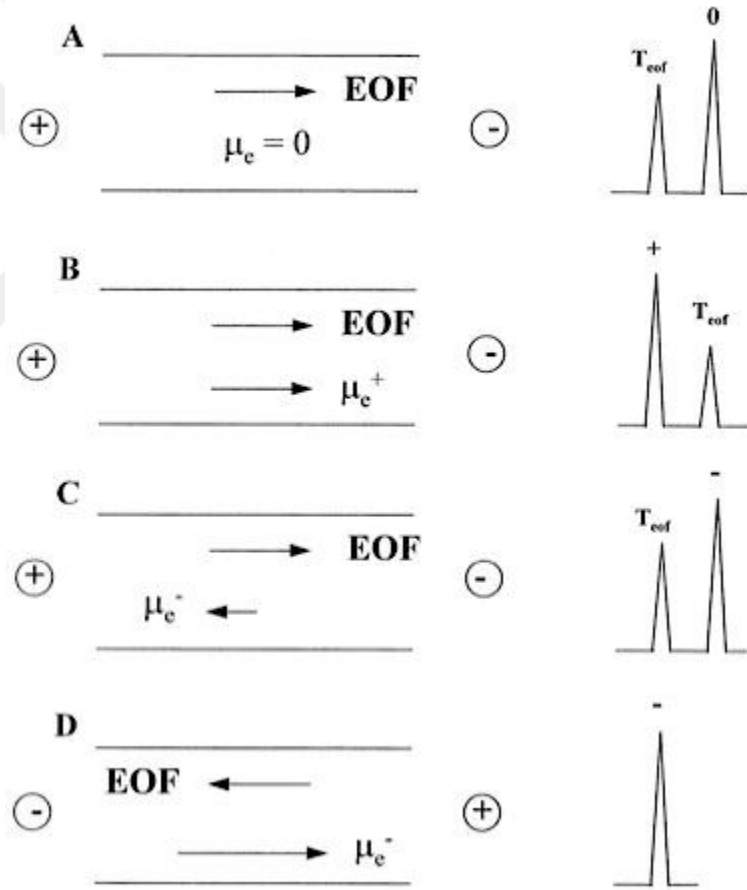
Elektriksel alan uygulanmış bir kapiler kolon içerisindeki iyonların durumu Şekil 2.6.'da gösterilmektedir. Uygulanmakta olan elektriksel alan ve oluşturulan EOF etkisiyle iyonlar, kolon boyunca hareket halindedir. Örnek numune içerisinde yer alan bileşenlerin birbirinden ayrılıp, kolonu terk etmesi ise kapiler elektroforez ile uygulanmakta olan elektriksel alan ile sağlanır. Anlaşılabacağı üzere, iyonların kendi elektroforetik hareketleri ile birlikte elektroozmotik akış (EOF), hareketli faz ile birlikte yürütülen iyonların hareketinde çok büyük bir katkısı vardır [66].



Şekil 2.6. Kapiler kolon içerisine elektriksel alan uygulaması ve EOF ile analitlerin hareketi [66].

Yüksüz bileşikler, HPLC ve CEC sistemlerinde hareketli faz ile aynı yönde eğilim gösterirken, sabit faza karşı afinitelerine göre ise sistemi farklı zamanda terk

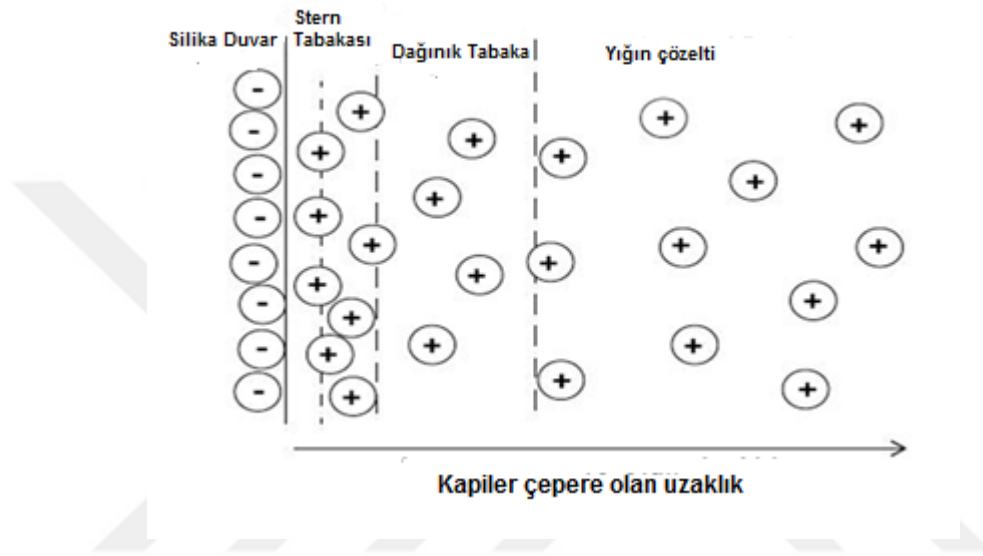
ederler. Bu duruma ilişkin temsili gösteri, şekil 2.7.A'da yer almaktadır. Ancak, numunenin yüklü bileşenler içermesi halinde iyonların kendi elektroforetik hareketlenmeleri ve yöneltmelerinin türü ve büyüklüğüne göre analitlerin kolonda alıkonma süreleri değişiklik gösterebilmektedir. Kolonu daha hızlı terk eden moleküllere baktığımızda, elektroozmotik akış (EOF) ve elektroforetik hareketlenmenin aynı yönlü olduğunu görmekteyiz (şekil 2.7.B.). EOF ile elektroforetik hareketlenme aynı yönde değil ve EOF, elektroforetik hareketlenmeden daha hızlı ise analit kolonu, EOF işaretleyicisine nazaran daha geç terk eder (şekil 2.7.C). Bu durumunda tersi olay halinde ise EOF işaretleyicisi kolonu terk edemez ve örnek numune içerisindeki bileşenlerin tayini gerçekleştirilebilir (şekil 2.7.D).



Şekil 2.7. (A-D) Kapiler elektrokromatografi sisteminde farklı yüklere sahip analitlerin hareketi [67].

Elektriksel çifte tabakayı inceleyecek olursak, sıkı ve dağınık tabaka olmak üzere iki bölgeden oluşmaktadır. Dolgu maddesinin yüzeyinde yer alan iyonlaşma

özelliğine sahip grupların iyonlaşmasıyla, negatif yüklü hale gelirler ve hareketli faz içerisindeki pozitif yüklü iyonlar ile etkileşime girerek “Stern Tabakası” adı verilen sıkı ve hareketsiz bir bölge oluştururlar. Artan yüklü iyonlar ise hareketli faz içerisinde dağılırlar. İyonların düzensiz bir biçimde bulunduğu bu dağınık bölgeye ise “Goüy Tabakası” olarak adlandırılır. Bu bölgedeki iyonlar ise çözelti bileşeni özelliği göstermektedir. Elektriksel Çifte Tabaka’ya istinaden örnek sunum, şekil 2.8.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Silika duvarda Elektriksel Çifte Tabaka yapısı [68].

Toplam iyon derişimi ile kıyaslandığında Elektriksel Çifte Tabaka içerisindeki yük derişiminin daha düşük olduğu bilinir ve bu derişim farkı, dolgu malzemesinin yüzeyinden uzaklaştıkça daha da artmakta, diğer bir deyişle ise toplam iyon derişimi daha da azalmaktadır. Bu durum neticesinde iyon derişimine paralel olarak elektriksel potansiyelde azalmaktadır. 0-100 mV arasında bir değere sahip olan “Zeta Potansiyeli”, Stern Tabakası ile Elektriksel Çifte Tabakanın iyonlarını barındırdığı kısım arasındaki elektrik potansiyeli olarak tanımlanmakta ve “ ζ ” ile gösterilmektedir. Buna göre, Dolgu malzemesinin yüzeyinden uzaklaştıkça yük yoğunluğu da azaldığından elektriksel potansiyel azalmaya devam eder. Elektriksel Çifte Tabakanın kalınlığı, zeta potansiyelinin 0.37 katı olduğu yer olarak belirlenir ve “ δ ” ile ifade edilir. Zeta potansiyelinin hesaplanmasına ilişkin hesaplama eşitlik 2.1.’de sunulmuştur. Buna göre, zeta potansiyelinin büyüklüğü; elektriksel çifte tabaka kalınlığı “ δ ” ve yüzeydeki yük miktarına “ σ ” göre

değişim gösterirken, elektriksel geçirgenlik " ε_0 ", dielektrik sabiti ise " ε_r " ile ifade edilmektedir.

Zeta potansiyeli, " ζ " aşağıda verilen Eşitlik 2.1.'deki bağıntıyla hesaplanabilmektedir.

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

Elektriksel çifte tabaka kalınlığı ise elektriksel geçirgenlik," ε_r ' ve elektrolit çözeltisinin iyonik gücüne, " I " bağlıdır. Bu eşitlikte yer alan Burada F , R^* , ve T sırasıyla Faraday sabiti, ideal gaz sabiti ve mutlak sıcaklığı temsil eder.

Elektriksel Çifte Tabaka Kalınlığı," δ " aşağıdaki eşitlik 2.2'de gibi hesaplanmaktadır.

$$\delta = \sqrt{\frac{(\varepsilon_0 \times \varepsilon_r \times R^* \times T)}{(2F^2 \times I)}} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

Eşitlik 2.2.'den anlaşılacağı üzere, çözeltinin iyonik gücü ile elektriksel çifte tabaka kalınlığı ters orantılı olarak değişmektedir [69].

Kapiler kolon boyunca uygulanan elektriksel alan sonrası oluşan elektroozmotik akışın büyüklüğü," μ_{EOF} " ise zeta potansiyeli ile doğru, hareketli faz çözeltisinin viskozimetresi, " ρ " ile ters orantılı olarak değişmekte olup, eşitlik 2.3.'deki bağıntıyla bulunur.

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon_0\varepsilon_r\zeta}{\rho} \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

Kapiler elektroforez farklı metodları kullanılır.

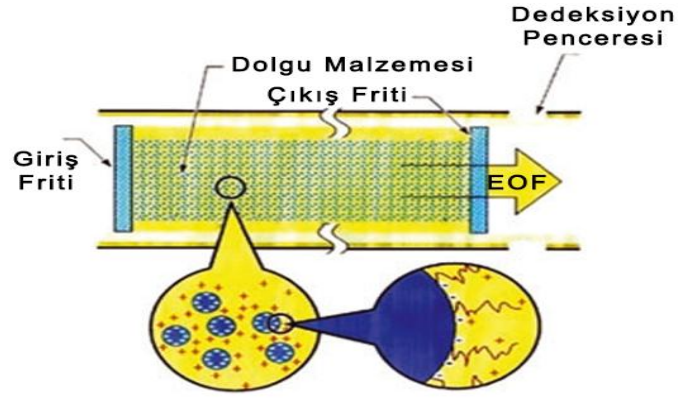
- i) Kapiler zone elektroforez (CZE)
- ii) Kapiler jel elektroforez (CGE)

- iii) Kapiler izotakoforez (CITP)
- iv) Kapiler izoelektrikfokoslama (CIEF)
- v) Miseller kapiler elektrokinetik kromatografi (MEKC)
- vi) Kapiler elektrokromatografi (CEC)

Kapiler elektroforez yönteminde bileşenlerin ayırımı buffer çözeltisi ile numune çözeltisinin kısa süreli yer değiştirerek numunenin hidrodinamik veya elektrokinetik uygulaması ile gerçekleştirilir. Elektroforez ve kromatografi tekniğinin kombinasyonu ile oluşturulmuş kapiler elektrokromatografi (CEC) en çok kullanılan kapiler elektroforez metodlarından biridir [70].

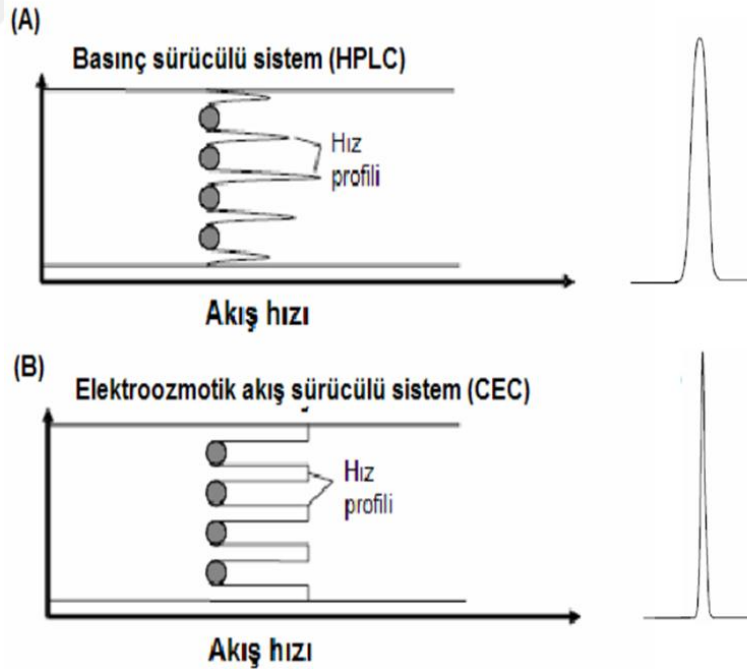
2.2.3. Kapiler Elektrokromatografi

Elektrokromatografi, çok küçük çaplı ve dolgulu bir kolon içerisinde hareketli fazın yürütülmesi amacıyla, tıpkı HPLC'de hidrolik basınç kullanımının yerine, elektroosmozun yürütücü kuvvet olarak tercih edilmesiyle uygulanan kromatografi tekniklerinden bir tanesidir [71]. Kapiler Elektrokromatografi (CEC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Kapiler Elektroforez (CE) tekniklerinin birleşimi olarak tanımlanmaktadır. CEC'in kapiler kolon içerisindeki hareketli fazın, elektroosmotik akış (EOF) ile yürütülerek sabit faz ile etkileşiyor olması yüksek seçicilik, yüksek verimlilik ve yüksek çözünürlüğün yanı sıra kullanılan numunenin miktarı ve çözücü sarfiyatı açısından avantaj sağlamaktadır. Elektroosmoz, elektrik alan yardımı ile sabit faz ile etkileşim halinde hareketli fazın yürütülmesi işlemidir ve elektroosmotik akış da hareketli faz ile sabit faz arasında meydana gelen Elektriksel Çifte Tabaka (Electrical Double Layer) ile sağlanır. Şekil 2.9.'da elektroosmotik akış şeması gösterilmektedir [68]. Elektroosmotik akış (EOF)'nin takibi, pH, iyonik güç ve organik modifiye edici gruplar üzerinden yürütülebilir [72].



Şekil 2.9. Elektroozmotik (EOF) akış şeması [68].

Yürütücü kuvvet olarak HPLC sisteminde hidrolik basınç kullanılması parabolik akış oluşmasına neden olurken, CEC sisteminde ise elektriksel alan uygulaması ile düz akım oluşur ve şekil 2.10.'da gösterildiği gibi tıpa tıpa (plug flow) akış profiline sahip EOF (Elektroozmotik akış) meydana gelir. Bu durumda daha yüksek verimle birlikte daha yüksek pik kapasitesine ulaşılır ve etkin kromatografik ayırım gerçekleşmiş olur.



Şekil 2.10. (A) HPLC ve (B) CEC sistemlerinde elde edilen akış profilleri ve analit pikleri [66].

EOF, CEC ve CE'de ortak olarak kullanılan yürütücü kuvvet iken, analitlerin ayrımı ise yalnızca elektroforetik hareketliliğe bağlı olmayıp, hareketli faz ve sabit faz arasındaki etkileşim de büyük önem taşımaktadır. CEC'in, ayrıca CE'den farklı olarak hareketli faz ile sabit faz arasında etkileşimi ise Elektriksel Çifte Tabaka ile sağlanmaktadır. CEC, CE ve HPLC'ye nazaran kolon içerisinde sabit faz içermesi sebebiyle daha yüksek pik kapasitesi ve seçiciliği vardır. Yürütücü kuvvet olarak EOF'nin kullanılması ve içerdiği dolgu kolon neticesinde yüksek ayırma performansına ulaşılabilmektedir [71]. CE ile CEC arasında elektroosmotik akış üzerinde katkı vermek açısından kaynak bakımından farklılık yaşanmaktadır. CE'de kapiler duvar üzerindeki yüzey yükleri EOF'yi sağlarken, CEC'de ise bu katkı partiküllerden gelmektedir. CEC için düşünüldüğünde partiküllerin çeşitliliğinin yanı sıra silanol gruplarının ve diğer bağlı grupların miktarı da EOF akışı üzerinde etkisi bulunmaktadır. Sabit faz olarak kullanılmakta olan silika kolonlar için yüzey alanı ve boyut farklılıkları temel alınarak ticari olarak temin edilebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda silikaya bağlı alkil gruplarının takılması işleminde çeşitli üretici firmalar tarafından farklı yöntemler uygulanmaktadır [72].

Diğer bir deyişle kapiler elektrokromatografi, kapiler kolon boyunca uygulanan elektriksel alan vasıtasıyla sabit faz olarak kabul edilen kromatografik katı destek maddesinin kullanımıyla sıvı fazda gerçekleşen ayırma işlemi olarak da ifade edilebilir [73].

2.2.3.1. Kapiler Elektrokromatografi (CEC) Sisteminin Tarihsel Gelişimi

Elektriksel alan kullanımının kromatografik çalışmalarda ilk kez uygulanması 1939 yılında gerçekleşmiştir. Strain, boya maddelerini ayırmak için yaptığı çalışmada elektroosmotik akış vasıtasıyla analitlerin ayrılabilceğini göstermiştir. Bu çalışma sırasında alümüne içeren sabit faza elektriksel alan uygulamış ve adsorpsiyon kromatografisi tekniği ile birlikte kombine edilerek EOF'nin kullanılabilirliği ilk kez incelenmiştir [74]. 1949 yılında Shepard ve Tiselius tarafından yayınlanan çalışmada, elektriksel alan kullanımıyla jel boyunca bileşiklerin hareket ettirilebildikleri literatürde yer almıştır [75]. 1952 yılında yayınlanan bir çalışmada ise elektriksel alan ilk kez ince tabaka kromatografisinde kullanılmıştır [72]. 1974, Kapiler elektrokromatografi (CEC) sisteminin literatürde isminden ilk kez

bahsedildiği yıl olmuştur. Proterius ve arkadaşları, 1 mm çapındaki dolgulu kolonlarda elektromatografik uygulama gerçekleştirmişlerdir [76]. Jorgensen ve Lukacs'ın, 1981 yılında 170 µm çapında partiküllerle doldurulmuş kolonda elektrokromatografik ayırmayı incelemişler ve yüksek verimliliği rapor etmişlerdir [77]. açık tübiler ve dolgulu kolonların CEC sisteminde ilk kez kullanımı 1987 yılında gerçekleşmiştir [78]. 90'lı yılların başında Knox ve Grant'in yaptığı çalışmalarda CEC'in potansiyeline dair kayda değer gözlemler elde edilmiştir. Knox ve Grant, teorik tabaka yüksekliğini düşürdükleri bu çalışmalarda ise 1.5 µm'den düşük partikül boyutunda malzemeler ile 30-200 µm çapındaki ve uzunluğu 1 metreye ulaşan kolonlar kullanmışlardır. [79]. 1997 yılından itibaren ise makrogözenekli polibütülmetakrilat monolitik kolonlar kapiler elektrokromatografi (CEC) sabit fazı olarak kullanılmaya başlanmıştır [80]. 1994 yılından itibaren Smith ve Evans'ın C18 sabit fazını kullanarak CEC sisteminde çeşitli ayrımların gerçekleştirildiği çalışmalar ile birlikte CEC sistemi, ilaç sanayisine girmeye başlamıştır. Aynı grubun bir diğer çalışmasında ise bu kez katyon değiştirici fazlar kullanılarak, ilaçların ayrımı hususunda daha iyi sonuçlar elde edilmiştir [81,82]. Elektriksel alan uygulamasının kromatografi çalışmalarında ilk kez kullanılmasından itibaren CEC'in tarihsel gelişim süreci Çizelge 2.1.'de verilmiştir. 1939 yılından itibaren günümüze dek CEC üzerinde birçok teori, mekanizma ve format çalışmaları, kapiler elektrokromatografideki kolon teknolojileri, enstrümental içeriği ve çeşitli uygulama alanlarına yönelik gelişmeler yaşanmaktadır [83-85]. CEC'te kapiler kolon içerisindeki hareketli fazın, elektroosmotik akış (EOF) ile yürütülerek sabit faz ile etkileşiyor olması yüksek seçicilik, yüksek verimlilik ve yüksek çözünürlük gibi avantajları ile birlikte yeni bir sıvı-faz ayırma tekniği olarak literatürde gelişimini sürdürmektedir [71, 86-88].

Çizelge 2.1. Kapiler Elektrokromatografideki önemli gelişmeler [72].

Tarih	Gelişme
1939	Sıvı kromatografide (LC) elektriksel alan kullanımı
1943	Elektrokromatografi teriminin literatüre girişi
1952	İnce tabaka kağıt kromatografisinde (TLC) elektriksel alan kullanımı
1974	1 mm iç çaplı dolgulu kolonlardaki elektrokromatografi
1987	Dolgulu ve açık borusal kolonlardaki kapiler elektrokromatografi
1991	Kütle ile elektrokromatografinin kombinasyonu
1997	Monolitik gözenekli yapıların kapiler elektrokromatografide kullanımı

2.2.3.2. Kapiler Elektrokromatografi (CEC) Sistemleri

İç çapı 50 ile 100 μm arasında değişen yaklaşık 100 cm uzunluğundaki silika kolonlara dolgu malzemesi takviyesiyle kapiler elektrokromatografi kolonları elde edilir. Dolgu maddesi olarak ise genellikle çapı 1.5 ile 10 μm arasında değişen silika jeller kullanılmaktadır. Kolonlar, genellikle dolgu malzemesinin yüksek basınçlı pompalar ile doldurulmasıyla hazırlanır. CEC sistemindeki hareketli fazlar, akışın devamlılığını sağlayan çözeltiler içermektedir. Sıvı kromatografisi (LC) ile karşılaştırıldığında ise CEC sisteminde kullanılan organik modifiye edici grupların sayısı daha fazladır. Hareketli faz için asetonitril derişiminin %50-90 arasında değerde olması tercih edilir.

Analit yapısının tayininde kullanılmamasına rağmen, basit ve kullanılabilir olması sebebiyle CEC sisteminde sıklıkla fotometrik dedektör kullanılmaktadır. Fotometrik dedektörün tek başına kullanıldığı CEC sistemindeki analizlerde ise CEC kolonundaki dedektör hücre uzunluğunun, HPLC hücresi ile kıyaslandığında yaklaşık 2 kaat daha küçük olması sebebiyle HPLC analizlerine karşılık 100 kat daha az duyarlılık tespit edilmektedir. UV, floresans ve kütle dedektörlerinin

kullanılması CEC’de dedektör kullanımı olarak alternatiflik sağlamaktadır. Molar seviyenin 1000 kat aşağısına inildiğinde ise floresans tayin, basit UV tayinine göre 1 ile 4 kat arasında değişen seviyede daha fazla duyarlı olduğu gözlenmektedir. Lazerle uyarlanmış floresans dedektör kullanıldığında ise tayin seviyesini 10^{-16} M’a kadar düşürebilmektedir ve böylece duyarlılık daha fazla artış gösterir. Kütle dedektörü kullanıldığında mikromolar seviyede tayin gerçekleştirilebildiği gibi molekülün yapısı hakkında bulgular hakkında fikir verebilmektedir. Bunlar ile birlikte termo-optik absorbands, NMR, fotokimyasal tepkime tespiti ve ışık saçılımı çalışmaları gibi farklı tayin yöntemleri de literatürde yer almaktadır [89].

CEC’in, sıvı kromatografisi (LC) ile kıyaslandığında gözlemlenen en önemli avantaj etkinliğinin çok yüksek olmasıdır. CEC ve LC’deki van Demter grafikleri birbirinden farklıdır. Sebebi ise CEC’de kanallar arasındaki akış farklılığı ve girdap oluşumu daha azdır. Ayrıca, sabit fazdaki partiküller LC’de akışı engellerken, CEC’de elektro-ozmotik akış partikül yüzeylerinde gerçekleştiğinden engellemezler. CEC’de kolon boyunca basınç düşüşü olmadığından, kolonların kullanımı mümkündür. Ancak, LC ile CEC arasındaki temel fark elektro-ozmotik akışı sağlayabilecek 2-akriloamido,2-metilpropansülfonik asit (AMPS) gibi fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonunda kullanılmasıdır [72].

2.2.3. Kapiler Elektrokromatografinin Uygulama Alanları

Yüksek seçicilik, yüksek çözünürlük, yüksek pik kapasitesi ve hızlı ayırma gücü gibi avantajları dolayısıyla CEC, bugün itibarıyla eczacılık, çevre, kliniksel, biyolojiksel ve tarım-gıda analizlerinde olmak üzere birçok alanda yaygın biçimde uygulanmaktadır. CEC’de yüksüz bileşiklerin ayrımı kromatografik mekanizmaya bağlı olarak gerçekleşirken, yüklü bileşiklerin ayrılması ise hem kromatografik hem de elektroforetik mekanizmaya bağlı olarak gerçekleşir [83] .

2.2.3.1. Nötral Moleküller

Nötral moleküllerin CEC uygulamalarına rastlamak mümkündür. Silanizasyonun yükselmesi ile birlikte hareketli fazın pH’ı genellikle 7’den büyüktür. pH’ın 2 ile 9

arasında değiştiği ortamda kromatografik analizler gerçekleştirilebilmektedir. Silanol gruplarının CEC uygulamalarında yer almasına ek olarak son dönemlerde CEC analizleri için ters faz kolonlarda geliştirilmektedir.

2.2.3.2. Asidik Moleküller

EOF üretebilen sülfonik asit kullanılmasıyla birlikte geniş pH aralığında kromatografik analizler gerçekleştirilebilmektedir. Eurby ve arkadaşları, sülfonik asit ve alkil gruplarının aynı silika sabit faza birlikte bağlayarak bu karışıma ait bir faz çalışmalarında kullanmıştır. İyonik formdaki asidik moleküller EOF'ye göre karşı anoda doğru hareket ederler. Devamında ise, elektrokintetik numune yükleme esnasında kolona gemeyebilirler. Bu da örneğin dedektöre doğru sürüklenmesine neden olmaz ve tayin yapılamaz. Bu nedenle analizi yapılacak asidik moleküllerin iyon baskılanmış türlerinin kullanılması gerekir [90].

2.2.3.3. Bazik Moleküller

EOF akış elde edilmesi hususunda bilindiği üzere asidik yapıdaki silikaya ihtiyaç duyulmaktadır. Buna karşılık, numune ile iyonik haldeki silanol gruplarının kuvvetli ikincil etkileşimleri sebebiyle elde edilen pikler sorunludur. CEC analizlerini bazik moleküller üzerinde değerlendirmek zor bir süreçtir. Bu dezavantajlı durumun giderilmesi üzerine, ortama silanol grupları için yarışmalı trietilamin moleküllerinin hareketli faza ilave edilerek çözülebileceği önerilmiştir. Bazik ilaçlar için, C₁₈ kolonları ile çalışıldığında kuyruklu pik şekilleri elde edilmesi halinde, fenil grubu takılı sabit fazların kullanılabileceği literatürde yer almaktadır. Silikaya bağlı fenil ya da C₁₈ kolonları, serbest silanol gruplarına bazik ilaçlar ile etkileşebilmesini önleyebilir. Böylece ise yeni sabit fazlara ihtiyaç duyulur. Bu hedef doğrultusunda bazın pK_a'sına bağlı olarak iyon baskılanmış dolgu malzemeleri kullanılabilir. Smith ve Evans, bazik moleküllerin analizleri için kuvvetli katyon değiştirici kolonlar kullanmışlardır. Böylece trisiklik bazik ilaçları 8.10⁶ plaka/metre gibi etkin plaka sayısı ile ayırabilmişlerdir [81,82]. Maruska ve Pyell selüloz temelli C₁₈ fazlar ile piridin bazının analizinde iyi bir pik elde etmişlerdir. Silika kolonla karşılaştırıldığında, C₁₈ kolonlarında silanol gruplarından dolayı pikte kuyruklanma

gözlemlenirken, selüloz kullanımında ise piklerde kuyruklanmaya rastlanmamıştır [91].

2.2.3.4. Eczacılık Analizleri

CEC'in hızla gelişmesine katkıda bulunan sınıflardan bir tanesinde farmakolojik çalışmalardır. İlaç endüstrisinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda yüksek etkinlik ve hızlı ayırım özelliği sayesinde CEC'in geleneksel kromatografik yöntemlere tamamlayıcı olmasını sağlamış ve oldukça kompleks karışımlar ayrılmıştır. CEC, antibiyotiklerin, barbituratların, prostaglandinlerin, diüretiklerin, makrohalkalı laktonların, peptidlerin, nükleozit ve pürin bazlarının, ftalat ve parabenlerin ayrılmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır [81, 92-98]. CEC uygulamaları ile birlikte HPLC'nin yetersiz kaldığı konularda kapiler elektrokromatografi tekniğinin gelişimi de hızlanmıştır. Smith ve Evans'ın ilaç analizinde uygulanmak üzere CEC sisteminin ilk kez kullanıldığı çalışmanın ardından eczacılık alanında CEC uygulamalarına ilişkin birçok çalışmaya rastlanmaktadır [99]. Diastroizomer steroidlerinin ayrımındaki yetersizliğini CEC kullanılmasıyla tamamlandığı rapor edilmiştir [27]. Hsu ve arkadaşları, 9 adet benzer özellikte sulu çözeltide anti-inflamatuar ilaç örneğini, CEC'e modifiye edilmiş UV ve MS yardımcı sistemde ayrımını ispatlamışlardır [100]. Kositarat ve arkadaşları, yüksek seçicilik ve hassaslıkla tocopherol homologlarının CEC sisteminde RP (ters fazlı)-monolitleri de dâhil ayrımını gerçekleştirmişlerdir [101]. İlaç kalite-kontrol ve toksikolojik analizler için termodinamik ve kinetik çalışmalara ek olarak enantiyomerik amaçlara yönelik metodlar geliştirilmesi gereklidir. Çeşitli kiral ilaçların CEC sisteminde enantiyoayırımı amacı doğrultusunda Lu ve arkadaşları mikro tabanlı silika sabit faz hazırlamışlar ve uygulamışlardır [102]. Kullanılan mikrometre çap mertebesinde sabit faz vasıtasıyla yüksek orandaki rasemik karışımların CEC'de ki analizlerinin, HPLC'deki analizlere kıyasla daha iyi ayrımlar gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Auditore ve arkadaşları, amlodipin ve iki kiral türevinin enantiyomerik ayrımı amacıyla yeni olarak polisakkarid bazlı kiral sabit faz sentezlemişlerdir [103]. Son zamanlarda, Pan ve arkadaşları, 6 amino grubu içeren ilaç bileşiği ve 4 adet nörotransmitterlerin enantiyo ayrımı için Açık Tübüler-CEC sisteminde kullanılmak üzere MOF kaplanmış yeni tip homokiral kapiler kolon hazırlamışlardır

[104]. Çok yönlü ve etkinliği sebebiyle aynı zamanda CEC ve p- CEC sistemi, bitkisel kökenli ilaçların içerisindeki bitki kimyasallarının analizi ve onların hazırlanması konusunda büyük ilgi görmektedir. p-CEC (Basınçlı CEC) sistemi, son yıllarda popüler olarak tüketilen ve yapısı merak konusu olan Gingko biloba bitkisinin yapısının aydınlatılmasında 3 farklı kolon kullanımı vasıtasıyla çok değerli bir metot olarak literatürdeki yerini almıştır [105]. 2D Kromatografinin uygulamalarının bir tanesinde bitkisel özütlerin analizlerinde CEC sistemleri geliştirilmiştir. μ -SCXLC (mikro güçlü katyon dönüşümlü sıvı kromatografisi) ve RP-pCEC (ters fazlı basınçlı kapiler elektrokromatografi) kullanılarak geleneksel geleneksel Chinesemedicine Cortex Phellodendri analizleri amacına yönelik 2D ayırım platformu hazırlanmıştır. Teorik olarak pik kapasitesinin yaklaşık olarak 880'e ulaşması, kompleks bileşiklerin ayırımı ve analizi uygulamaları için umut vaat edici olarak kabul edilmiştir [106].

2.2.3.5. Biyoteknolojik Uygulamalar

Biyolojik sistemleri olarak proteomiksler, metabomiksler ve glikomiksler en ilgi çeken örneklerdir. Bununla beraber proteinler, enzimler, karbohidratlar, nükleik asitler, peptidler ve aminoasitler olarak yaşama yönelik çalışma alanlarındaki en önemli uygulama türleridir [68].

2.2.3.5.1. Karbohidratların Ayırılması

UV hassaslığına sahip olmayan karbohidratların CEC sisteminde ayırımlarının gerçekleştirilmesinden önce fonksiyonlandırılmaları gerekmektedir. Gücek ve arkadaşları, çeşitli monosakkartiler ve disakkaritlerin 1-fenil-3-metil-5-pirazol türevlerinin ayırımlarını, silika parçacıkları ile doldurulmuş kolonlar ile gerçekleştirmişlerdir [107]. Suzuki ve arkadaşları, glikoproteinlerde yaygın olarak bulunan monosakkaritleri CEC ile ayırmışlardır [108]. Aldopentoz izomerlerinin 1-fenil-3-metil-5-pirazol ürünleri, silika parçacıkları ile doldurulmuş ve 3-aminopropilmetoksisilanla çeşitlendirilmiş kolon yardımı ile ayrılmıştır. CEC'de ise ışık saçılma tekniği kullanılarak süktroz ve sakaroz ayırımı ışık saçılma tekniği kullanılarak tayin edilmiştir [109]. Palm ve Novotny poliakrilamid ve poli(etilen

glikol) monolitik sabit fazı çeşitli enkephalin türevlerini ve 2-aminobenzamid türevli maltoz oligosakkaritleri pH 8.2'de borat tamponu kullanarak CEC ile ayırmışlardır

2.2.3.5.2. Protein ve Peptidlerin Ayırılması

Peptid ve proteinlerin silika kapiler duvarına veya silika bazlı sistemlerin kolon çeperlerine adsorpsiyonu biyomoleküler türlerin CEC ayırımının gerçekleştirmesini önleyen en büyük sorundur. Bu etkileşimler silanol gruplarının negatif yükü ve biyomolekül yapılarında bulunan fonksiyonel yapıların pozitif yükleri tarafından gerçekleştirilir. Devamında ise etkinlik ve elüsyon zamanının tekrarlanabilirliğinde eksiklik görülür. Bu problemi çözebilmek için CEC'in farklı türevleri kullanılabilir. İstenmeyen adsorpsiyonu engellemek için büyük hacimli gruplara sahip türevler moleküller kapiler duvarına bağlanır [72]. Poli-dopamin kaplı Açık-Tübiller (OT-CEC) kolonu uygun bir biçimde modifiye edilerek, protein ayrımı amaçlı yeni ve başarılı bir kolon örneği olarak beyaz yumurta ve sütteki proteinlerin analizinde ve ayırımında başarılı bir şekilde uygulanmıştır [110]. Faiz ve arkadaşları, 3 farklı monomere dayalı kopolimer tabakası immobilize edilmiş yeni açık tübiller-CEC kolonu hazırlayarak, sitokrom C'nin triptik sindirimindeki çeşitli peptidlerin ayırımında kullanmışlardır [111]. Hamer ve arkadaşları, sentetik bazı peptid karışımların ayrımı konusunda yüksek seçicilikte ve aynı zamanda gelecekteki benzer çalışmalara öncülük etmesi açısından yeni bir uygun yöntem literatüre kazandırmışlardır [112]. Pesek ve arkadaşları, aşındırılmış kapiler duvarını n-oktadesil ve kolesterol grupları ile türevlendirmişlerdir [113]. Charvatova ve arkadaşları, aromatik gruplu asit veya oligopeptit içeren peptitleri ayırmak için iç duvarı türevlendirici ajan olarak porfirin türevlerini kullanmışlardır [114,115]. Unger ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hem n-alkil grupları hem de güçlü katyon değiştirici gruplar içeren çeşitli mod fazları ya da n-alkil silika ters fazlı sorbentlerin bir çeşidini kullanarak halkalı peptidlerin kolonda tutulmasını incelemişlerdir [116]. Yüksek iyonik güce ve düşük pH'a sahip tamponların kullanılmasıyla sorbentler ile yüklü peptidler arasındaki elektrostatik etkileşimlerin önlenmesi sebebi ile Horvath ve arkadaşları bazı peptidler için çeşitli grupların CEC ayırımını gerçekleştirirken büyük gözeneklere sahip ($1000 \text{ \AA}^0$) kuvvetli katyon değiştirici kullanmışlardır [117]. Monolitik kolonların ters fazlı moda kullanıldıkları proteinlerin

ayrılmasına ilişkin bir diğer çalışma Ericson ve Hjerten tarafından yapılmıştır. Ters fazlı moda protein ve peptidlerin elektroforetik olarak, elektro-ozmotik akışın tersi yönünde hareket etmesi vasıtası ile pozitif yüklü proteinlerin elektroforetik olarak katoda doğru hareket etme eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir [118]. Horvarth ve grubu tarafından ters yöndeki moda peptid ve proteinlerin analiziyle ilgili yine çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur [119]. Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile poli(lauril metakrilat-etilen dimetakrilat) monolitik yüksüz kolonlarla peptidleri ayırmışlardır. Bu çalışmada peptidlerin ayırımı, elektroforetik akış hızlarındaki farklarının yanı sıra sabit fazdaki etkileşimlerine bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, histidin ve lizin içeren peptidlerin iyi pikler verdiği de çalışmada gözlem olarak sunulmuştur [120]. Literatürde yer alan bir diğer çalışmada hacimli gruplar içeren silan ile modifiye edilmiş gözenekli organik-inorganik kombinasyonlu monolitik kolon, sol-jel fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmış ve katyonik peptidlerin saflaştırılması incelenmiştir [121].

2.2.3.5.3. Aminoasitlerin Ayırımı

Xu ve arkadaşları lizin modifiyeli nanopartikül dolgulu açık tübüler-CEC kolonu hazırlayarak, izoelektronik noktaları birbirine yakın 3 amino asidin ayırımında CEC sisteminde kullanmışlardır [122]. Aydoğan ve Denizli, hidrofobik aminoasitleri, zayıf katyon değiştirici özelliğe sahip monolitik kolonlar ile ayırmışlardır. Çalışmada katyon değiştirici olarak N-metakriloil-(L)-glutamik asit (MAGA) kullanılırken, bütill metakrilat (BMA) monomeri yapıya hidrofobik özellik kazandırmıştır [123]. Denizli ve arkadaşlarının diğer çalışmasında ise, N-metakriloil-L-histidin metil ester (MAH), fonksiyonel monomer seçilerek kiral seçici olarak kullanılmış ve bütill metakrilat (BMA) monolitik yapıya hidrofobik özellik artırıcı grup olarak dahil edilerek hidrofobik amino asit enantiyomerlerinin enantiyomerik ayırımı CEC sisteminde gerçekleştirilmiştir [124]. Elektrozotik akış (EOF) sağlayıcı olarak MAGA monomerinin kullanıldığı Denizli ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında, bütill metakrilat (BMA) bazlı kiral monolitik kapiler kolon ile D,L-histidin, D,L-tirozin, D,L-fenilalanin ve D,L-glutamik aminoasit enantiyomerlerinin kapiler elektrokromatografi yöntemiyle sağlıklı bir biçimde ayırımını yapmışlardır. MAGA miktarının artmasıyla ayırma faktörünün de arttığı, çalışmada rapor edilmiştir [125].

Huber ve arkadaşları, fenilzosiyanat yardımı ile peptidlerin Edman yıkımı sonucu oluşan feniltiyodantoin (PTH)-aminoasitlerinin CEC Ayırımını 3.5 µm'lik C₁₈ dolgulu kolonda gerçekleştirmişlerdir [30]. Amino asitler üzerinde CEC tekniğinin kullanılarak alifatik ve aromatik amino asitlerin enantiyomer ayırımını ligand-değişim yöntemiyle gerçekleştirebileceği Denizli ve Aydoğan'ın ortak çalışmasında saptanmış ve bu çalışmada polimerik sabit fazın, açık borusal kapiler monolitik kolon şeklinde sentezlendiği rapor edilmiştir [126].

2.2.3.5.4. Lipidlerin Ayırımı

İnsan idrarından alınan örnekte yapılan çalışmada Jang ve arkadaşları, OT-CEC'in ESI (Elektrosprey ionizasyonu) ve MS (Kütle Spektrometresi) modifikasyonu ile birlikte kullanılan sistemde açıl grubu zinciri ile grubun başında polar gruplar içeren fosfolipidlerin yüksek hızda ayırımının potansiyel olarak mümkün olduğunu ispatlamışlardır. ESI ve MS için uygun ara yüz kullanımı ile birlikte 18 farklı fosfolipid bileşeninin karakterize edilmesi sağlanmıştır Bu yöntem ile birlikte idrardaki fosfolipidlerin hızlı analizi için OT-CEC/MS/ESI kullanımının potansiyel faydası ortaya çıkmıştır [127].

2.2.3.5.5. Metabolomikslerin Ayırılması

Metabolomik, hücreler, biyolojik sıvılar, dokular veya organizmalar içerisinde genellikle metabolitler olarak bilinen küçük moleküllerin büyük ölçekli bir çalışmasıdır. Toplu olarak, bu küçük moleküller ve biyolojik sistem içindeki etkileşimleri metabolom olarak bilinir [68]. Metabolomikslerin incelemesinde CEC sistemi uygulanmaktadır. Xie ve arkadaşları, idrarda ve serumdaki metabolomikslerin çalışmasında incelenmesinde indirgenmiş elüsyonla p-CEC kullanmak üzere yeni bir metod öne sürmüşlerdir. 6 haftalık araştırma sonrasında diyet halindeki obezite hastaları ile sağlıklı bireyler arasında idrar metabolizmasında çok ciddi farklılıklar olduğu saptanmıştır [128]. Metaboliksler üzerinde CEC tabanlı ayırma ve analiz metodlarının, geleneksel olarak kabul edilebilecek diğer kromatografik metotlar HPLC ya da LC/MS gibi yöntemlere oranla daha az masraflı ve gelişmiş yöntem olduğu belirtilmiştir. Zhang ve

arkadaşları, pankreas kanserinde plazma metaboliklerinin ayrımını mümkün kılabilmek için pCEC/UV sistemini geliştirmişlerdir [129]. CEC sisteminin, OPLS/DA (Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi) ile birleştirilmesinin ardından yapılan analizler ile birlikte pankreas kanseri insanlar ile sağlıklı insanlar arasındaki hastalık açısından ayrımı konusunda sistemin, uygun bir metot olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir. Son dönemlerde pCEC'in QTOF/MS ile birlikte modifiye edilmesi ile birlikte ara yüzü kullanımıyla sistemde akciğer kanserinin metabolik profillenmesi gerçekleştirilmiştir [130]. Lord ve arkadaşları, bufadienolidlerin [bufalin, sinobufakin, sinobufatakin) ve sardenolidlerin ayrımında CEC'i kütle spektrofotometresi ile birleştirerek kullanarak başarı elde etmişlerdir [68]. Testesteron, 1- α -metiltestesteron ve progesteron gibi endojen steroidlerin CEC ile ayrımı üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır [131]. Triamsinolon, hidrokortizon, kortizon, metilprednisolon, betametason, deksametason, adrenosteron, flukortolon triamsinolon ve triamsinolon asetonid gibi çeşitli sentetik steroidlerin ayrımı CEC ile tamamlanmıştır [72]. CEC ile ayrılması gerçekleştirilmiş bir diğer molekül türü lipofilik steroidlerdir [132]. Tiazid diüretikleri de pH'ın 2.5 olduğu ortamda CEC ile ayrımı yapılmış türlere örnek verilebilir [132, 133].

2.2.3.5.7. Nükleotitler ve Nükleozitlerin Ayrılması

Nükleotit ve nükleozit birimlerinin CEC ile ayrılması HPLC'ye alternatif olarak kullanılmaktadır. Aydoğan ve arkadaşları, nükelozit ve proteinlerin anodik EOF ile CEC sisteminde ayrımını gerçekleştirmek üzere anyon dönüşümlü polimerik zincir içeren dokunaç tipli OT-kolon geliştirmişlerdir [134] Helboe ve Hansen, çeşitli parametreleri optimize ederek 6 nükleozitin kısa sürede saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir [135]. Zhang ve arkadaşları monolitik kolonda 12 farklı mono-, di- ve tri-fosfat molekülü ile 4 büyük tRNA lık karışımın ayrılmasını gerçekleştirmişlerdir ve aynı zamanda bu çalışma, idrar, serum veya plazmadaki nükleozit veya modifiye edilmiş nükleozitlerin miktarı kanser ve HIV'in teşhis belirteci olarak önerilmiştir [136]. Mesplet ve arkadaşları HIV ters-transkriptaz nükleozitlerini β -siklodekstrin takılı silika içeren CEC yöntemi ile ayırmış ve

kantitatif analizini yapmışlardır. Bu açıdan CEC, miktar tayini ve nükleozit karışımlarını ayırmak için de kullanılabilmesi oldukça muhtemeldir [137].

2.2.3.6. Gıda ve Tarımsal Analizler

CEC sistemi, gıda ve tarım analizlerindeki analitik ayrımlarda çok önemli rol oynamaktadır [138]. Cheng ve arkadaşları, et örneklerindeki sülfonamid kalıntılarının eş zamanlı olarak ayrılması ve tanımlanması için son derece hassas bir yöntem olan CEC/MS sistemini önermişlerdir [139]. Melamin ve üç türevinin analizi için son zamanlarda CEC/MS sistemi, LC/MS'e alternatif yöntem olarak Huang ve arkadaşları tarafından önerilmiştir [140]. Nano-lateks kaplanmış OT-CEC kolonları ile birlikte CEC sistemi bu kez gıdalardaki nitrit ve nitrat tayini amaçlı kullanılmıştır [141]. Elma suyundaki malik asit enantiyomerlerinin tayini için Aydoğan ve arkadaşları, In-situ polimerizasyonu ile L-histidin baskılanmış OT-CEC kolonu hazırlamış ve uygulamışlardır [142]. Balık kalıntılarındaki flumequine ve oksolinik asit tespiti için pCEC sistemi hızlı bir yöntem olarak tercih edilmiştir [143]. Mutajenik ve kanserojenik özellikleri sebebiyle insan sağlığı açısından zararlı olan organofosfor pestisitler tarımsal üretimlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sebeple, pestisit kalıntılarını kontrol etmek için hassas ve etkili bir analiz yöntemi gerçekleştirmek hayati derecede önem taşımaktadır. Triklorfon'un seçici olarak tanınması amacıyla organik-inorganik hibrit özelliği taşıyan ve hidrolik olmayan sol-jel yöntemiyle desteklenmiş moleküler baskılanmış kapiler monolitik kolonlar hazırlanmıştır [144]. Tarlalarda yabancı türlü bitkileri yok etmek için kullanılan triazin haşare ilaçlarının ayarlanmasında CEC oldukça etkindir [145].

2.2.3.7. Çevre Analizleri

Poliaromatik hidrokarbonlar, gıdalar ve çevreye çeşitli yollarla bulaşabilen kontaminantlardır. Salwinski ve arkadaşları aynı laboratuvar koşullarında kapiler tekniğe dayalı iki yöntem olan MKEC (Misel Elektrokinetik Kromatografi) ve CEC kolonlarını yüksüz poliaromatik hidrokarbonların ayırımında kullanmak üzere kıyaslamaya giderirken, CEC kolonlarının bariz üstünlüğünü vurgulamışlardır [146]. Bir diğer çalışmada Zhang ve arkadaşları, CEC yöntemiyle poliaromatik

hidrokarbonların ayrımını gerçekleştirebilmek için C18 polimerik monolitik kolonları hazırlamışlardır [147]. Son zamanlarda Perez-Fernandez ve arkadaşları yeni olarak kabul edilebilecek polisakkarid tabanlı kiral sabit faz geliştirerek, içerisinde herbisit, fungusit ve böcek öldürücülerinde yer aldığı toplam 16 adet pestisid enantiyomerlerinin ayrımında kullanmışlardır [148]. Hazırlanan bu kolon, CEC ve HPLC'de aynı koşullarda kullanılarak birbiri arasında kıyas hedeflenmiştir. Bu karşılaştırmanın ardından analiz sonucunda beklenildiği gibi hem etkinlik, hem de kiral çözünürlük bakımından CEC analizleri daha yüksek sonuçlar vermiştir. UV ile birlikte modifiye edilerek kullanılan CEC yönteminde (CEC/UV) sebzelerdeki böcek öldürücüler ve artıklarının analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Wu ve arkadaşları bazı elektrokimyasal olmayan organofosforlu pestisitlerin tayini için yeni bir pCEC analitik yöntemi geliştirdi. [149]. Aynı grubun bir diğer çalışmasında ise fenolik ksenostrojenlerin ayrımı ve doğrudan tayini amaçlı olarak seçici ve hassas bir yöntem olarak pCEC sistemini uygulamışlardır [150]. Yan ve arkadaşları, yumurtalardaki 4 tetrasiklin böcek öldürücü grubun tayini için pCEC sistemini geliştirmişlerdir [151]. Son zamanlarda, susuz fazların kullanıldığı elektrolit ilave edilmemiş sistemler CEC'de yaygın olarak kullanılmaktadır [16]. C₁₈ sabit fazı kullanılarak asetonitril ve su karışımında (80/20 (v/v)) 16 poliaromatik hidrokarbon molekülü birbirinden ayrılmıştır. Su molekülü C₁₈ sabit fazına yeterli dağılımının sağlanması için gereklidir [73]. Poliklorlanmış benzen türevleri ve ftalatlar CEC sistemi ile etkili bir şekilde ayrılmışlardır [152]. Denizli ve arkadaşları PAH'ların bir grubu olan benzofenantrenleri sentezlemiş oldukları zayıf katyon değiştirme özelliğine sahip monolitik kapiler kolonlar ile ayrılmasını gerçekleştirmişlerdir. Monolitik kapiler kolondaki bütül metakrilat (BMA) monomeri yapıya hidrofobik özellik katarken, kolona zayıf katyon değiştirici özelliğini aminoasit bazlı metakrilat glutamik asit (MAGA) ko-monomerini sağlamıştır. Yine, aynı kolon ile fenolik bileşikler [%60/40 (ACN/PB)] (10mM, pH 7.0) ortamında birbirinden elektrokromatografik olarak ayrılmışlardır [153].

2.2.4. Nanoteknoloji ve Kapiler Elektrokromatografi

Karbon nanotüpler ilk olarak 1991 yılında Japon Bilim adamı Iijima tarafından keşfedilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir [154]. İçi boş silindiri andıran ve karbon atomlarından oluşan karbon nanotüpler tek duvarlı ya da çok duvarlı olmak üzere iki kısım çeşitlendirilmeleri sözkonusudur. Tek duvarlı nanotüp (TDNT) karbon atomlarından oluşan içi boş silindirik bir şekle sahipken, çok duvarlı nanotüp (ÇDNT) ise iç içe geçmiş nanotüpler şeklindedir. Bu açıdan bakıldığında çok duvarlı nanotüpler, tek duvarlı nanotüplere göre yapıları daha karmaşıktır. Karbon nanotüplerin ise sahip oldukları gözeneklik, adsorpsiyon için yüksek yüzey alanı ve çok sayıda moleküler yapıya afinitelerinden dolayı LC, GC ve CEC için sabit faz-katı destek maddesi olması açısından elverişli malzemelerdir. Karbon nanotüplerin CEC’de sabit faz olarak kullanılmasıyla ilgili ilk yayın 2005 yılında yayınlanmıştır [155]. Bununla birlikte CEC’de kullanılan karbon nanotüplere ilişkin literatürde yer alan çalışmalar devam etmektedir [156-161].

2.2.4.1. Nanoboyunuzların Kapiler Elektrokromatografide Kullanımı

Literatürde tek duvarlı nanotüpler ile nanoboyunuzların CEC’de sabit faz olarak kullanılabilmesi açısından karşılaştırmalar mevcuttur. Tek duvarlı nanotüpler kullanımı esnasında ağ yapısında iken nanoboyunuzların kullanımında ise bu yapı katman olarak gözlemlenmektedir. Elektrokromatografik özellikler ve elektro-ozmotik akışta bu iki nanomalzemenin kullanımı benzerlik göstermektedir. Sabit fazda karbon nanoboyunuzların kullanılması ile moleküllerin tamamen ayırımı gerçekleştirildiği gibi taban çizgisi dalgalanması da azaltılmıştır. Ancak, buna karşılık nanoboyunuzların kullanılması ile gürültünün arttığı rapor edilmiştir [155].

2.2.5. Kapiler Elektrokromatografinin Dezavantajları

Olağanüstü avantajlarına karşılık CEC’in başlıca ayırma tekniği olmasını etkileyebilecek en önemli olumsuz durum, kolon içerisinde hava kabarcıklarının meydana gelmesidir. Kolon içerisinde gerçekleşen bu durum baseline gürültüsüne

ve istenmeyen pik gözlemi sorunu ortaya çıkarabileceği gibi, akımın kopmasına kadar sebebiyet verebilmektedir. Kolonun sonunda inlet ya da outlet kısmında uygulanabilecek ekstra basınç ile hava kabarcığı oluşumu önlenebilmektedir. Bu sebeple yürütücü kuvvet olarak elektroozmotik basınca ilaveten hidrolik basıncın da eklenmesi ile geliştirilen sistem olan Basıncılı Kapiler Elektro Kromatografi (pCEC) yöntemine olan ilgi son dönemlerde artış göstermektedir. Basıncın farklı pozisyonlarda gerçekleşmesine göre pCEC cihazı iki şekilde gruplandırılabilir: Buna göre; hem giriş hem de çıkış kısmına sık sık basınç uygulanabilen ve giriş ya da çıkış kısmına basınç uygulanabilen olmak üzere gruplandırma yapılabilir. İlk kez cihaz önerilmesi Knox ve Grant tarafından ortaklaşa gerçekleştirilmiştir [162]. pCEC cihazına yönelik olarak ilk öneri Tsuda ve arkadaşları tarafından sunulurken, HPLC pompası modifiye edilerek bu öneri literatürdeki yerini almıştır [78]. Elektroozmotik akışın dahil olmasıyla sisteme yöntem, HPLC ve CEC'in birleşimi olmuştur. Kolon verimliliği kıyaslandığında ise pCEC'e göre kısmen daha aşağı düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuca karşılık, birçok avantajlı kullanımı beraberinde bulundurmasıyla birlikte birçok araştırmacı tarafından pCEC sistemi de literatürdeki en pratik yöntemlerden bir tanesi olarak gösterilmektedir [163].

CEC sistemine ait bir olumsuz durum ise protein ve peptidler gibi çeşitli büyük moleküllerin analizinde, analitler ve yüzey dolgu malzemesi arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimler sebebiyle sorun çıkmasıdır. Bununla birlikte absorpsiyon dedektörlerinin kullanılmasıyla düşük tespit hassaslığı bir diğer sorundur. Tayin duyarlılığını arttırmak için gerçek zamanlı deriştirme ve büyük tayin hücreleri gibi yöntemler önerilmektedir [164].

Kapiler elektrokromatografinin kullanımı aynı zamanda düşük tayin duyarlılığı sebebiyle de tercih edilmez. Bu dezavantajı bertaraf etmek amacıyla CEC'e yüksek seçicili dedektörlerin ilave edilmesine ihtiyaç vardır. Böylece biyolojik analiz ihtiyacının da giderilebileceği düşünülmektedir. Bu önermeler doğrultusunda CEC-MS, CEC-lazer uyarılmış floresan dedektör, CEC-iletken dedektörü ya da soğuma kapasiteli termostat gibi birleştirilmiş teknikler son dönemlerde kullanılmaya başlanmıştır [165].

Yürütücü kuvvet olarak elektroozmotik akış (EOF)'nin kullanıldığında kolonda geri basınç oluşmaması için kolonu kaplamak üzere çeşitli küçük çaplı, yaklaşık mikrometre mertebesinde altı parçacıklar dolgu malzemesi olarak kullanılması, HPLC ile kıyaslandığında daha yüksek kolon etkinliği elde edilmesini sağlar. CEC ve pCEC gibi sistemlerin MS ile olan duyarlılığı sebebiyle modifiye edilerek sunulması yalnızca kolon etkinliğini arttırmak ve tayin duyarlılığı açısından katkı vermekle kalmayacağı gibi, aynı zamanda molekülün yapısı ve kütlesi hakkında da bilgi verebilecektir. Bu yüzden, daha güvenilir nano-sprey arayüzler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [68].

2.3. Kolon Teknolojisi

HPLC sisteminin kullanılmaya başlanması ile birlikte kromatografiye yönelik çalışmalarda gözle görünen ilgi ve bu ilgiye paralel olarak kolon teknolojisi üzerinde beklentiler ve çalışmalarda artış göstermiştir. Bu alanda ilk olarak, çapları 5-10 µm arasında değişen partikül dolgu kolonlar ile yapılan çalışmalar literatürde yer almıştır [166-169]. 1980'li yıllara gelindiğinde ise bu kez çap boyutunda küçülmeye gidildiği ve 1,5-2 µm arasında değişen partikül dolgu kolonlar ile çalışmalar yapıldığı, Guichon ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir [170-172]. Monolitik silika kolonlar ise ilk kez Tanaka ve arkadaşları tarafından önerilmiş ve uygulamaları 1990'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır [173-175]. Polimer bazlı monolitik malzemeler içeren kolonlar ise Svec ve arkadaşlarının ilk kez 1992'de yaptığı çalışmalar ile literatürdeki yerini almıştır [176, 177]. 1997 yılında ise Mercik firması monolitik kolonların ticarileşmesi konusunda patent yetkisini almıştır [178].

CEC kolonundaki dolguların iki önemli görevi vardır. Bunlardan ilki, tıpkı HPLC'de olduğu gibi gerekli etkileşimin gerçekleşmesi için uygun birimlerin sağlanması, diğeri ise CEC'deki en gerekli kısımlarından bir tanesi EOF'nin oluşmasını sağlamaktır [179]. Sabit faz içerisinde iyonlaşabilen gruplar olduğu takdirde EOF oluşturulabilir. Bu amaç doğrultusunda silika yüzeyinde yer alan silanol gruplarının iyonlaşması ile birlikte (-) yük kaynağı olarak verdiği destek ile birlikte EOF yürütücü kuvvet olarak uygulanabilmektedir. Ancak, başta HPLC'de görüldüğü üzere kullanılan sabit fazlardaki türevlendirici işlemler sonrası silanol derişiminin

azalıyor olması ve bu durumun EOF oluşumunda yeterli beklentiyi karşılayamayacak olması sebebiyle, HPLC gibi sistemlerde kullanılan sabit fazlar genellikle CEC için uygun sabit fazı olarak değerlendirilememektedir [98,180,181]. Silika içeren sabit faz destek malzemelerinde oluşan EOF, ortamın pH'ına bağlıdır [98,182,183]. Düşük pH değerlerinde silanol grupları, protonlanır ve bu durum EOF'yi azaltıcı etki gösterir. pH üst değerlere çıktıkça ise sabit faz malzemesinin kararlılığı sağlıklı olmayabilir [184]. İlaveten, pik genişlemesi ve kolon verimliliği gibi istenmeyen koşullar, polar olmayan analitlerin aktif silanol grupları üzerinde adsorplanmasıyla gerçekleşir [185,186]. İyonlaşma gerçekleştirebilmeleri ve pH değişiminden etkilenmemeleri sebeplerinin yanı sıra yüzeylerindeki yük yoğunluğunun kontrol edilebilir seviyede olması ile birlikte polimerik destekli dolgu malzemeleri, EOF oluşturabilme özelliğine sahiptirler [187-189]. Polimerik dolgu destek malzemeleri, EOF oluşturabilme özelliğine sahiptir.

CEC'de en çok kullanılan kolonlar genel olarak 3 başlık altında sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

- a) Açık-Borusal (OT)
- b) Dolgulu
- c) Monolitik kolonlar olmak üzere 3 başlık altında değerlendirilmektedir. Şekil 2.11.'de bu kolonlar gösterilmeye çalışılmıştır.

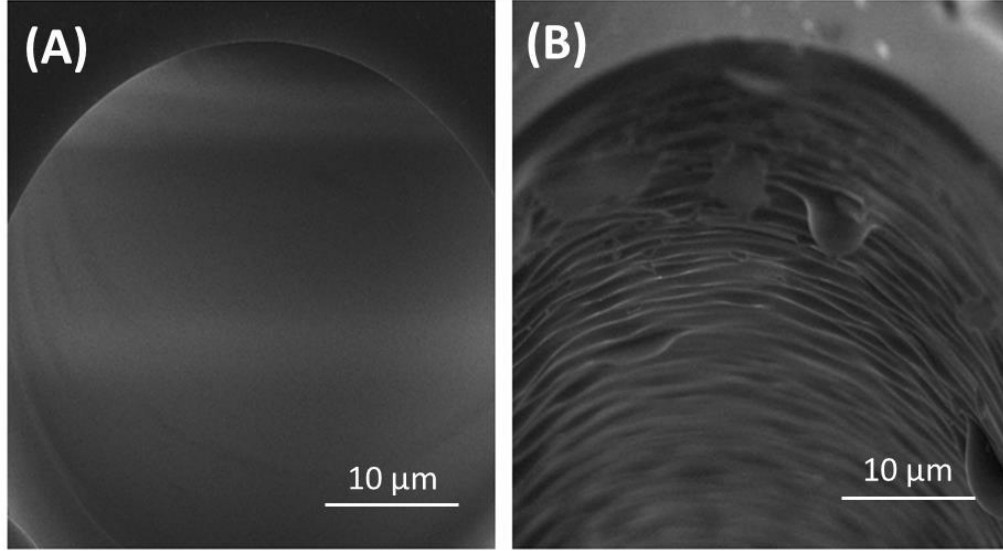


Şekil 2.11. CEC'de kullanılan kolonlar: a) Açık-Tübüler Kolon(OT) b) Monolitik kolonlar c) Dolgulu Kolonlar [179].

2.3.1. Açık Borusal Kolonlar

Açık borusal (Open Tubular) kolonlar içerisinde dolgu malzemesi bulundurmuyarak, fiziksel ya da kimyasal olarak kapiler kolon üzerinde sabit faz tarafından kaplanarak meydana getirilir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), konakçı ligandlar, blok ko-polimerler, nanotüpler, polisakkaritler, nanopartiküller, monolitler gibi moleküler yapılar açık-tüber kolonlar içerisinde sabit faz malzemesi olarak kullanılmaya yönelik örnek verilebilecek yapılardır [190]. Kolay hazırlanabilirlik, kabarcık oluşumu gözlenmeyişi ve enstrümental açıdan kullanım kolaylığı bakımından açık tübüler kolonları, dolgulu kolonlara karşılık avantajları mümkündür. Ancak, bu yöntemin en dezavantajlı kısmı, düşük yüzey alanı sebebiyle numunenin yüklenmesindeki düşük kapasitedir. Bu dezavantajlı durumun bertaraf edilebilmesi konusunda yüzey alanının genişletebilmesi amacıyla sabit faz-hareketli faz etkileşimlerinin artırılması hedeflenmektedir. Polimerik ya da nano partikül kaplamalar, gözenekli silika tabakalar, aşındırma, sol-jel teknikleri gibi bir çok yenilikçi yöntemin önerilmesiyle açık tübüler kolonların performansı artmakta ve bu artış neticesinde başta analitik kimya olmak üzere uygulama alanlarını da genişletilebilmektedir [113,191]. Yine de, açık tübüler kolonlarda kararlı sabit faz elde edebilmek konusunda çok daha keskin önerilere ihtiyaç duyulmaktadır [192]. Kapasite problemini çözebilmek ve yüzey alanını genişletebilmek için kapiler borunun iç kısmını aşındırmak suretiyle yüzey alanını 1000 kat büyütme gibi fikirler önerilmiştir. Zhang ve arkadaşları, hızlı protein ayrımı gerçekleştirmek amaçlı geliştirdikleri sistemde açık tübüler kolonun iç kısmında, in-situ polimerizasyonu ile porojen kullanarak kapiler kolonun iç kesiminde gözenekli sabit faz elde etmişlerdir [193]. Feng ve arkadaşları, 4 farklı protein ve proteolitik sindirim karışımı ayırımında kullanılmak üzere titandiyum di oksit kaplı açık tübüler kolonu, sıvı faz tarafından biriktirme yöntemiyle CEC ayırımında kullanmıştır [194]. Yang ve arkadaşlarının geliştirdiği poli(glisidil metakrilat) nano partiküllerinin, kapiler kolonun iç kısmına immobilize edilmesiyle elde edilen açık tübüler kolon sistemi, analitler ile nano partiküller arası kuvvetli hidrofobik etkileşimlerden faydalanarak yüksek etkili ayırım sonucu göstermiştir [195].

Elektrokromatografi sisteminde kullanılmak üzere hazırlanmış ve kaplama malzemesi olarak polietilen türevli poli 3-kloro-2-hidroksi metakrilat (poli(HPMA-Cl)) kullanılan açık tübüler kolon şekil xx'de gösterilmiştir [66].



Şekil 2.12. Kapiler Kolon SEM görüntüleri A) Boş kapiler B) Polietilen modifikasyonlu kapiler kolon [66].

2.3.2. Dolgulu Kolonlar

Yüksek seviyede numune kapasitesi, açık-tübüler kolonlara nazaran daha hassas oluşu sebebiyle en çok kullanılan kolon türüdür. Dolgulu kolonlar, içerisine partiküllerin yüksek basınç yardımıyla fritler arasında yerleştirilmesiyle oluşur. Fritler, partiküller içerisinde kolonların kalmasını sağlayan materyallerdir [196]. Dolgulu kolonların hazırlanması genel itibariyle 3 kısımdan oluşur. Bu kısımlar;

- 1- Kolon dolgu malzemesinin seçimi ve sentezi,
- 2- Kolonun doldurulması,
- 3- Fritlerin oluşturulması,

İyi bir dolgulu kolona sahip olabilmek için, uygun dolgu malzemesi, dolgulama işlemi için uygun method ve son olarak fritleri içermesi gerekir.

CEC için dolgu malzemesi seçilirken, EOF'yi sağlayabilecek ve seçici ayırım yapabilmek için gerekli yüklü fonksiyonel grupları içeren malzemeler tercih edilir.

CEC’de silika bazlı terz-faz dolgu malzemeleri, en sıklıkla kullanılan dolgu malzemesi türleridir. Silika yüzeyine bağlı karbon zinciri alıkonma ve seçicilik sağlamaktadır ve silikanın yüzeyinde artan silanol grupları iyonlaşmasıyla pH 2.3’ün yukarı değerlerinde hareketli faz kullanımıyla EOF’yi oluştururlar. Silanol gruplarının iyonlaşabilme yetenekleri ve kimyasal kararlılıklarının düşmesi sebebiyle silika bazlı dolgu malzemesinin kullanıldığı CEC çalışmalarında en uygun pH aralığı 2-8 arasındadır. Bu yüzden, daha yüksek pH değerlerinde kimyasal kararlılığını koruyabilen alternatif silika bazlı dolgu malzemeleri sentezleri de son dönemlerde literatürdeki yerini almaktadır. Qu ve arkadaşları, sertlik içeren ve yüksek basınçta dayanıklı C-18 ile modifiye edilmiş gözeneksiz altın nanopartikül içeren dolgu malzemesini CEC siteminde yeni sabit faz olarak önermişlerdir ve kullanılabilecek uygun sabit fazlardan bir tanesi olarak literatürdeki yerini almıştır [197]. Gwon ve arkadaşları, pH aralığı oldukça geniş (1-14) ve 200°C’a kadar dayanıklı oluşu sebebiyle zirkonyum parçacıkları tabanlı kiral sabit faz olarak kullanılabilecek dolgulu kolonları 9 farklı rasemik karışım içeren enantiyomerik ayırmalarda kullanmak konusunda literatüre kazandırmışlardır [198]. Son yıllarda çekirdek kabuğu tabanlı silika partiküllerin, düşük geri basıncın yanısıra yüksek oranda ve hızda etkili ayırmalar amaçlı geleneksel yöntemler ile sıvı kromatografisindeki kullanımı artış göstermektedir [199]. CEC’de bugüne dek kullanımına az sayıda rastlanılan uygulamalarına karşılık Fanali ve arkadaşları yaptıkları ilgi çekici çalışmalarında, kiral ayırmalar için tamamı gözenekli ve çekirdek kabuğu tabanlı kolonların karşılaştırılmalı performanslarını işlemişlerdir. 2.8 µm çaplı çekirdek kabuk tabanlı silika dolgulu kolon ile 3.0µm yarıçaplı tamamı gözenekli kolon performansının gerek piklerin, mükemmel elde edilişi ve benzer etkin ayırım oranları ile warfarin ve temezpamin ayırımında randıman verdiği rapor edilmiştir. Bu çalışma, kabuk parçacıklı gözenekli kolonların herhangi bir çözünürlük ya da verim kaybı yaşanmadan kullanılabileceğini gösterirken, bir diğer merak konusu ise diğer karışımlar için de uygulandığı takdirde nasıl bir sonuç elde edileceğidir [200]. Wirth ve arkadaşları, silika kolloidler dizisi yardımıyla biyopolimerlerin elektromigrasyonunu ispatlamışlardır [201]. Ticari monolitler ile sabit faz performansının kıyaslandığında ise silika tabanlı kolloid kristallerin kullanılmasıyla elektriksel alanda taşınmasıyla yüklü taneciklerin ayırma işleminde pik genişliğinin memnuniyet verici ölçüde azaldığı ve yine bir diğer olumlu gelişme

olarak yaşanan kütle kaybının indirgendiği rapor edilmiştir [202]. Wirth, daha sonra aynı kolonu proteinlerin ayırma işleminde kullanmış 50 nm'lik tabakalarda izokratik taşınma sonrası, 1 cm'nin hemen üzerinde kapiler kolonda 1.5 dakikanın altında geçen sürede ayırmayı gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki, proteinler gibi yüklü ve büyük moleküller için silika tabanlı kolloid kristallerin elektriksel alanda kullanımının uygun olduğu saptanmıştır [203].

2.3.3. Monolitik Kolonlar

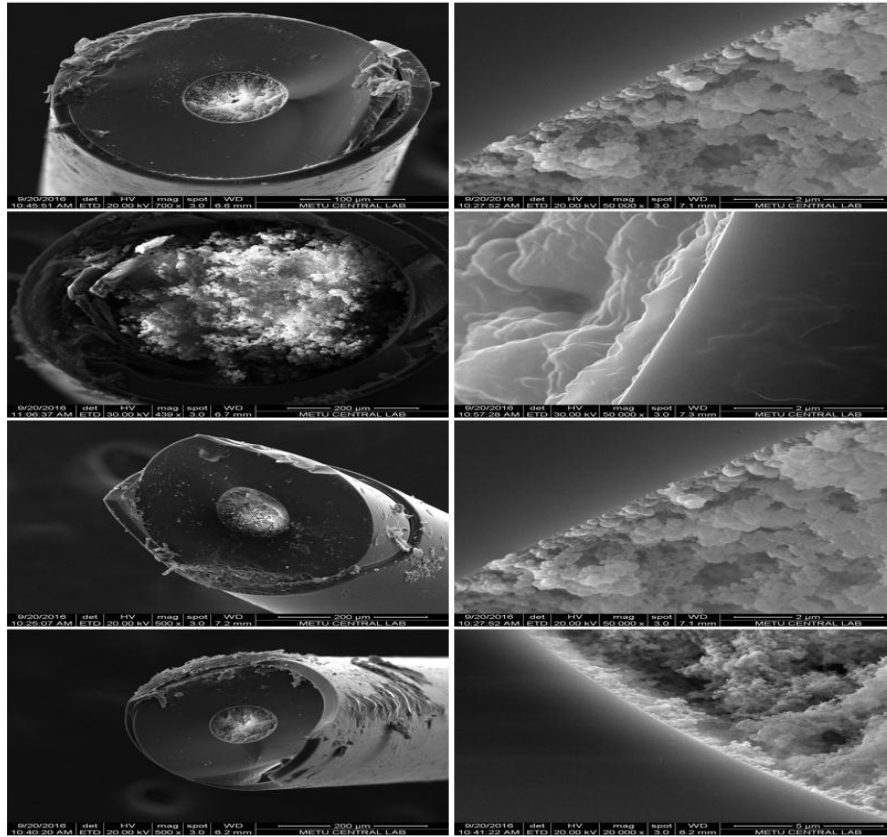
2.3.3.1 Monolitik Kolonların Hazırlanışı

Monolit kelimesinin Latince karşılığı, tek taş anlamını içermektedir. 1990'lı yılların başlarından itibaren monolitik sabit fazlar, kromatografik destek malzemesi olarak değerlendirilmesiyle en ilgi çekici mikro ayırma tekniklerinden bir tanesi olmaya başlamışlardır [177]. Monolitik kolonlar, monomerlerin, gözenek oluşturuucu karışım sistemi ve başlatıcının da bulunduğu ortamda kapiler kolon içerisinde in-situ polimerizasyonu ile hazırlanan makro gözenekli polimerik malzemelerdir. Monolitik kolonların hazırlanmasına ilişkin genel süreç, şekil 2.13.'de gösterilmektedir. Buradan anlaşılabileceği üzere ilk olarak, başlatıcının da bulunduğu ortamda monomer karışımı ve gözenek oluşturuucu sistemin karıştırılmasıyla yeni bir karışım elde edilir. Silika tabanlı monolit hazırlamak için alkoksi silan grubu bileşikler kullanılır. Hazırlanan bu yeni karışım, kolonun içerisine injeksiyon yoluyla dahil edilerek, sıcaklık ve zaman kavramına bağlı değişkenlikler yardımıyla çeşitli polimerik malzemeler için polimerizasyon tamamlanmış olur. Monolitik kolonun hazırlanması için son aşama ise kolondan, monomer yığının yıkama yoluyla uzaklaştırılmasıdır [204].



Şekil 2.13. Monolitik kolon hazırlanma süreci [205].

Elde edilen gözenekli yapı, yüksek yüzey alanı sağlamasının yanı sıra ayırma problemlerinin giderilmesi hususunda türevlendirilmiş bölge içermektedir. SEM görüntüleri alınmış polimerik tabanlı çeşitli monolitler şekil 2.14’de sunulmuştur.



Şekil 2.14. Farklı tip ve büyüklükte polimer bazlı monolitik kolonların SEM görüntüleri.

2.3.3.2. Monolitlerin Gözenek Yapısı

Monolitlerin gözenek yapısı kullanılan gözenek yapıcı çözücünün niteliğine ve hacmine bağlı olduğu kadar, çapraz bağlayıcı ve monomer ile gözenek yapıcı faz oranı ile de ilgilidir. Makrogözenekli polimer monolitlerin gözenek ve akış özellikleri, kromatografi, kataliz, doğrusal akış reaktörleri veya katı faz ekstraksiyonu gibi kullanılacak ayırma ortamına göre değişiklik göstermektedir. Kolonun hazırlanma koşulları, gözenek yapısı üzerinde oldukça etkilidir. Sıcaklık, gözenek yapıcı çözücü oranı, çapraz bağlayıcı ile monomer oranı gözenek boyutunu 10-1000 nm arasında değiştirebilen başlıca faktörlerdir [205].

2.3.3.3. Monolitlerin Kütle Aktarım Özellikleri

Monolitlerin daha yüksek performans göstermelerinin sebebi olarak kütle aktarım özelliğine sahip olması gösterilmektedir. Gözenek, difüzyon yolu çok kısa olduğu için analit, gözenek içerisine difüzyon yerine net akışla ulaşmaktadır. Monolitik kolonların film direnç özellikleri de farklıdır. Film kalınlığının daha küçük ve yüzey alanının daha büyük olduğu kabul edilmektedir. Her iki etki, kütle aktarımını arttırmakta ve monolitik akış sisteminde saflaştırma işlemini daha hızlı gerçekleştirmektedir [72].

2.3.3.4. Monolitlerin Akış Özellikleri

Kromatografi işlemlerinde temel prensip, sıvı geçirmek üzere gereken basıncın mümkün olduğunca az olması beklenir. Hareketli fazın tamamının monolit boyunca geçebilmesi gerekir. Bu durum, genel itibarıyla monolitin gözenek boyutuna bağlı sıvı geçirgenliği ile ilgilidir. Çok yüksek basınç istenmemesinin yanı sıra, yüksek ayırma kapasitesine ulaşabilmek için yüzey alanının da büyük olması istenir. İdeal bir monolit tasarlanırken, düşük akış direnci ve yüksek yüzey alanı arasında ince bir denge söz konusudur. Bu öngörünün paralelinde akış için büyük gözenekler ve yüksek ayırma kapasitesi için ise birbiriyle bağlantılı bir ağ oluşturabilecek küçük gözenekler içermelidir [72]. Monolitlerin yüksek geçirgenliği, dolgu kolonlar ile kıyaslandığında 3 kat daha düşük geri basınç oluşumunu hazırlarken, kabarcık

oluşumuna sebebiyet verebilecek fritlerin sürekli ardışık yapı oluşumuna ise gerek duyulmamaktadır [206].

2.3.3.5. Monolitik Kolonların Gelişim Süreci ve Çeşitleri

Monolitik kolonları bugüne dek gelişimleri açısından tarihçeleri bakımından, organik-polimer bazlı, inorganik silika bazlı ve organik-inorganik silika bazlı olmak üzere 3 grup altında değerlendirilebilir.

Organik monolitler, bir kapiler boru içerisinde monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve gözenek yapıcı çözücü malzemelerin birlikte kullanılmasıyla hazırlanmaktadır. Gözeneklilik, yüzey alanı ve gözenek boyutu, başlangıç monomer çözeltisi ve polimerizasyon şartlarının ayarlanmasıyla kontrol edilir [206]. Kolonların özel türevlendirilmeleri açısından farklı kimyasal ve öncüler kullanılabilir. Organik polimer bazlı monolitik kolonların polimerizasyon koşullarının basit, geniş pH aralığında etkinlikleri ile fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı kullanarak yüzeylerinin kolaylıkla modifiye edilebilmesi gibi avantajları mevcuttur [207,208]. Buna karşılık, şişme ve organik çözücülerdeki küçülme gibi etmenlerin tekrar kullanılabilirliği etkileyebileceği gibi mekaniksel kararlılığı düşürdüğü takdirde, hizmet ömrünün azalması gibi sorunlar ile karşılaşılabilir [68].

Organik polimer tabanlı monolitik kolonların şişme ya da büzülme karşısındaki dezavantajlı durumlarına karşılık, inorganik silika bazlı monolitik kolonlar ise çözücü etkisine karşı güçlü direnç göstermesinin yanı sıra, yüksek kolon verimi, etkinliği ve mekaniksel açıdan yüksek kararlılıkla dikkat çekmektedir. Monolitin üzerindeki silanol gruplarının varlığı ve iyonlaşması neticesinde gerekli olan elektroozmotik akış (EOF) sağlanabilmektedir. Silanol gruplarının asitliğinin düşük oluşu sebebiyle silika bazlı monolitler, yüksek EOF'yi sağlayabilmek için hareketli faz içerisinde pH'nın 5.0'den yüksek olduğu koşullarda çalışabilmektedir [209]. EOF sebebiyle asidik analitlerin böyle sorbentlerde analizi oldukça zordur. Bu kapsamda asidik analitlerin elektroforetik hareketliliklerinin karşıtlığı sebebiyle analiz süreleri oldukça uzun ya da numune elüsyonu yoktur. Öte yandan, sabit fazın yüzeyinin iyonlaşması ile yüklü çözelti arasındaki terisinir adsorpsiyon sebebiyle bazik bileşiklerin inorganik silika bazlı monolitlerde ayrımı kuyruklu pik

oluşumu gözlenmesine neden olur. Bu problemi çözmek için silika tabanlı monolitlerin yüzeyine yüklü fonksiyonel gruplar immobilize edilmektedir [68].

2.3.4. CEC Sisteminde Monolitik Kolonların Uygulamaları

CEC’de kullanılan kolonların Mikro LC ve nano LC’de kullanılan kolonlara nazaran benzer tarafları bulunmasına karşılık önemli bazı farklılıklarda bulunmaktadır. Öncelikle uygulanan potansiyel nedeniyle ayırmada kullanılan akım ısı üretmektedir. Bu üretilen ısı dağıtılmazsa hemen kabarcık oluşumuna neden olur, hem de kolonun bir bölümünün kurummasına neden olmaktadır. Bu yüzden kullanılan kolonların iç çapı genellikle 100 µm’yi geçmez. İlaveten elektrolit viallerine 10 bar’a kadar basınç uygulanabilir. Elektrolit’i kolon boyunca sürükleyen elektro-ozmotik akış (EOF) 1 µm’den küçük partiküllerin kullanımına olanak sağlar [72].

Yüksek kararlılık, kullanılabilirlik açısından pH aralığının geniş olması ve kolay hazırlanabilmesi açısından organik silika bazlı hibrit monolitik kolonlar oldukça dikkat çekmektedir [210]. Fang ve arkadaşları, tek basamakta sentezledikleri C18 tabanlı katyonik organik silika bazlı hibrit monolitik kolonları CEC analizlerinde kullanmışlardır [211]. CEC ile çeşitli analitlerin analizleri etkili şekilde gerçekleştirilmiştir. In-situ kopolimerizasyon yöntemiyle Yan ve arkadaşları, zwitter iyon fonksiyonel gruplar içeren kapiler monolitik kolonlar hazırlamışlardır [212]. Bir grup karışımın CEC sisteminde ayırımı bu kolon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ye ve arkadaşları tarafından geliştirilen altın nano parçacık içeren iyonik-sıvı modifiyeli silika tabanlı monolitik kolonlar literatürde yer almıştır. Silika tabanlı monolitik kolonlar ile performansı kıyaslandığında ise yüksek ayırma etkinliği ve daha iyi pikler elde edildiği gözlemlenmiştir [213]. Ayrıca, silika tabanlı monolitik kolonların termal açıdan kararsız ve hareketli fazın düşük ya da yüksek pH’da olmasını bertaraf edememesi noktasında çeşitli araştırmacılar bu durumu giderebilmek için inorganik-zirkonyum tabanlı monolitik kolonları önermiştir. Enatiyomerik bileşiklerin ayrılması hususunda Kumar ve arkadaşları, kiral selektör ile kaplanmış inorganik-zirkonyum tabanlı monolitik kolonları literatüre kazandırmışlardır [2]. Aynı grup, daha sonraki çalışmalarında bu sistemi CEC’te

kiral β -bloke edicilerin hızlı ayrılmasında kullanılmıştır [68]. Bugüne dek ayırma tekniklerine yönelik literatürde Mikro-HPLC ve CEC’de kullanılan monolitik kolonlar üzerine yapılan diğer incelemeler de bulunmaktadır [214-216].

2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler tanıma, biyolojik birçok sürecin en temel prensibidir. Antikorlar antijenleri ile enzimlerin substratları ve hormonlar ise reseptörleriyle olduğu üzere uzmanlaşmış yapılar kendi doğal hedef molekülleriyle mükemmel bir uyumluluk göstermektedirler. Bu durum neticesinde bu biyomakromoleküllerin afinite sistemlerinde tanımlayıcı moleküller olarak kullanılmasıyla birlikte analitik ve biyomedikal alanlarda uygulamalar mevcuttur. Ancak, bu moleküllerin kendi doğal ortamlarının dışına çıktıklarında kararlılıklarını kaybetmekte ve bu sebeple endüstriyel üretim aşamasında yapıya dahil olmalarının zor oluşu sebebiyle ideal bir materyal olmaktan oldukça uzaktadırlar. Bununla birlikte, miktar bakımından doğada az olup, hedef molekül için doğal reseptör olarak bulunamayabilirler. Dolayısıyla, uzun süredir araştırmacıların bu yapıları yapay olarak inşa edebilmelerini hayal etmek ettikleri bilinmektedir. Oluşturmak istenen moleküler tanıma ve bağlama yeteneğine sahip reseptörler yüksek afinite ve seçicilik ile hedeflenmektedir. Sürpriz olarak kabul edilebilecek ve aynı zamanda basit yöntemler ile moleküler baskılanmış sentetik polimerler yoluyla yapay makromoleküler reseptörler elde edilebilmektedir [217].

Moleküler baskılama, kalıp molekül tarafından yönlendirilmiş, yüksek seçicilikte polimerik malzemeleri üretebilmek için basit ama oldukça güçlü olarak kabul edilen bir yaklaşımdır. Bu yöntem yapı, boyut ve kimyasal fonksiyonlar açısından uyumluluk içerisinde belli boşluklar olan moleküllerin tanınmasını önermektedir [217]. Moleküler tanıma, reseptör ve substrat arasındaki komplekse dayanmaktadır. Bu tanımlama literatürde ilk kez Emil Fischer tarafından “Anahtar-Kilit” modeli olarak belirtilmiştir. Bu teoriye göre moleküller arası etkileşimler, enzim-substrat ya da antikor-antijen arasındaki gibi tamamlayıcı fonksiyonel gruplar arasındaki uyumluluk paralelinde düzenlenmektedir. Bu uyumlulukta, gerek yapısal, gerekse kimyasal açıdan desteklenmelidir [218].

Moleküler baskılama yönteminde uygun monomerler, çapraz bağlayıcılar, kalıp ve hedef molekül içeren türler birlikte bulunurlar. Çözelti ortamında monomerler ve çapraz bağlayıcılar, kalıp molekül etrafında elektrostatik, dipolar etkileşimler, hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri ya da π - π etkileşimleri gibi güçler desteğinde düzenlenmektedir. Bir sonraki aşamada ise polimerleşme reaksiyonu neticesinde etkileşim ağının kararlık kazanmasıyla birlikte makromoleküler malzemeler ortaya çıkmaktadır. Polimerleşme sürecinin ardından bu kez kalıp molekülün ayrılmasıyla birlikte molekülde kalıp molekülün sterik ve fonksiyonel özelliklerini barındıran yapıda boşluklar oluşmaktadır. Bu boşluklar yüksek oranda çapraz bağlayıcı ve yaklaşık % 30-80 oranında monomer vasıtasıyla kimyasal işlev kazandırılırken, seçici olarak kalıp ya da farklı bir analitin yeniden bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Buharlaştırma sürecinde matriste oluşan kalıcı porlar, iç ve dış geniş yüzeyleri meydana getirir ve bu açıdan polimerin tanıma davranışı hususunda çözücünün etkisi kuvvetlidir [219-222].

Genel itibarıyla moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır:

1.BASAMAK: Ön Kompleksleşme

Polimerleşme potansiyeli yüksek monomerler, molekülerarası etkileşim kuvvetleri vasıtasıyla kalıp molekül olarak nitelendirilen ve aynı zamanda hedef moleküle kimyasal olarak tutunmaktadır. Kendiliğinden oluşabileceği gibi kimyasal sentez ile de gerçekleşebilir. Bu etkileşimlerde iki önemli faktör; molekülün yapısı ve kimyasal özelliklerinin uyumluluğudur.

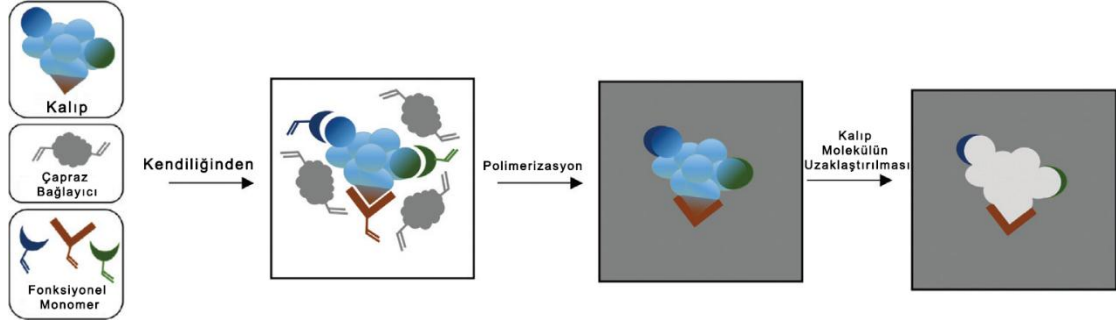
2. BASAMAK: Polimerleşme

İlk basamakta gerçekleşen monomer-kalıp kompleksine çapraz bağlayıcının eklenmesiyle, kompleksin polimerleşmesi fonksiyonel monomer üzerinden sağlanmış olur. Genel olarak serbest radikalik polimerizasyonu tercih edildiği gibi elektropolimerizasyon ya da polikondenzasyon yöntemleri uygulanabilmektedir.

3.BASAMAK: Kalıp (Hedef) Molekülün Polimerden Ayrılması

Öncelikli olarak kalıp molekül, polimerden uzaklaştırılır. Bu işlem sonrası molekülde, kalıp molekülün yapısal, boyutsal, termodinamik izlerini taşıyan ve yeni

kalıp molekülün polimere dahil olabilmesi için boşluklar meydana gelir. Kimyasal yarılma ya da çözücü ekstraksiyonu ile gerçekleşebilir.



Şekil 2.15. Moleküler Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi [217].

2.4.1. Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Üç basamakta gerçekleşen moleküler baskılama tekniğinde kullanılan kimyasal malzemeler; monomerler, çapraz bağlayıcılar, çözücüler ve başlatıcılar olarak sınıflandırılmaktadır.

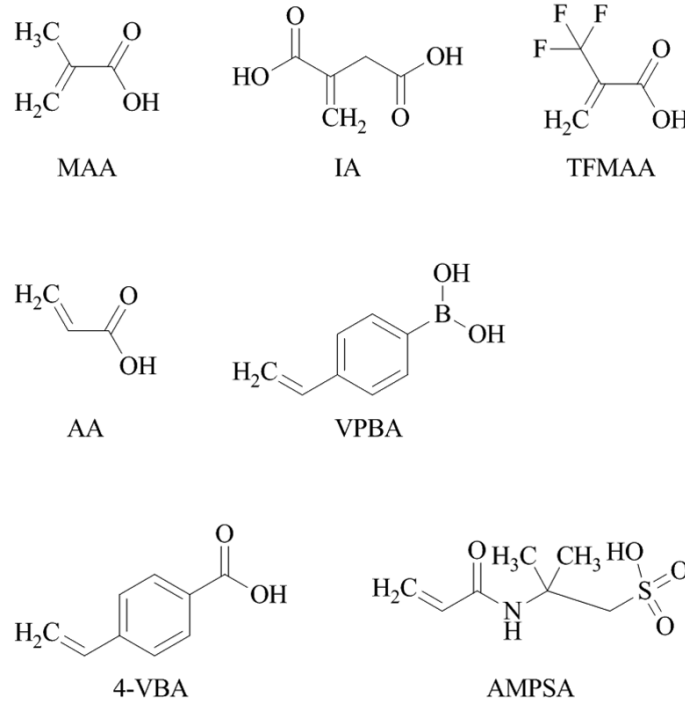
2.4.1.1. Monomerler

Polimerleşme evresi fonksiyonel monomerler üzerinden gerçekleşirken, monomerler ise bağlanma bölgelerindeki etkileşimlerden sorumludur. Baskılama yönteminin başarılı sonuç verebilmesi için seçilen fonksiyonel monomer ile baskılanacak olan kalıp molekülün kimyasal uyumunun yüksek olması oldukça önemlidir. Radikalik polimerizasyon yoluyla moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesinde çeşitli monomerler kullanılmaktadır. Bu monomerlerin büyük çoğunluğunu akrilik asit ya da stiren türevli monomerler oluşturmaktadır. Bu monomer gruplarının kullanılmasındaki başlıca sebep ise sağladıkları üst düzey esnekliğin yanı sıra hedefteki polimer ile olan etkileşime bire bir uygunluk gösterebilmeleridir. Ayrıca, bu kimyasallara ticari açıdan ulaşabilmekte mümkündür. Sahip oldukları birden fazla fonksiyonel grup sebebiyle tekli grup içeren monomerlere kıyasla moleküle tanınma seçiciliğini daha fazla yansıtacağından, bu değişkenlik aynı zamanda kopolimer sistemlerin tasarımını da kolaylaştırmaktadır. Poliakrlat ve polistiren sentezi için kullanılabilecek fonksiyonel

monomerleri asidik, bazik ve nötral olmak üzere gruplandırabileceği gibi hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere alt gruplara da sınıflandırılabilir. Asidik monomerler içerisinde Metakrilik asit (MAA) ve bazik gruptan ise 4-vinilpiridin (4-VP) en yaygın olarak kullanılan monomerlerdendir. Akrilik asit amitleri ve esterlerinin yanı sıra metakrilik asit en sık kullanılan monomer türleridir. Kovalent baskılamada kalıp molekülü ile monomer türevleri arasında kovalent etkileşimler gözlemlenirken, kovalent olmayan baskılama türünde ise vinil gruplarının çeşitli türevleri seçilmektedir [223-225].

2.4.1.1.1. Asidik Monomerler

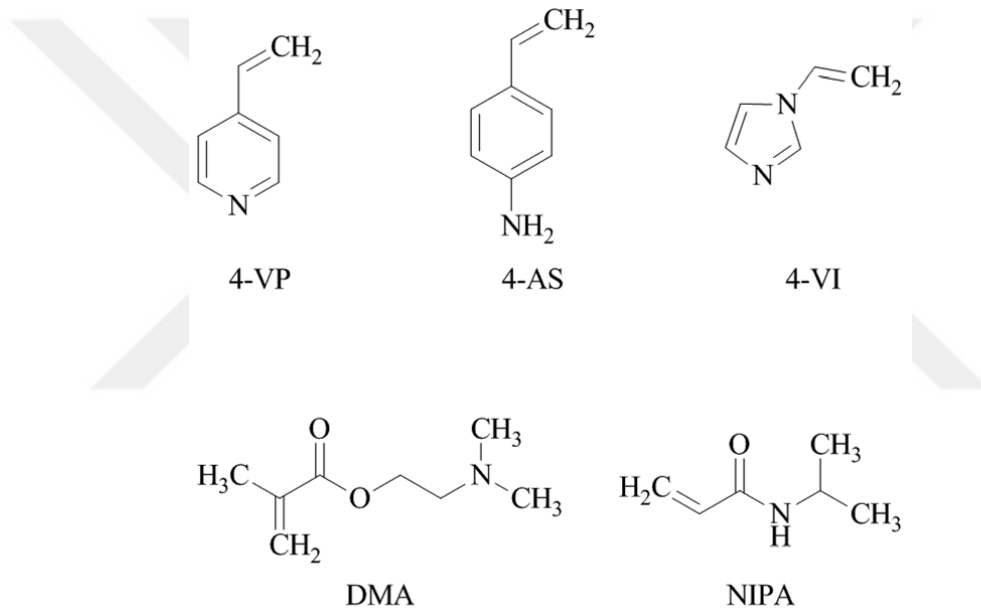
Asidik monomerler amin gruplarına iyonik etkileşim sağlar, amit, karbamat ve karboksil gruplarına ise hidrojen bağı formasyonunda görev yapar. Metakrilik asidin yanı sıra, akrilik asit (AA), 4-vinilbenzoik asit (4-VBA), itakonik asit (ITA), 2-(triflorometil) akrilik asit (TFMAA), p-vinilfenilboronik asit (VPBA) ve 2-akriloamido-2-metil-1-propansülfonik asit (AMPSA) moleküler baskılama tekniği ile sentezlenen polimer eldesinde kullanılan diğer asidik monomerlerdir [224].



Şekil 2.16. Asidik fonksiyonel monomerler [217].

2.4.1.1.2. Bazik Monomerler

Bazik monomerler, kalıp molekülün karboksil gruplarının işlevselliğiyle etkileşim gerçekleştirir. 4-VP'nin yanı sıra, 4-aminostiren (4-AS), 1-vinilimidazol (1-VI), 2-(dimetilamino)etil metakrilat (DMA), N-izopropilakrilamid (NIPA) gibi bazik grupta değerlendirilen fonksiyonel monomerlerin kullanıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır [Ullmann 20.21]. 4-VP ve DMA'nın kullanıldığı çalışmalarda seçilen kalıp moleküller olarak steroid olmayan ve tahriş edici özelliği bulunmayan malzemeler seçilirken, yine 4-VP, VI ve DMA'nın yer aldığı işlemlerde kalıp molekül olarak amino asit türevlerinin tercih edildiği çalışmalar literatürde bulunmaktadır [223].



Şekil 2.17. Bazik fonksiyonel monomerler [217].

2.4.1.1.3. Nötral Monomerler

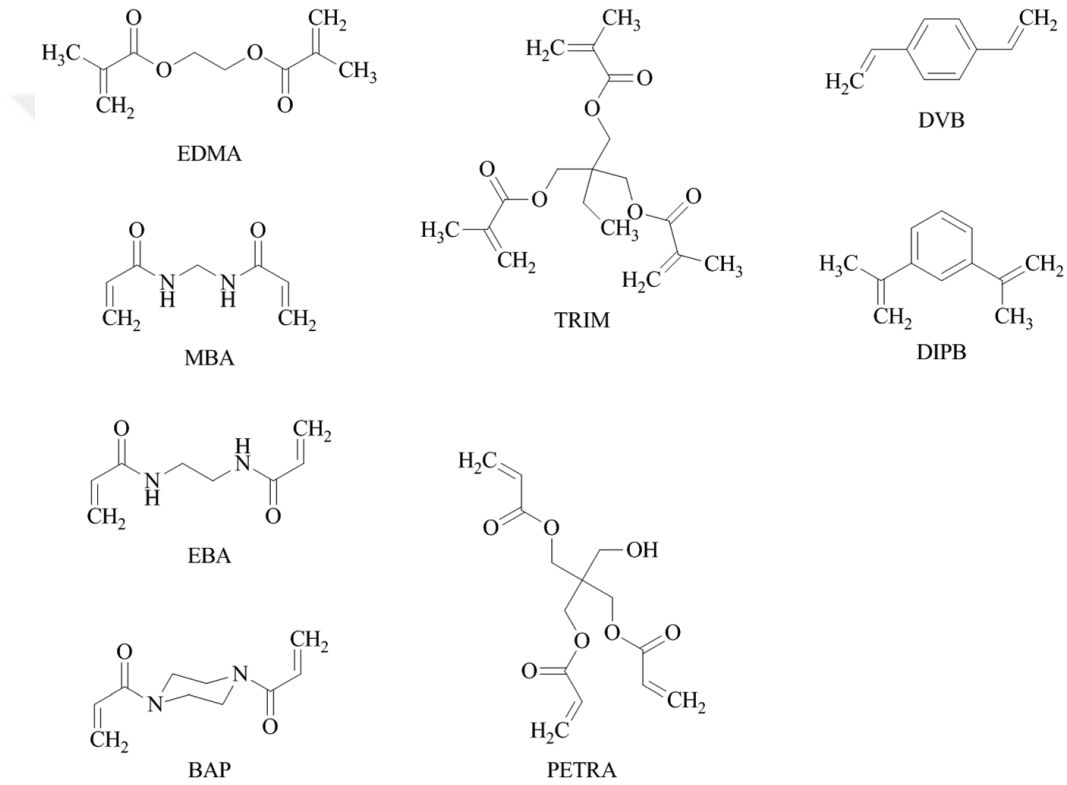
Akrilamid (Aam), metakrilamid (MAAm), N-Vinilpirolidin (NVP), stiren (S) ve 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) bu grup monomerler içerisinde yer almaktadır. Nötral monomerlerden bazıları, örneğin AAm, amino asit türevlerinin baskılanmasında kullanılmaktadır [223, 225]. İmmunoglobulin gibi bazı kompleks moleküllerin baskılanmasında 4-VP ve AAm'nin birlikte uygulandığı gibi nötral monomerler asidik ya da bazik monomerler ile birlikte kullanılabilir [Ullmann20]. Çok sayıda hidrojen bağı yapma amacıyla 2,6-bis(akrilamid)piridin gibi fonksiyonel

monomerlerin sentezlendiği çalışmalar literatürde yer almaktadır [Ullman 10]. Öte yandan, son dönemde floresans özellik göstermek bakımından seçici tanınma ve hassas deteksiyon içerikli trans-4-[p-(N,N-dimetilamino)stiril]-N-vinilbenzenpiridinyumklorür kullanımında rastlanmaktadır [226-228].

2.4.1.1.4. Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler baskılama tekniğinde fonksiyonel monomerler ile birlikte çapraz bağlayıcılara da ihtiyaç duyulmaktadır. Çapraz bağlayıcı olarak işlev gören gruplar, aynı zamanda birden fazla fonksiyonel grup içermekte ve bu özellikleri sayesinde kalıp moleküllerle etkileşim yaptıkları gibi birden fazla rolde üstlenmiş olurlar [225,230]. Organik çözücüler içerisinde kullanılmakta olan etilen glikol dimetakrilat (EDMA), çapraz bağlayıcılar içerisinde en yaygın kullanılan malzemedir. EDMA'nın faydaları arasında molekülde gözenek oluşumuna katkı vermesinin yanı sıra kalıp molekül ile kovalent olmayan etkileşim yapmaya yardımcı olması da gösterilebilir [231]. EDMA'nın kimyasal yapısına göz attığımızda arasında kısa mesafe bulunan bir reaktif ve prokiral metakrilat ester yapısı bulunmaktadır. Bu durum rijit polimer yapısına yol açmasına karşılık, C-C bağı arasında glikol grubunun fonksiyonları ile sınırsız noktada polimer etkileşimi kurulabilmektedir. Çapraz bağlayıcıya ait iki metakrilat ester grubu arasındaki zincirin uzamasıyla polimerin esnekliği de arttırılabilir [223]. Membranların sentezlenmesinde bu durum ilgi çekmektedir. EDMA'ya karşılık yüksek yükleme kapasitesi, kromatografik çözünürlük kapasitesi ve seçicilik gibi faktörler noktasında daha iyi sonuçlar verdiği saptanan tri metilol propan trimetakrilat trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) ve pentaeritirol triakrilat (PETRA) gibi üç fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcılar, moleküler baskılama tekniğinde kullanılmakta olan diğer önemli çapraz bağlayıcılar olarak dikkat çekmektedir [229]. Birden fazla fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcılara örnek bir başka grup olarak penta eritirol tetrakrilatın çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır [223, 225, 228, 232, 233]. Biyopolimerlerin kalıp molekül olarak kullanılması halinde polimerleşme sulu çözelti ortamında gerçekleşmek zorundadır. Bu durum çapraz bağlayıcı seçimini sınırlı hale getirmektedir. Sudaki

çözünürlük derişimi dikkate alındığında ise N,N-Metilen bis(akrilamid) (MBA), N,N-Metilen bis(akrioloil) piperazin (BAP) en yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı türleri olarak bu alanda öne çıkmaktadır [233]. Polarite mertebesinde bir başka örnek verilecek olursa, stiren türevli divinil benzen (DVB) lipofilik karakterli en yaygın çapraz bağlayıcıdır. DVB, EDMA'dan daha dayanıklı olmakla birlikte moleküler baskılama tekniğinin uygulandığı çalışmalarda yalnızca 1,3-di izopropenil benzenin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı çalışmalarda literatürde yer almaktadır [223]. Ayrıca, poliakrilat çapraz bağlayıcı gruba sahip benzen türevleri ya da benzoik asitin kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır [225].



Şekil 2.18. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar [217].

2.4.1.1.5. Çözücüler

Çözücülerin, polimerizasyon sırasında yüklendiği görevler arasında tüm bileşenlerin tek bir fazda tutulması amacı taşındığı gibi baskılanmış polimerdeki gözenek sayısını arttırmak ve hedef molekülün bağlanışını kolaylaştırmak temel

prensiplerdir. Polimer yüzeyindeki gözenek sayısını arttırabilmek için aynı anda birden fazla çözücülü sistemlerde deneysel koşullarda uygulanabilmektedir [217].

2.4.1.1.6. Başlatıcılar ve Sıcaklık Etkisi

Polimerizasyon işlemi sırasında sıcaklık önemli bir parametredir. Sıcaklık, kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimlerin dengelenmesinde rol oynadığı gibi kalıp molekülün bozunmaması açısından da önemlidir. Polimerizasyon sıcaklığının düşük tutulduğu takdirde, kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşimler daha kararlı hale gelirken, bunu termal etki neticesinde açıklanabilmektedir [225]. Çalışmalar göstermektedir ki, düşük sıcaklıklarda gerçekleşen polimerizasyon işlemi sonrası elde edilen moleküler baskılanmış polimerlerin, yüksek sıcaklıklara ulaşıldığında elde edilen türlere karşılık daha seçici özellikler taşımaktadır. Devamında, düşük sıcaklıkta ve daha yavaş gerçekleşen polimerizasyon işlemi neticesinde polimerizasyonun kontrollünün daha kolay sağlanabildiği ve böylece güçlü bir şekilde tekrarlanabilirliğini de işaret edilmektedir [234]. Bu etmenler göz önünde bulundurulduğunda serbest radikalik polimerizasyon çalışmalarında düşük sıcaklıktaki reaksiyonlar tercih edilen koşullardır. En yaygın başlatıcılardan bir tanesi konumundaki 2'-azobis(2-metilbütironitril) (AIBN)'nin fotoliz ve termoliz neticesinde bozunabilir oluşu, bu temeli desteklemektedir. Başlatıcının niteliği ve miktarı polimerizasyonu etkilediği kadar, moleküler baskılanmış polimerlerinde yapısı ve özelliklerini de etkiler [Ullman6]. Serbest radikalik polimerizasyon, monomer derişimi ile kıyaslandığında %1 kadar başlatıcı kullanılarak moleküler baskılı polimerin elde edilebilecek en yüksek saflıkta olmasını tercih eder [234].

2.4.2 Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama tekniğinin geldiği nokta, doğanın taleplerinin karşılanmasının bir sonucudur. Enzimler, hormonlar ya da antikorlar gibi biyolojik maddeler sıklıkla kendi spesifik hedef molekülleriyle birleşmektedir. Ancak, kendi doğal ortamlarının dışına çıktıkları zaman niteliklerinin uğradığı deformasyonların yanı sıra onları immobilize etmek ya da ucuz olmayan saflaştırma koşulları nedeniyle yüksek sıcaklık, geniş pH aralığı, organik ve inorganik çözücülerin yanı sıra basınç

karşısında dayanıklı insan yapımı malzemelerin işleve dahil olması öne çıkmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerler bu her iki dünyayı bir araya getirmek konusunda tasarlanan ve sentezlenen mükemmel malzemelerdir. Yapının kendi doğasını kaybetmeden insan yapımı malzemelerinde özelliklerini taşıması açısından yalnızca reseptörler olarak değil, enzim analogları olarak da işlev görürler Moleküllerin birbirine bağlanması konusunda temel husus güçlü etkileşimlerdir. Bu etkileşim, kalıp molekülün fonksiyonel gruplarıyla polimerin fonksiyonel grupları arasında gelişmektedir. Genel itibariyle moleküler baskılama yöntemleri, kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemi olmak üzere iki yaklaşım üzerinden gruplandırılmaktadır [217].

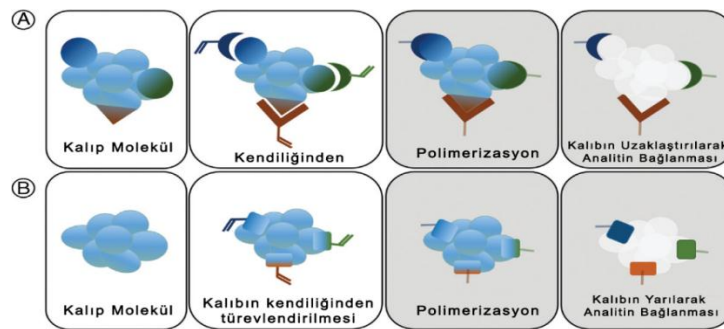
2.4.2.1. Kovalent Etkileşimler

Kovalent etkileşimler, polimerleşebilen kalıp türevlerinin polimerleşmesini sağlaması olarak tanınmaktadır [219, 235]. Bu yüzden kalıp moleküllerinin türevlendirilebilecek en az 1 fonksiyonel grubu olması gerekir. Bu gruplar aldehit, keton, alkol, amin ve karboksilik asit grupları olabilir. Kovalent baskılamada, polimerizasyon öncesi kalıp molekül ile monomerler arasında tersinir kovalent bağlar oluşur. Sonrasında ise bağın kırılmasıyla kalıp molekül ortamdan ayrılırken, sonrasında aynı kovalent bağ üzerinden yeniden bağlanma gerçekleşir. Başarılı bir baskılama gerçekleştirebilmek için kalıp molekülün olabildiğince en yüksek oranda uzaklaşması gerekir. Kalıp molekülün yeniden bağlanabilmesi için kovalent bağın yeniden kurulabilmesi sebebiyle katılım, kovalent olmayan etkileşimlere nazaran daha geç gerçekleşir. Kovalent yaklaşımda kalıp molekül ile monomer arasındaki stokiyometrik oran, aralarındaki kovalent bağ ile ilişkilidir. Analitin yeniden bağlanma işlemi ise yalnızca boşluklarda gerçekleşir. Kovalent yaklaşımda kullanılan çapraz bağlayıcının yüksek miktarda oluşu, polimerin kimyasal kararlılığı açısından monomer ile kalıp molekül arasındaki stokiyometrik orana bağlıdır. Kovalent etkileşimler en önemli dezavantajı ise parçalanabilen kovalent bağ sayısının sınırlı oluşudur. Öte yandan, polimerleşebilen kalıp molekül türevinin sentezlenmesi ekstra gerekebileceğinden bu durum reaksiyon sürecini

uzatabilir. Dolayısıyla, bu yöntemi daha karmaşık ve kovalent olmayan etkileşim yöntemiyle kıyaslandığında daha az uygulanabilir kılmaktadır [217].

2.4.2.2. Kovalent Olmayan Etkileşimler

Kovalent yaklaşımın aksine kovalent olmayan yaklaşımda ise nispeten daha zayıf monomer-kalıp moleküle etkileşimi bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bu yüzden, kalıp molekülün ayrılması ve boşluğa bağlanması daha kolaydır. Bu aşamada yardımcı bir metod olarak yarı-kovalent isimli yöntem önerilmiştir. Bu yaklaşımda ise kovalent bağlar polimerizasyon öncesi oluşurken, yeniden bağlanma ise kovalent olmayan etkileşimler yoluyla gerçekleşir [223, 231]. Kalıp molekülün polimerleşmesinden kaçınarak, kovalent olmayan etkileşimler ile moleküler baskılanmış polimer sentezi daha kolay gerçekleşir. Kovalent olmayan etkileşimlerin çeşitliliği nedeniyle neredeyse kalıp molekülün tamamı kovalent olmayan baskılamada kullanılabilir. Kalıp molekül ile monomer arasındaki etkileşim ne kadar yakın olursa, aralarındaki bağ da o kadar kuvvetli olur. Yüksek seçicilik ise hidrojen bağı ya da elektrostatik etkileşimler gibi güçlü etkileşimlere dayalıdır. Ancak, biyobaskılama işleminde kalıp molekül türleri aynı anda iyonik, hidrojen bağı ya da hidrofobik etkileşimler gibi farklı etkileşimlere girebileceğinden bu açıdan bakıldığında kovalent etkileşimlere nazaran daha fazla çeşitlilik ortaya çıkmış olacaktır. Bu durum daha çok işlevselliğin önünü açmaktadır. 90'lı yıllardan itibaren literatürde yer alan çalışmaların çoğu moleküler baskılama tekniği yönteminde kovalent olmayan etkileşimlerin yer aldığı çalışmalar olması, bugün itibarıyla bu yöntemin daha çok tercih edildiğinin bir göstergesidir [236].



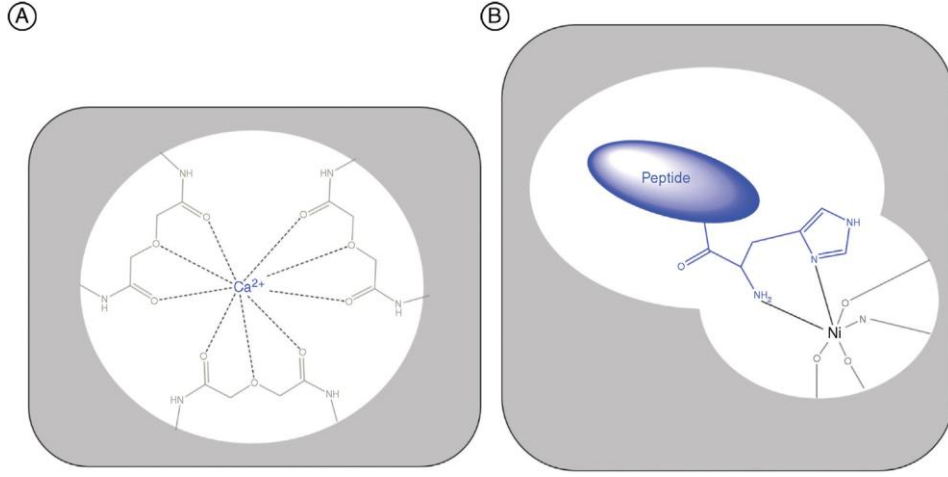
Şekil 2.19. Kovalent olmayan (A) ve Kovalent (B) baskılamanın karşılaştırılması [217].

Çizelge 2.2. Kovalent ve Kovalent olmayan bağlanma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlı yönlerinin karşılaştırılması

Kovalent bağlanma	Kovalent olmayan bağlanma
Avantajları - Bağlanma bölgelerinin homojen fazda olması - Polimerleşme sürecinde seçici olmayan bağlanma bölgelerinin minimizi edilmesi. Dezavantajları - Polimerleşebilen kalıp moleküllerinin sentezlenmek zorunda kalınması, - Kalıp moleküllerinin sınırlı oluşu, - Güçlü kovalent bağlı olması sebebiyle kalıp molekülün kolay ayrılması, - Analitin yavaş bağlanması	Avantajları - Hazırlanmasının kolay oluşu, - Kalıp molekülün MIP'den kolay ayrılması, - Kalıp moleküller aralığının geniş oluşu, - Fonksiyonel monomer bakımından çeşitlilik, - Kalıp molekül neredeyse tamamının ayrılması, - Analitin bağlanmasındaki kütle transferinin hızlı gerçekleşmesi Dezavantajları - Fonksiyonel monomer miktarının fazla gelmesi halinde seçici olmayan bağlanma bölgelerinin oluşma riski

2.4.2.3. Metal İyon Değişikliği Yöntemi

1990 yılından itibaren günümüze, metal iyonlarının da monomer-kalıp molekül arasındaki etkileşimi koordinasyon bağlarıyla kararlı hale getirdiği ve moleküler baskılamaya dahil olduğu çalışmalar literatürlerde mevcuttur [217]. Oluşan kompleksin kararlılığına bağlı olarak metal iyonların kullanıldığı moleküler baskılama yönteminin uygulanması hem kovalent, hem de kovalent olmayan etkileşimleri desteklemektedir. Baskılama yönteminde kullanılan metal iyonlarının iki farklı rol alabileceği sunulmaktadır: Buna göre, metal iyonları kalıp molekülün baskılanmasında kalıp aracı olarak işlev görebileceği gibi, fonksiyonel monomer grupları içeren ligandlar gibi de davranabilmektedir [217].



Şekil 2.20. Metal iyonlarının baskılama yönteminde kullanılmasıyla yaptıkları görevler: A: Kalıp olarak metal iyonları B: Metal iyon vasıtasıyla baskılama [217].

2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) kullanım alanları oldukça geniştir. Bu alanları başlıca gruplandırarak olursa, Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), ayırma yöntemleri içerisinde Kapiler Elektroferez (CE)'nin yanı sıra sensörler, kataliz, membranlar ve tahlil çalışmalarında uygulanabilmektedir [217].

2.4.3.1. Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Moleküler baskılı polimerlerin en sıklıkla uygulandığı alan olarak katı-faz ekstraksiyonu gösterilmektedir. Literatürde, hem MIP fiberler ve hem de MIP partiküller ile doldurulmuş kartuş-şırınga sistemleri yer almaktadır. Bununla birlikte, bazı kaynaklarda katı-faz ekstraksiyonu olarak bahsedildiğinde Moleküler Baskılı Katı-Faz Ekstraksiyonunu (MIPSPE) işaret ettiği bilinmektedir. Seçicilik bağlamında MISPE'nin, klasik SPE metotlarından bariz üstünlüğü bulunmaktadır. Birçok analitik yöntem, numuneyi zenginleştirmek ya da bütünden parçayı ayırabilmek için ön deneme işlemi gerektirmektedir. Numune, yıkama ve hedef molekülün elüt işleminin ardından sabit faza yüklenmektedir. Çözücü seçimi, bu noktada en önemli işlemdir. Moleküler baskılma sentezinde tercih edilen çözücü ile

hareketli faz aynı olduğu takdirde yeniden bağlanma gerçekleşir. Yıkama işlemi sırasında var ise istenmeyen moleküller herhangi bir desorpsiyon işlemi olmadan, katı fazdan uzaklaştırılır. Reaksiyonun sonunda ise elüsyon çözücü analite bırakılır. Etkin seçicilik ve yüksek saflaştırma verimi sebebiyle MISPE, gıda analizlerinde oldukça tercih edilen bir yöntemdir [237]. MISPE yönteminde hedef moleküle eşleşecek ve ön deneme işleminde kullanılacak moleküller arasında herbisitler, pestisitler, antibiyotikler, endokrin bozucular, toksinler, katkı maddeleri, proteinler, eser metalleri ve farmasötik ürünleri kapsamaktadır [236-238]. Ayrıca, MIP'ye dayalı Katı-Faz Mikroekstraksiyon yöntemi (SPME) Gaz Kromatografisinde (GC) sıklıkla uygulanmaktadır. İç yüzey üzerinde MIP içeren silika bazlı kapiler boru bulunmaktadır. Numunenin doldurulma işleminin ardında kalıp molekül termal olarak uzaklaştırılır ve GC'ye doğrudan enjekte edilir [230, 236-238].

2.4.3.2. Ayırma Tekniklerinde Moleküler Baskılanmış Polimerler

Polimerlerin moleküler baskılanma yöntemiyle elde edildiği ilk zamanlarda kovalent yaklaşım, karbonhidratlar ya da amino asitler gibi optikçe aktif biyomoleküllerin ayrılması işleminde kalıp moleküller ile monomerler arasındaki diester kovalent bağları kullanılarak uygulanmıştı [235]. Ancak, kovalent olmayan etkileşimler yöntemiyle moleküler baskılanmış polimerlerde yeniden bağlanmanın hızlı gerçekleşmesi, bu yöntemin daha sonraki süreçte daha çok tercih edilmesine aracılık etmiştir. Yüksek performanslı ayırma esasen analitin, sabit fazdan hızlı adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemine dayanır. Tabanlanmış ve toplu partiküller seçicilik gösterebilirler, bununla beraber geniş afinite dağılımı barındıran bağlanma bölgeleri içermektedirler. Bu yüzden, etkili ayırma ve düşük maliyet için süspansiyon, emülsüyon ve çöktürme polimerleşmesi tercih edilir. Ek olarak. HPLC ayırımlarında moleküler baskılanmış monolitlerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [239,240]. Bu sistemlerin aynı zamanda kiral ayırımlar için de mükemmel çözümler verdiği kanıtlanmıştır [223, 241, 242]. Benzer sonuçlar, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Kapiler Elektroferez (CE) yöntemlerinin bileşke metodu olarak kabul edilen Kapiler Elektrokromatografi (CEC) sistemlerinde de gözlemlenmiştir. Bu seçicilik, moleküler baskılama

teknolojisinin uygulanmasıyla kiral moleküllerin açık tübüler kolonlar, monolitler ya da partiküllerde ayrılma işlemleriyle daha da geliştirilebileceği sunulmaktadır [243].

2.4.3.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Diğer Uygulamaları

MIP teknolojisi aynı zamanda yeni ilaç taşıyım sistemlerinin tasarımı, zaman düzenlenmesi ve hassas salınımı gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra protein kristallizasyonunda başlatıcı olarak test edilmektedir. Baskılanmış parçacıklar ise bağışıklık sisteminde doğal antikorların, antikorlar ile değiştirilmesinde görev almaktadır [244, 245]. Moleküler baskılanmış polimerlerden organik kimya sentezlerinde koruyucu grup olarak kovalent etkileşim yöntemiyle faydalanılmaktadır [246]. Son olarak, bu polimerler enzim gibi katalizör göreviyle kovalent baskılama yöntemiyle uygulanabilmektedir [235].

2.5. Kiral Ayırımın Gerekliliği

Optikçe aktif bileşiklerin birbirleriyle her türlü stereospesifik etkileşim yapabilme yeteneği sayesinde canlı sistemler için kiral tanımlama çok önemli bir rol üstlenmektedir. Moleküler düzeyde kiralite, yaşamın dayanak molekülleri olarak proteinler, peptitler, şekerler ve onların yapı taşları amino asitler, monosakkaritler ve polisakkaritler gibi bileşikler için kendine özgü temsil arz etmektedir. Sonuç olarak, biyolojik sistemler tarafından aracılık edilen metabolik ve düzeleyici süreçler stereokimya açısından duyarlı olup, enantiomer çiftlerinin aktiviteleri kıyaslandığında farklı tepkiler gözlenebilmektedir. Bu yüzden, biyolojik bağlamda sahip oldukları özellikler sebebiyle enantiomerler farklı bileşikler olarak tanımlanmaktadır

Kiraliteye olan ilgi ve onun bilimsel dayanaklı sonuçları yeni bir olgu değildir. Ancak, son 20 yıl içerisinde ekonomik beklentiler sebebiyle yeni kiral bileşiklerin ortaya çıkması ve bu durumun özellikle ilaç sanayiinde çok önemli katkılar verdiği gözlenmektedir. Geniş bir yelpazede, ilaç enantiomerlerin biyolojik açıdan uygunluk, dağılım, boşaltım ve metabolik davranışlarına ilişkin yer alan örnekler mevcuttur.

Şimdilerde ise yalnızca ilaç maddeleri değil, tarımsal kimyasallar, gıda koruyucu ve katkı maddeleri, katalizörler ve birtakım yeni malzemeler sahip oldukları ekonomik ve bilimsel potansiyel sebebiyle gıda, tarım, başta olmak üzere yaşamın büyük bölümünde ekonomik hassasiyet göz önünde bulundurulduğunda önemli bir yere sahiptir. Bu açıdan bakıldığında, kiral ilaçlardan bahsedildiğinde bu kapsam bahsettiğimiz bu kimyasallar ile rahatlıkla genişletebilmektedir.

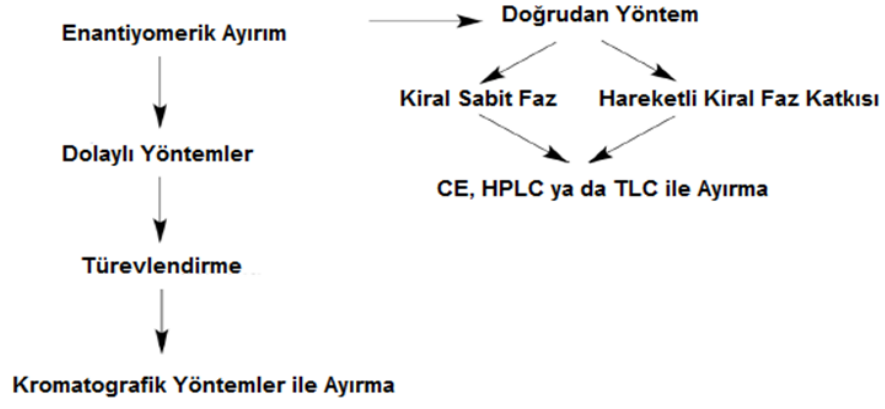
Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında kiral bileşiklerin enantiyomerik ayırımlarının gerek güvenli ve etkili çözümler sunması, başta akademik çevreler olmak üzere diğer sanayi ve araştırma alanlarında kullanılması amacıyla optikçe aktif bileşikler analitik bir görev üstlenmekte ve gerek ayırımlar gerekse de analiz işlemlerinde uygulamaları önerilmektedir. Enantiomerce saf bileşiklere olan gereksinim arttıkça, enantiomerlerin farklı özellikler barındıran bileşiklerinin analitik ayırım metotları için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda kapiler elektrokromatografi bu ihtiyaca cevap vermek konusunda başarılı bir yöntem olarak literatürde yer almaktadır [245].

2.5.1. Ayırma Teknikleriyle Kiral Tanımlama

Ayırma teknikleri yöntemiyle enantiomerleri ayırabilmek için öncelikle kiral ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, kiral seçiciler, kiral reaktifler ve aralarındaki enerji farkını kullanarak enantiomerlerin ayrılmasına olanak sağlayan taşıyıcı yapıdaki diastromik türler gereklidir.

Enantioayırımlar doğrudan ya da dolaylı yöntemler olmak üzere iki farklı başlık altında gerçekleştirilebilir. Dolaylı yöntemde analit enantiomer, kovalent bağ vasıtasıyla bir enantiomer çifti oluşturmak üzere kiral reaktifle etkileşime girer. Sonrasında ise diastromerler ise akiral koşullarda fiziksel ya da kimyasal özellik farklılıklarına dayanarak ayırımları gerçekleştirilir. Bugünlerde ise bu yöntem çeşitli sınırlandırmalar sebebiyle daha az tercih edilmektedir. En önemli sınırlılık konusu ise gerekli olan yüksek enantiyomerik saflıktaki kiral reaktifin hem pahalı hem de bulunabilirliğinin az olmasıdır. Alternatif olarak en sıklıkla kullanılan doğrudan yöntemde ise kovalent olmayan ve geçici diastromerik etkileşimler temel alınır. Bu durumda enantiomerlerin kiral ortamda ayrılması, kiral seçici olarak sabit bir faz ve

onunla etkileşim halindeki enantiomerik karışımı içeren hareketli bir faz ilavesi yöntemiyle gerçekleştirilmektedir [246].



Şekil 2.21. Enantiyomerik Ayırım Şeması.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez döneminde yapılmış olan deneysel çalışmalar ve uygulanan sistemler aşağıda yer almaktadır.

3.1 Kromatografik Analiz Sistemleri

Enantiyomerik ayırım için analizler CEC sistemi (Prince CEC-760, Hollanda) ile yapılmıştır. Diyot array dedektör (DAD), UV lamba ve elektriksel güç sağlayıcısı içeren cihaz Şekil 3.1' de görülmektedir. Ayrıca analizler için uzun kapiler mod sistemi kullanılarak metodlar uygulanmış ve bu yöntem analiz yöntemi olarak seçilmiştir. Kapiler kolonların şartlandırılması hususunda μ HPLC pompa kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kapiler Elektrokromatografi sisteminde kullanılan Prince CEC-760 cihazı.

3.2 Kimyasal Malzemeler ve Yöntem

Tez kapsamında deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Ön kompleksleştirici monomer olarak seçilen ve moleküler yapısı Şekil 3.2.'de gösterilen N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA), Nanoreg, (Ankara)'dan satın alınma yoluyla temin edilmiştir. Hidrofobik amino asitler; L-tirozin, L-triptofan ve L-fenilalanin ile birlikte çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilendimetakrilat (EDMA)

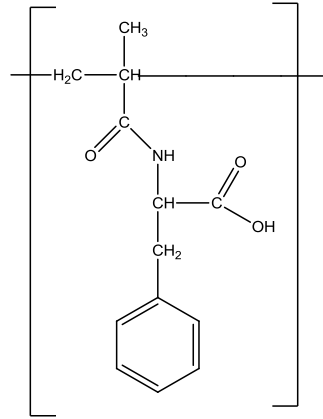
kimyasalları Sigma Aldrich, (Almanya) firmasından temin edilmiştir. AIBN (Azobisisobütironitril), asetonitril (ACN), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), asetik asit (CH_3COOH) ve analitik saflığa sahip olan diğer kimyasallar Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) alınmıştır. Silanlama ajanı olarak kullanılan kimyasal 3-trimetoksisililpropilmetakrilat (TMSPM), Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler, 4.0 M nitrik asit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kullanılmıştır.

Enantiomerik ayırım amaçlı kullanılan 100 μm 'lik iç çap (I.D 100 μm) ve 360 μm 'lik dış çapa (O.D 362 μm) sahip kapiler kolonlar (Polymicro Technologies Capillary Tubing) Molex firmasından satın alınarak temin edilmiştir.

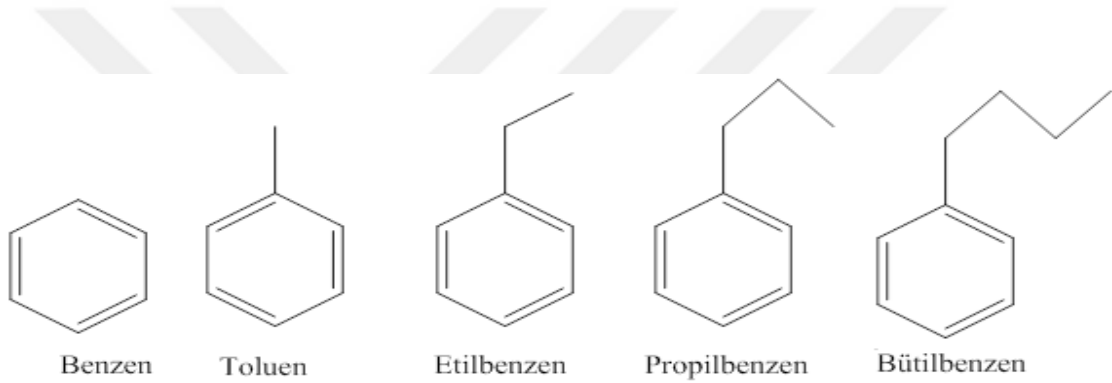
Kolonun ayırma gücünü test etmek amacıyla kromatografik karakterizasyon çalışmalarında alkil benzen türevleri olarak benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen ve butilbenzen kullanılmıştır. Alkil türevli bileşiklerin açık yapıları Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.

Deneylerde pH ayarlaması yapmak üzere genel olarak fosfat tamponu tercih edilmiştir. Tampon çözeltileri hazırlamak için uygun pH'ı ayarlayabilmek için di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum di hidrojen fosfat (NaH_2PO_4), hidroklorik asit (HCl) ve sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileri Merck firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

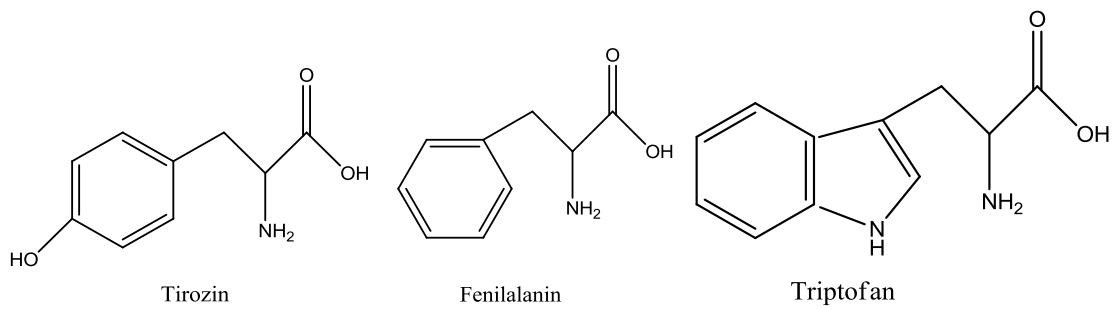
Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18.02 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ ' dir.



Şekil 3.2. Polimetakrilat monolitik kolon sentezinde kullanılmak üzere fonksiyonel monomer olarak seçilen N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA)'nın açık yapısı.



Şekil 3.3. MAPA bazlı monolitik kolonun kromatografik ayırımını test etmek için seçilmiş alkil türevleri.



Şekil 3.4. Kromatografik uygulama olarak enantiyomerik ayırımı gerçekleştirilen aminoasitlerin kimyasal yapıları.

3.2.1. Deneysel Yöntemler

3.2.1.1. N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) Monomerinin Sentezi

N-metakriloil-(L)-fenilalanin (MAPA) monomerinin sentezi literatürde verilmiştir [247]. Buna göre ilk olarak, 5.0 gram fenilalanin ve 0.2 gram sodyum nitrit karışımı, 30 mL %5 (w/v)'lik potasyum karbonat içerisinde çözülür. Bu karışım daha sonra üç boyunlu 100 mL'lik damıtma hunisinin içine alınır. Reaksiyon, azot gazı altında manyetik olarak karıştırılarak 0°C'de buz banyosunda soğumaya bırakılır. Reaksiyon üzerine 6 mL metakriloil klorür çözeltisi damla damla ilave edilir. Buz banyosundan alınan karışım daha sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca karıştırılır. Bu işlem sonrası karışımın pH ayarlaması gerçekleştirilir ve pH 3.0'a getirilir. Elde edilen ürün 50 mL kloroform çözeltisinde ekstrakte edilir. Fazların ayrılması işleminin ardından organik fazda magnezyum sülfatla ($MgSO_4$) nemi alınırken, kloroform çözeltisi evaporatörde buharlaştırılır. MAPA monomeri son olarak, eter-sikloheksan karışımından kristallendirilir.

3.2.1.2. Kapiler Kolonun Kullanıma Hazırlanması

Kapiler kolonlar genellikle silikadan (SiO_2) üretilir. Silanizasyon işlemi ile kromatografik çalışmayı gerçekleştirmek üzere hazır hale getirilir. Silanizasyon işleminin gerekliliği, kolonun iç yüzeyinin silanol ($SiOH$) grupları ile kaplanmış olmasının EOF'yi olumsuz yönde etkileyebileceği düşüncesine dayanır. Bu amaç doğrultusunda ise silanol gruplarının iyonlaştırılarak ($Si-O^-$) şekline dönüştürülmesi gerekir [217].

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kapiler kolonların toplam uzunluğu 38 cm ve monolit içeren kısım olarak baz alındığında etkinlik uzunluğu 30 cm olarak belirlendi.

Silanizasyon işlemleri 750 mBar basınç altında gerçekleştirildi. Bu işlemler için ilk olarak kolonların yüzeyi, polimerizasyon çözeltilerinin kolon içerisine enjekte edilmeden önce yüzeyi aktif hale getirildi. 3 saat süresince 0.2 M NaOH çözeltisi, sonrasında ise 30 dakika deiyonize su ve devamında 30 dakika boyunca N_2 gazları geçirildi. 1 saat boyunca, TMSMP ve metil alkol çözeltilerinden eşit hacimde (%50:%50) karıştırılan çözeltinin kolondan geçirilmesinin ardından kolon

uçları septumlarla kapatılarak 20 saat süresince 35°C'de su banyosunda bekletildi. Bu işlemin ardından 30 dakikalık bölümlerde metanol ve N₂ gazı geçirilerek kolonun iç yüzeyi aktif hale getirilmiş oldu. Bu işlemler, hazırlanmış tüm kolonlar için uygulandı.

3.2.1.3. Fonksiyonel Monomer Seçilmesi

Yapmayı planladığımız bu tez kapsamındaki çalışmada hidrofobik amino asitler olarak fenilalanin, tirozin ve triptofanın enantiyomerik formlarının CEC sisteminde birbirinden moleküler baskılanma tekniği ile ayrılması hedeflendi. Bunun için, hidrofobik amino asit olarak seçilen amino asitlerin L- formları baskılanacak kalıp molekül olarak seçilirken, monolitik ve hidrofobik karakterli kolon hazırlanması amacıyla hidrofobik karakterli MAPA monomeri, polimetakrilat bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak tercih edilmiştir.

3.2.1.4. PMAPA Monolitik Kapiler Kolonunun Hazırlanması

Polimerizasyon çözeltisi hazırlamak için çapraz bağlayıcı olarak EDMA ve monomer olarak hidrofobik aminoasit bazlı (fenilalanin) MAPA kullanıldı. Gözenek oluşturunucu çözücü sistemi olarak etil alkol ve metil alkol karışımı (EtOH&MetOH) ile birlikte fosfat tamponu (5mM, pH 7.0) kullanıldı. Polimerizasyona gözenek oluşturunucu, çapraz bağlayıcı, monomer oranı ve zamanın etkisi, bu parametrelerin değiştirilmesiyle hazırlanan polimerizasyon çözeltilerinin CEC sisteminde 750 mBar basınç uygulanarak 38 cm silanize edilmiş kolonun 30 cm lik (işaretleyerek) kısmına yüklenmesiyle üretilen kolonlar ile incelendi. Bu parametrelerin optimize edilmesiyle hazırlanan monolitik kolonlar daha sonra µHPLC pompasına bağlandı ve etanol ile 5 µL/dk akış uygulayarak yıkandı. Hazırlanan monolitik kapiler kolonunun işaretli kısmından ışık geçmesi için çakmak ile yakılarak poliimid tabakası kaldırıldı ve monolitik kolon CEC sisteminde kullanıma hazır hale getirildi. MAPA bazlı amino asit baskılanmış monolitlerin polimerizasyon çözelti içeriklerine ilişkin gözenek oluşturunucu, çapraz bağlayıcı, monomer oranı ve zamanın etkisine ilişkin içerikler sırasıyla Çizelge 3.1. - 3.12.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Amino asit (Trp) (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP1	50/50	113	240	3	2	70	40
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"

Çizelge 3.2. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi .

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40
MIP4	60/40	226	"	"	"	"	"
MIP5	60/40	339	"	"	"	"	"

Çizelge 3.3. Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40
MIP6	"	113	360	"	"	"	"
MIP7	"	113	480	"	"	"	"

Çizelge 3.4.Triptofan baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40
MIP8	"	113	"	"	"	"	30
MIP9	"	113	"	"	"	"	80

Çizelge 3.5. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Amino asit (Phe) (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Time (dk)
MIP1	50/50	113	240	2.43	2	70	40
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"

Çizelge: 3.6. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	2.43	2	70	40
MIP6	"	226	"	"	"	"	"
MIP7	"	339	"	"	"	"	"

Çizelge 3.7. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	2.43	2	70	40
MIP6	"	"	360	"	"	"	"
MIP7	"	"	480	"	"	"	"

Çizelge 3.8. Fenilalanin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40
MIP8	"	"	"	"	"	"	30
MIP9	"	"	"	"	"	"	80

Çizelge 3.9. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Amino asit (Tyr) mg	AIBN (mg)	T° (C)	Time (dk)
MIP1	50/50	113	240	2.66	2	70	40
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"

Çizelge: 3.10. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı oranı etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	2.66	2	70	40
MIP6	"	226	"	"	"	"	"
MIP7	"	339	"	"	"	"	"

Çizelge 3.11. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında monomer etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	113	240	2.66	2	70	40
MIP6	"	"	360	"	"	"	"
MIP7	"	"	480	"	"	"	"

Çizelge 3.12. Tirozin baskılanmış PMAPA monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Süre (dk)
MIP2	60/40	100	240	3	2	70	40
MIP8	“	“	“	“	“	“	30
MIP9	“	“	“	“	“	“	80

3.3. Polimetakrilat Bazlı Monolitlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Monolitik Kolonların Morfolojik Özelliklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi

Hazırlanan monolitik kolonların morfolojik özelliklerini incelemek için monolitlerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri SEM cihazından (Model: Jeol JEM1200 EX, Tokyo, Japonya) elde edilmiştir. Kromatografik performansı incelenmiş kolonların dolgulu uçlarından yaklaşık 2’şer cm kesildikten sonra altın kaplama yapılarak farklı büyüklükte SEM görüntüleri alındı. SEM görüntüleri ile monolit hazırlamada kullanılan değişik oranlarda gözenek yapıcı içeren sistemlerin incelenmesi yapılmıştır.

3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Özellikleri

Yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri için Brunauer-Emmet-Teller (BET) ve civa porozimetre ile monolitlerin gözenek özellikleri incelenmiştir. Civa porozimetri analizleri MAPA bazlı monolitler için yapılmıştır. Bu analizlerin yapılması için yaklaşık 2.5 cm çaplı şırıngalarda makro boyutlu hazırlanan monolit şırınga içerisinden çıkarıldıktan sonra etanol ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutularak toz haline getirilen yapı BET sistemi hücrelerine konmuş ve 80°C de vakum altında 3 saat kurutulmuş ve analiz yapılmıştır.

3.3.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

Fonksiyonel monomer MAPA ve hazırlanan MAPA kompleksinin yapısı Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi-zayıflatılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Örneklerin FTIR-ATR spektrumlarının elde edilmesi için 2.0 mg örnek, 98.0 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta yaklaşık olarak 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanmış olan tabletlerin 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında FTIR-ATR spektrumu alınmıştır.

3.4. Kromatografik Performans Özellikleri

CEC sisteminde alkil benzen türevleri test bileşikler olarak kullanılması ile MAPA bazlı monolitik kolonun kromatografik performans çalışmaları yapılmıştır. Alkil benzen çözeltileri, ACN'nin çözücü olarak kullanılmasıyla fosfat tamponu içerisinde konsantrasyonları 0.5 mg/mL olarak hazırlandı. Ters faz için tiyoüre, alıkonmayan analit olarak kullanıldı. Ayrıca kromatografik performanslarını optimizasyonu için farklı oranlarda ACN:fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.5. Elektrokromatografik Ayırım Koşulları

Elektrokromatografi deneylerinde uzun kapiler (long capillary) modu seçilerek analiz yapıldı. Uzun kapiler moduna göre, anot sistemin inlet kısmında katot ise sistemin outlet kısmında yer almaktadır. Ters akım işlemi olarak bilinen negatif elektrovoltaj uygulaması, elektrotların polaritelerini terse çevirmektedir. Çalışma içeriğinde hareketli faz olarak asetonyitril (ACN) ve fosfat tamponu farklı oranlarda karıştırılarak hazırlandı. 1M NaOH ve 1M HCl çözeltileri, uygun pH'ın ayarlanması amacıyla kullanılmıştır.

3.5.1. Elektrozmozotik Akış (EOF)

EOF, CEC sisteminin temel sürücü gücüdür ve aynı zamanda monolitik kolonun geçirgenliğinin göstergesidir. Bu çalışmalarda EOF aşağıda verilen yöntem ile hesaplanmıştır.

$$\mu_{eof} = \frac{L_e \times L_t}{V \times t_R} \quad (\text{Eşitlik 3.1.})$$

Burada formülde μ_{eof} ; elektrozmozotik hareket, L_e (m); kolonun etkin uzunluğu, L_m (m); kolonun toplam uzunluğu, V ; uygulanan elektrovoltaj (volt) ve t_R ; tiyoüre için alıkonma süresidir.

3.5.2. Alıkonma (Kapasite) Faktörü (k)

Bir kolonda her bir bileşen için kendine ait alıkonma süresi vardır. Bu süre, “ t_R ” ile gösterilir. Alıkonma zamanı, numunenin kolona yüklendiği zaman ile dedektörden çıkması arasında geçen zamandır.

Kolonda, sabit faz olarak kullanılan madde üzerinde hiç tutulmayan bir madde kullanıldığı takdirde, bu maddenin detektörden geçmesine kadarki süre “ t_0 ” ile gösterilir. Alıkonma zamanı (t_R) ile t_0 arasındaki farka ($t_R - t_0 = t'_R$) düzeltilmiş alıkonma zamanı denir. Öte yandan, bağıl alıkonma zamanı hesaplanması konusunda numunenin iki ayrı madde içeriyor olması ve bu bileşiklerin alıkonma zamanları t'_{R1} ve t'_{R2} ise eşitlik (3.2)’deki formül yardımıyla bağıl alıkonma zamanı hesaplanabilir. “ α ” ile gösterilen bağıl alıkonma zamanı ne kadar büyükse, ayrılımların da o kadar iyi gerçekleştiğinin bir işaretidir.

$$\alpha = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}} \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Alıkonma (kapasite) faktörü, monolitik matriks ile hareketli faz içerisinde olan analitin etkileşmesine dayanan bir göstergedir. Ters farz kromatografide monolitik yapının polaritesi alıkonma faktörü ile ifade edilir. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde ise yine monolitik yapının hidrofobitesini gösteren bir parametredir. Alıkonma faktörü genellikle aşağıda verilen formülle hesaplanır;

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Eşitlik (3.3)}$$

Bu formülde t_R ; analitin bir hareketli faz ile tesbit edilen alıkonma süresini, t_0 ; ise bu çalışma kapsamında tiyoüre için elde edilen alıkonma süresidir.

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

Teorik tabaka sayısı ve yüksekliği kolonun verimliliğini ve hızını gösteren önemli kromatografik parametrelerdir. Kolonun verimliliği teorik tabaka sayısı ile doğru orantılı, yani teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksektir. Teorik tabaka yüksekliği ise kolonun çalışma hızı göstergesidir ve N değeri ile ters orantılıdır.

Hazırlanan kolonların N değeri aşağıda verilen formüllere göre belirlendi;

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

$$N = 16 \times (t^2)/(w^2) \quad \text{(Eşitlik 3.5)}$$

Burada, w; bileşik pikinin taban genişliğini ve $w_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir, t; bileşiğin alıkonma süresini gösterir.

Teorik tabaka yüksekliği ise aşağıda verilen Eşitlik 3.6'daki formüle göre hesaplanır,

$$H = L/N \quad (\text{Eşitlik 3.6})$$

Bu eşitlikte, H; teorik tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve N; teorik tabaka sayısıdır. Kolon geçirgenliği hesaplama yöntemi aşağıda verilen Eşitlik 3.7'deki Darcy eşitliğine göre yapıldı [249].

$$K = (F \times \eta \times L)/(\Delta P \times \pi \times r^2) \quad (\text{Eşitlik 3.7})$$

Bu eşitlikte, F; hareketli fazın akış hızı, η ; hareketli fazın viskozitesi, L; kolon uzunluğu, ΔP ; kolonun geri basıncı ve r; kolonun i çapıdır [247].

3.6. Enantiyomerik Ayırımı Etkileyen Parametreler

Enantiyomerik ayırma süreci; uygulanan elektrik akımı, basınç, organik faz etkisi ve enantiyomerik türün tespitini belirlemek amacıyla farklı koşullar altında optimize edilmeye çalışıldı.

3.6.1. Ayırma Elektrik Alanının Etkisinin İncelenmesi

Enantiyomerik ayırma uygulanan elektrik alanının etkisini belirlemek için 100 mbar basınçta sırasıyla 5, 10 ve 15 kV voltaj uygulanmış ve uygulanan elektrik alanı sonucu oluşan akımın ayırma etkisi incelenmiştir.

3.6.2. Ayırma Basınç Etkisinin İncelenmesi

Enantiyometrik ayırma uygulanan basıncın etkisini incelemek üzere 10 kV akımda sırasıyla 0, 100 ve 200 mbar basınç uygulanmıştır. Basınç değişikliklerinin ayırım üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.6.3. Ayırma Organik Fazın Etkisi

Enantiyomerik ayırma organik çözücünün etkisini incelemek üzere %50 ve %60'lık derişimlerde ACN çözeltisi kullanılmış ve çözücünün derişimindeki değişimin enantiyomerik ayırım üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.6.4. Enantiyomerik Türün Tespiti

Enantiyometrik ayırlarda enantiyomer türünün tespit edilmesine yönelik yapılan analizlerde amino asitlerin L- formu kolona verilerek analiz gerçekleştirilmiştir.

3.7. Moleküler Baskılanma Faktörünün Belirlenmesi

Moleküler baskılamaya tabi tutulmuş kolon ve baskılanmamış kolon arasındaki oranlama, baskılanma faktörünü vermektedir (Eşitlik 3.8.). Baskılanma faktörünün belirlenmesi, kolonda tutunma kabiliyetinin bir ölçüsü olarak değerlendirilir.

$$IF = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}} \quad (\text{Eşitlik 3.8.})$$

Eşitlikte verilen "IF" baskılanma faktörünü temsil ederken, k_{MIP} ve k_{NIP} ise sırasıyla, baskılanmış kolon ve baskılanmamış kolonun alıkonma faktörlerini işaret eder. Her iki kolon için alıkonma faktörleri, Eşitlik 3.2.'de verilen formül yardımıyla hesaplanabilmektedir.

3.8. Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)

Kromatografi çalışmalarında tekrarlanabilirlik çok önemlidir. Çalışmalarımızda hazırladığımız kolonların gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik (run to run reproducibility) veya farklı günlerde yapılan analizlerin terarlanabilirliği (day to day reproducibility) gibi verimlilik analizleri yapılmıştır. Ayrıca kromatografik performansları test edilmiş monolitik kolonlar aynı koşullar altında tekrar hazırlanarak, tekrarlanabilirliği tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Aminoasit Baskılanmış P(MAPA) monolitik kolonların hazırlanışı

Bu çalışmada ilk olarak, literatürde ilk olma özelliği taşıyan hidrofobik karaktere sahip amino asitler (tirozin, triptofan ve fenilalanin) ile amino asit bazlı hidrofobik özelliğe sahip N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) monomeri kullanılarak moleküler baskılama yöntemiyle hidrofobik özellikli monolitik kapiler kolonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan kapiler kolonlar, aminoasitlerin enantiyomerik ayırımında kullanılmıştır. Çalışma kapsamında, MAPA monomer oranı, çapraz bağlayıcı, gözenek yapıcı ve polimerizasyon süresindeki değişimlerin monolitik kolonun optimize edilmesinde etkileri incelenmiş ve 9 farklı kolon sistemi hazırlanarak, bu parametrelere bağlı koşullar ile birlikte Çizelge 4.1. - 4.12.'te sunulmuştur. Hazırlanan kolonlarda hidrofobik özellik sağlamak için MAPA, çarpaz bağlayıcı olarak EDMA, uygun gözenek yapıcı sistem oluşturmak için Etanol/Metanol karışımı (EtOH/MeOH) kullanıldı. Hazırlanan kolonlarda çözücü, çapraz bağlayıcı ve monomer oranının yanı sıra polimerizasyon süresinin optimize edilmesiyle birlikte geçirgenlik sağlayarak akışın olduğu amino asit baskılanmış MIP2 (MIP-Phe, MIP-Tyr ve MIP-Trp) kolonları, çalışma kolonu olarak seçildi. MIP8 kolonunda polimerizasyon işlemi tamamlanamadığı için geri basınç oluşmamıştır. MIP9 kolonunda polimerizasyon işlemi tamamlanmış, ancak geri basınç çok yüksek olduğu için kolonun akış hızı istenen seviyede olmadığı gözlenmiştir.

Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.'te sırasıyla; fenilalanin, triptofan ve tirozin baskılı PMAPA kolonlarının akış hızına karşılık geri basınç değerleri verilmiştir. Geri basınç ölçümleri için metanol kolondan farklı akış hızlarında ($\mu\text{L/dak}$) geçirilmiş ve geri basınç değerleri bar olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.1. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μL)	MAPA (μL)	Amino asit (Trp) (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP1	50/50	113	240	3	2	70	40	Hayır
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"	Evet
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"	Hayır
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"	Evet

Çizelge 4.2. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μL)	MAPA (μL)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40	Evet
MIP4	60/40	226	"	"	"	"	"	Hayır
MIP5	60/40	339	"	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.3. Triptofan baskılanmış monolitik kolonda monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μL)	MAPA (μL)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40	Evet
MIP6	"	"	360	"	"	"	"	Hayır
MIP7	"	"	480	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.4. Triptofan baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Trp (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40	Evet
MIP8	"	"	"	"	"	"	30	Evet
MIP9	"	"	"	"	"	"	80	Hayır

Çizelge 4.5. Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Amino asit (Phe) (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP1	50/50	113	240	2.43	2	70	40	Hayır
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"	Evet
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"	Hayır
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"	Evet

Çizelge 4.6. Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	2.43	2	70	40	Evet
MIP4	60/40	226	"	"	"	"	"	Hayır
MIP5	60/40	339	"	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.7. Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	2.43	2	70	40	Evet
MIP6	"	"	360	"	"	"	"	Hayır
MIP7	"	"	480	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.8. Fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Phe (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	2.43	2	70	40	Evet
MIP8	"	"	"	"	"	"	30	Evet
MIP9	"	"	"	"	"	"	80	Hayır

Çizelge 4.9. Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında çözücü oranı değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi.

	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Amino acid (Tyr) (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP1	50/50	113	240		2	70	40	Hayır
MIP2	60/40	"	"	"	"	"	"	Evet
MIP3	80/20	"	"	"	"	"	"	Hayır
NIP	60/40	"	"	-	"	"	"	Evet

Çizelge 4.10. Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında çapraz bağlayıcı miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi

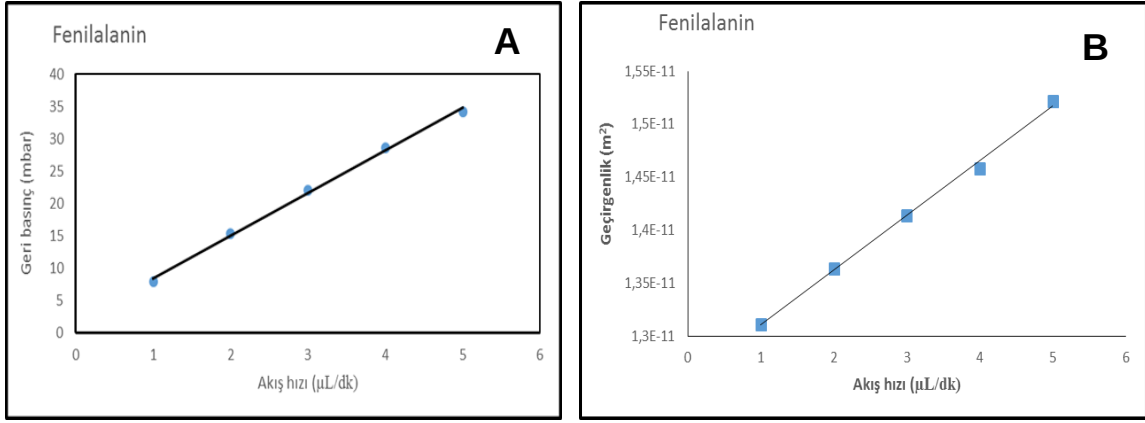
	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40	Evet
MIP4	60/40	226	"	"	"	"	"	Hayır
MIP5	60/40	339	"	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.11. Tirozin baskılanmış monolitik kolonun hazırlanmasında monomer miktarının değişiminin monolitik kolonun hazırlanmasında etkisi

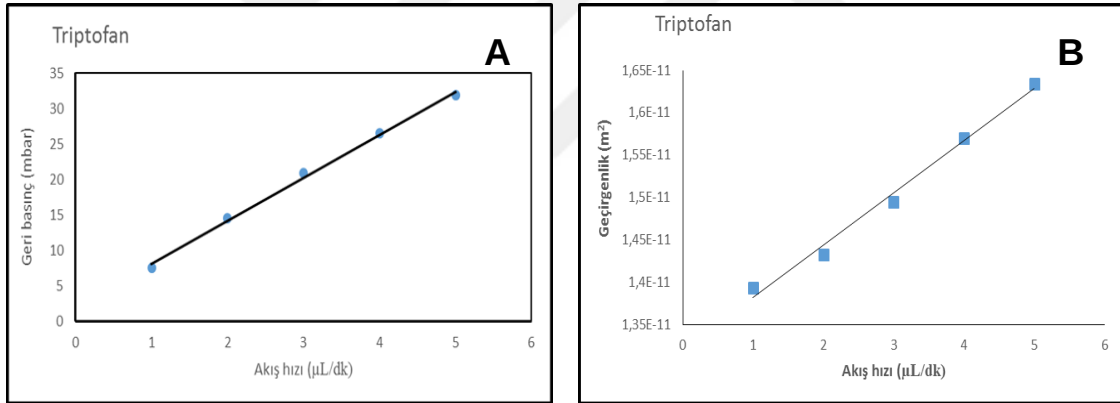
	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	113	240	3	2	70	40	Evet
MIP6	"	"	360	"	"	"	"	Hayır
MIP7	"	"	480	"	"	"	"	Hayır

Çizelge 4.12. Tirozin baskılanmış monolitik kolonda monolitik kolonun hazırlanmasında polimerizasyon süresinin etkisi

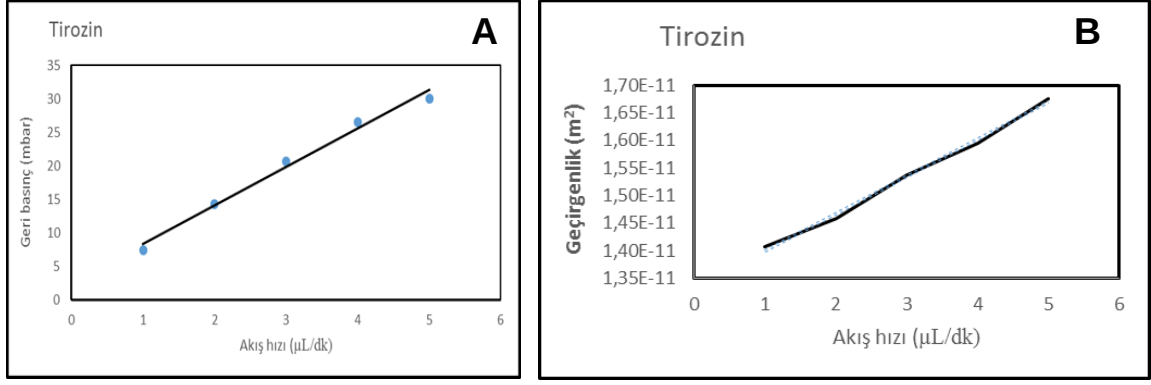
	ETOH/MeOH (V/v)	EDMA (μ L)	MAPA (μ L)	Tyr (mg)	AIBN (mg)	T° (C)	Zaman (dk)	Geçirgenlik
MIP2	60/40	100	240	3	2	70	40	Evet
MIP8	"	"	"	"	"	"	30	Evet,
MIP9	"	"	"	"	"	"	80	Hayır



Şekil 4.1. Fenilalanin baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri.



Şekil 4.2. Triptofan baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri



Şekil 4.3. Tirozin baskılanmış PMAPA bazlı monolitik kolonun karakterizasyonu için a) akış hızına göre geri basınç değerleri b) geçirgenliğe karşılık akış hızı grafikleri

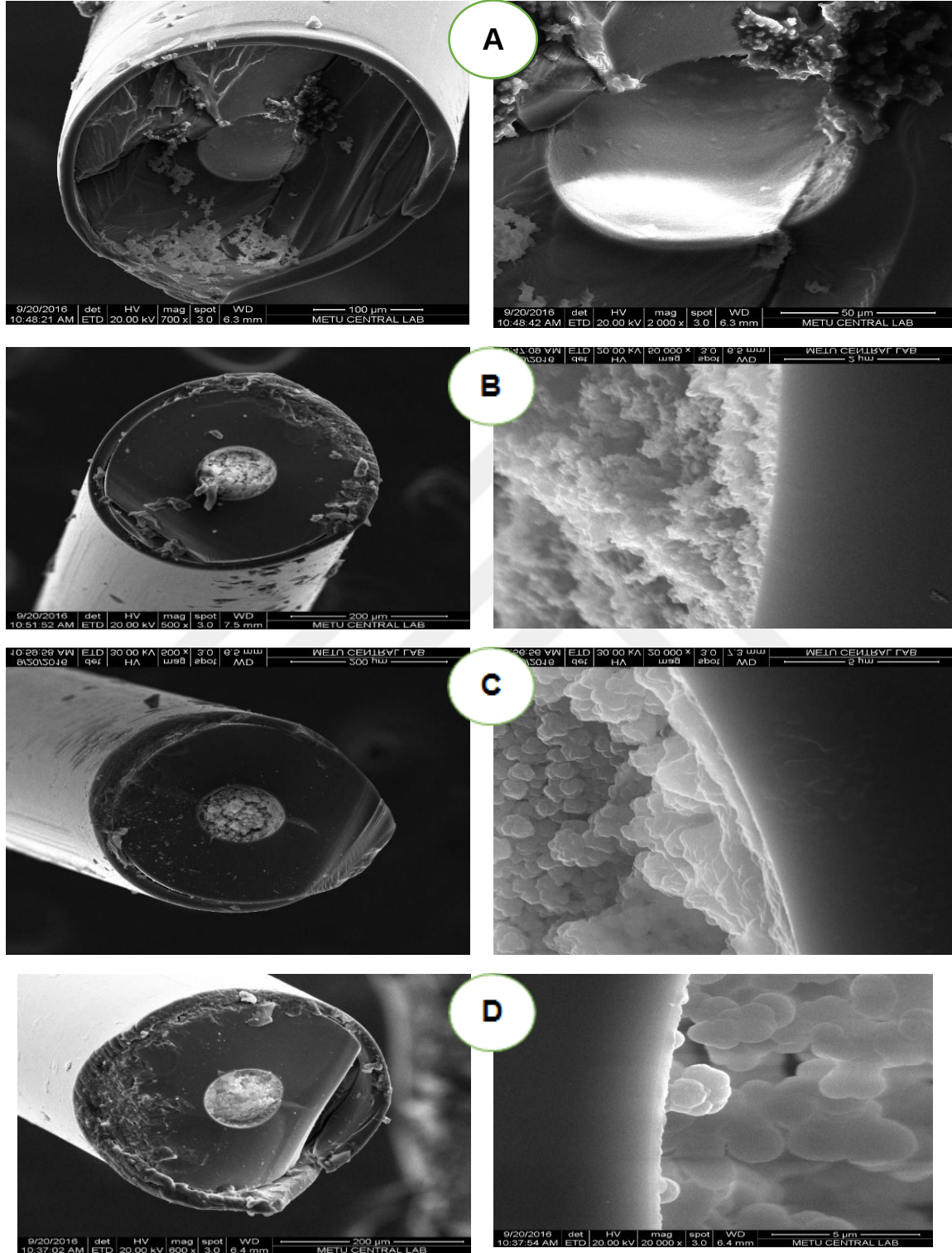
Metanol çözeltisinin akış hızının artırılmasıyla birlikte geri basınç düşmesinde artış gösterdi. Bu sonuç, hazırlanmış monolitik kolonun geçirgenliğinin yanı sıra mekanik açıdan kararlılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Metanolün akış hızı 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ 'ya ulaştığı anda geri basınç değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla 34.16 mbar, 31.61 mbar ve 31.01 mbar olarak ölçülmüştür. Moleküler baskılanmış monolitik kolonların sahip olduğu düşük geri basınç değerleri, moleküler baskılama sonucu kolonda meydana gelen kaviteler üzerinde hareketli fazın akış göstermesine olanak sağlamaktadır. Diğer taraftan, monolitik kolonlar için önemli bir diğer parametre olan geçirgenlik değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla $1.521 \times 10^{-11} \text{ m}^2$, $1.644 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ ve $1.676 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ olarak hesaplanmıştır. Geçirgenlik değerlerine bakılarak, kolonun hidrofobik karakterinin diğer kolonlar ile kıyaslandığında daha yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2. PMAPA Monolitik Kolonun Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1. PMAPA Bazlı Monolitik Kolonun Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Polimerik yapıların kolonların yüzeyi ile sıkı bir şekilde bağlantı oluşturduğu gözlenmiş ve 2 μm 'lık küresel mikroglobüler yapıların iç içe kümeler halinde birleşerek geniş gözenek kanallarıyla birlikte monolitik kolonları oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durum, monolitik kolonların genel karakteristik özellikleriyle

uyumlu yapıdadır. Bunun yanısıra, kolonun moleküler baskılanma sürecinde ise makrogözenekli yapıda çok ciddi boyutta değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. MAPA bazlı monolitik kolonların kenar ve iç kısım SEM görüntüleri. A) boş kolon, B) fenilalanin, C) tirozin ve D) triptofan baskılanmış kolonlar

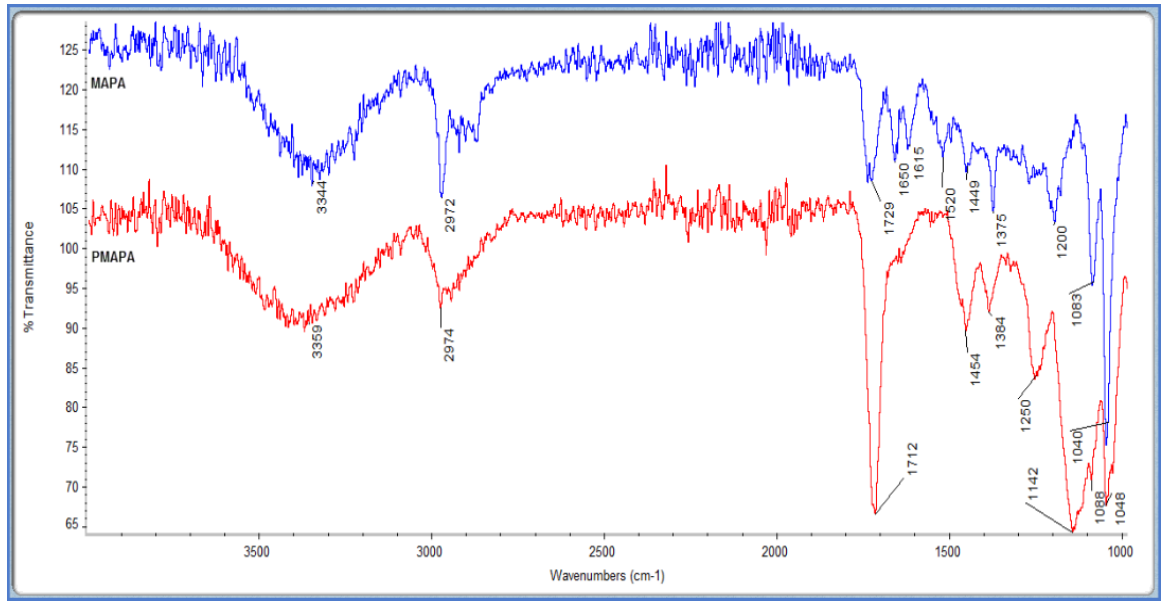
4.2.2. PMAPA Bazlı Monolitik Kolonların Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanmış PMAPA bazlı monolitik kolonların yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri için Brunauer-Emmet-Teller (BET) ve civa porozimetre ile monolitlerin gözenek özellikleri incelendi. Spesifik yüzey alanları moleküler baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kolonlar için sırasıyla; tirozin baskılı, triptofan baskılı, fenilalanin baskılı ve baskılanmamış monolitik kolonlar (MIPTYR, MIPTRP, MIPPHE, NIP) için 9.3, 9.1, 9.0 ve 8.7 m²/g şeklinde bulunmuştur. MIP ve NIP kolonları arasında çok ciddi bir fark bulunmamaktadır.

4.2.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

Monolitik kolonların hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak tercih edilen MAPA ve polimerizasyon sonucu elde edilen PMAPA'nın içerdiği fonksiyonel monomerlerin tayini olarak çekilen FTIR spektrumları Şekil 4.5.'de yer almıştır. MAPA monomerinin monolitik yapıya dahil olması, polimerleşmiş MAPA (PMAPA)'nın FT-IR spektrumunda incelenmiştir (Şekil 4.5.). PMAPA, sırasıyla 1650 cm⁻¹ ve 1520 cm⁻¹ frekansında karakteristik Amit I ve Amit II bantlarına sahiptir. 1076 cm⁻¹'deki pik ise MAPA monomerine ait benzen halkasındaki pike aittir. 1083 cm⁻¹'deki pik, yine MAPA'daki benzen halkasından gelmektedir. 1040 cm⁻¹'deki pik ise -NH grubunun varlığını işaret etmektedir.

Polimerin doğal yapısına ait bilgi edinebilmek adına polimerizasyon derecesi FTIR-ATR spektrumuyla karakterize edilmiştir. Yaklaşık, 1615 cm⁻¹'de gözükten kuvvetli pik, polimerizasyon basamağında açılan vinil grubundaki (C=C) bağına ait piktir. Genel itibarıyla sonuçları değerlendirdiğimizde ise tüm MAPA gruplarının polimerik ağ yapısına başarılı bir şekilde katıldığı ve reaksiyon karışımında esas itibarıyla hiçbir polimerleşmeden kalan monomer bulunmadığı yorumu yapılabilmektedir.



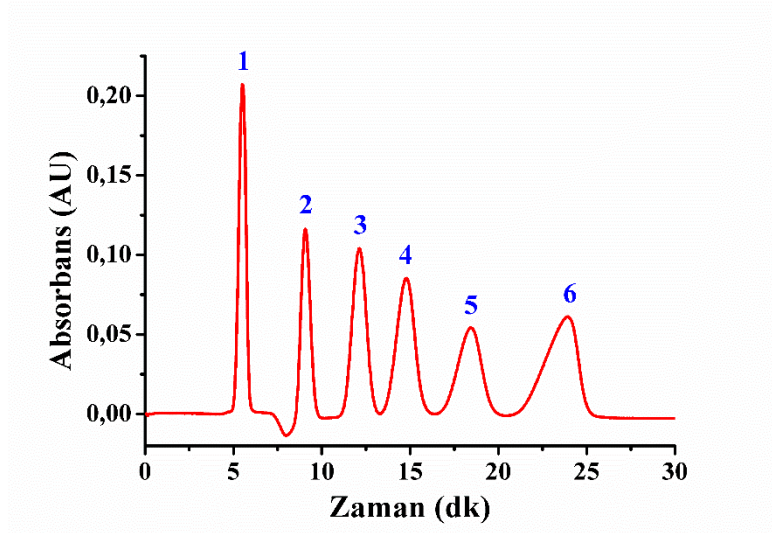
Şekil.4.5. MAPA monomeri ve PMAPA monolitik kolona ait IR Spektrumları

4.3. Kolonların Kromatografik Performans Testi

Monolitik kolonların kromatografik ayırma performansları, hareketli faz olarak ACN/fosfat tamponunun (%60:40; pH 7.0, 10mM) çözücü sistemi olarak seçildiği ortamda uygulama bileşikleri olarak seçilen alkil benzenlerin ayrılmasıyla test edilmiştir. (Şekil 4.6.). Alıkonmayan bileşik olarak ise tiyoüre bileşiği seçildi.

Şekil 4.6.'daki elektrogramdan anlaşılabacağı üzere piklerin elüsyon sıralaması; tiyoüre> *benzen* > *toluen* > *etilbenzen* > *propilbenzen* > *butilbenzen* olarak gerçekleşmiştir. MAPA monomerinin sahip olduğu aromatik halka ile alkil benzen bileşiklerinin hidrofobik etkileşmesine bağlı olarak elüsyon sırası yorumlanmıştır.

Baskılanmış kolonun elektrokromatografik davranışı, farklı elektriksel alan uygulamaları ile test edildi. Ayırımların etkin bir şekilde gerçekleştiği hesaplanan %RSD değerleri ile tespit edilmiştir. (Çizelge 4.13 - 4.17). t_R , ortalama alıkonma zamanını temsil etmektedir. 1'den 6'ya numaralandırılmış bileşikler sırasıyla; tiyoüre, benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen ve butilbenzendir.



Şekil 4.6 Baskılanmamış (NIP) kolonunun elektrokromatografik karakterizasyonu. Uygulanan akım:10 Kv; Hareketli faz, %50:50 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); injeksiyon: 3s; dalgaboyu (λ)= 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; tiyoüre (0.5 mg/mL), alkil benzenler (2 μ L/mL) pik sırası, (1) tiyoüre (2) benzen (3) tolue (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen

Çizelge 4.13. CEC sisteminde optimize edilmiş baskılanmamış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

NIP Kolonu							
t_R (ort), dk (%RSD)							
Seri	Monolitik Kolon	Tiyoüre	Benzen	Toluen	Etilbenzen	Propilbenzen	Bütilbenzen
1	NIP	5.62 (1.41)	9.02 (0.951)	12.15 (1.21)	14.92 (1.13)	18.62 (1.16)	23.92 (0.0952)
2	NIP	5.58 (1.39)	9.07 (0.953)	12.11 (1.19)	14.86 (1.11)	18.64 (1.17)	23.88 (0.0950)
3	NIP	5.70 (1.43)	8.97 (0.949)	12.23 (1.24)	14.98 (1.15)	18.60 (1.14)	23.98 (0.0954)
Ortalama	9	5.63 (1.42)	9.02 (0.951)	12.16 (1.22)	14.92 (1.13)	18.63 (1.17)	23.93 (0.0953)

Çizelge 4.14. CEC sisteminde optimize edilmiş fenilalanin baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Fenilalanin							
t_R (ort), dk (%RSD)							
Seri	Monolitik Kolon	Tiyoüre	Benzen	Toluen	Etilbenzen	Propilbenzen	Bütilbenzen
1	MIP-Phe	5.59 (1.43)	9.57 (1.02)	12.58 (1.21)	15.88 (0.951)	19.95 (1.16)	24.87 (0.952)
2	MIP-Phe	5.58 (1.42)	9.53 (1.01)	12.52 (1.19)	15.86 (0.953)	19.92 (1.17)	24.88 (0.950)
3	MIP-Phe	5.60 (1.41)	9.61 (1.02)	12.62 (1.24)	15.86 (0.950)	19.90 (1.14)	2.86 (0.954)
Ortalama	9	5.59 (1.42)	9.57 (1.02)	12.57 (1.22)	15.87 (0.951)	19.92 (1.17)	24.86 (0.953)

Çizelge 4.15. CEC sisteminde optimize edilmiş triptofan baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Triptofan							
t_R (ort), dk (%RSD)							
Seri	Monolitik Kolon	Tiyoüre	Benzen	Toluen	Etilbenzen	Propilbenzen	Bütilbenzen
1	MIP-Trp	5.60 (1.38)	9.38 (0.958)	12.45 (1.21)	15.26 (1.03)	19.67 (1.41)	24.55 (1.10)
2	MIP-Trp	5.58 (1.36)	9.37 (0.959)	12.40 (1.19)	15.32 (1.01)	19.64 (1.43)	24.58 (1.12)
3	MIP-Trp	5.59 (1.40)	9.39 (0.959)	12.50 (1.24)	15.29 (1.05)	19.60 (1.40)	24.50 (1.12)
Ortalama	9	5.59 (1.39)	9.38 (0.958)	12.45 (1.22)	15.29 (1.04)	19.63 (1.42)	24.54 (1.12)

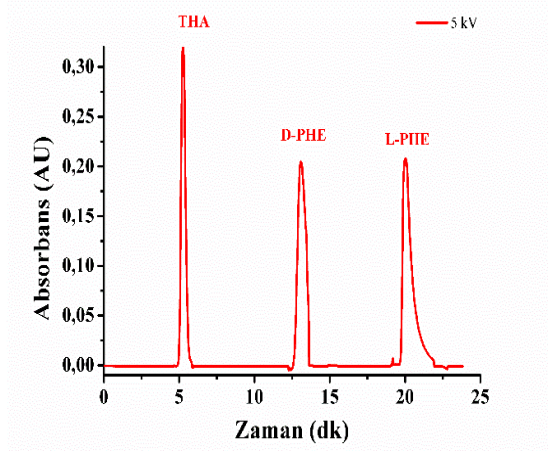
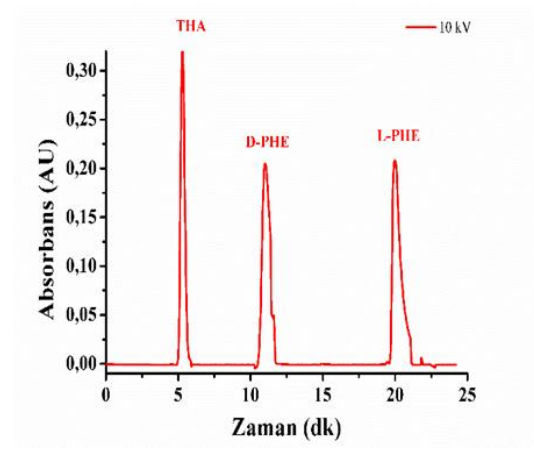
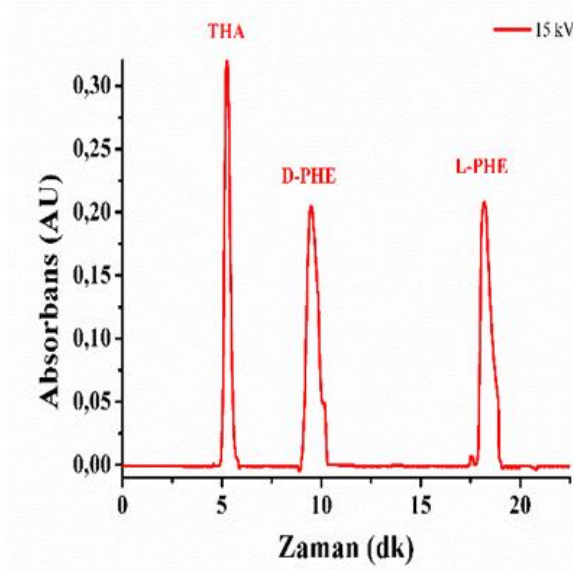
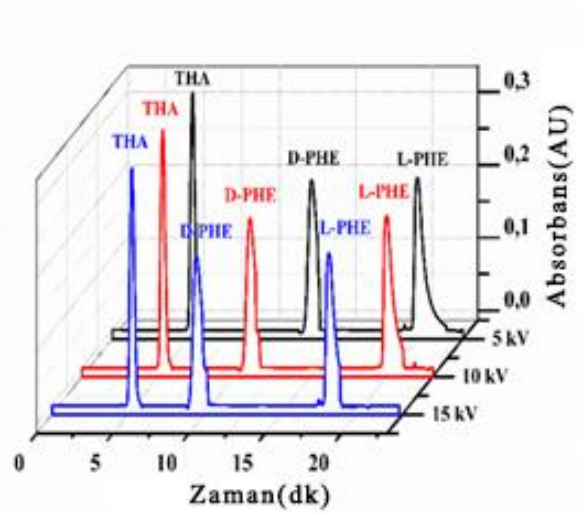
Çizelge 4.16. CEC sisteminde optimize edilmiş tirozin baskılanmış monolitik kolonda alkil benzenlerin alıkonma sürelerinin ve tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Tirozin							
t_R (ort), dk (%RSD)							
Seri	Monolitik Kolon	Tiyoüre	Benzen	Toluen	Etilbenzen	Propilbenzen	Bütilbenzen
1	MIP-Try	5.61 (1.15)	9.18 (1.41)	12.28 (1.21)	15.21 (1.33)	19.55 (1.16)	24.20 (1.01)
2	MIP-Try	5.58 (1.13)	9.23 (1.43)	12.22 (1.19)	15.26 (1.31)	19.60 (1.17)	24.28 (1.03)
3	MIP-Try	5.63 (1.17)	9.14 (1.45)	12.32 (1.24)	15.18 (1.35)	18.51 (1.14)	24.16 (1.05)
Ortalama	9	5.61 (1.16)	9.19 (1.43)	12.28 (1.22)	15.22 (1.33)	19.54 (1.17)	24.22 (1.04)

4.4. Enantiyomerik Ayırımdaki Parametrelerin İncelenmesi

4.4.1. Ayırma Elektrik Alanının Etkisinin İncelenmesi

PMAPA kolon ile hidrofobik etkileşim prensibinden yararlanılarak sırasıyla amino asitler fenilalanin, triptofan ve tirozinin enantiyomerlerinin ayırma elektrik alanı etkisi incelenmiştir. Ayırımlar için farklı şiddetlerde (5, 10, 15 kV) elektrik alanı (voltaj) uygulanmıştır. Artan elektriksel akımın neticesinde ayırımlardaki etkinliğin arttığı tespit edilmiştir.

A**B****C****D**

Şekil 4.7. Fenilalaninin D-, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5 kV b)10 kV c)15 kV d) D,L-fenilalaninin elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırmada incelenmesini farklı akımlar için gösteren elektrogramların çakıştırılmış hali: (dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7).

Çizelge 4.17. Farklı voltajlarda (5 kV, 10 kV, 15 kV) gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayırımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

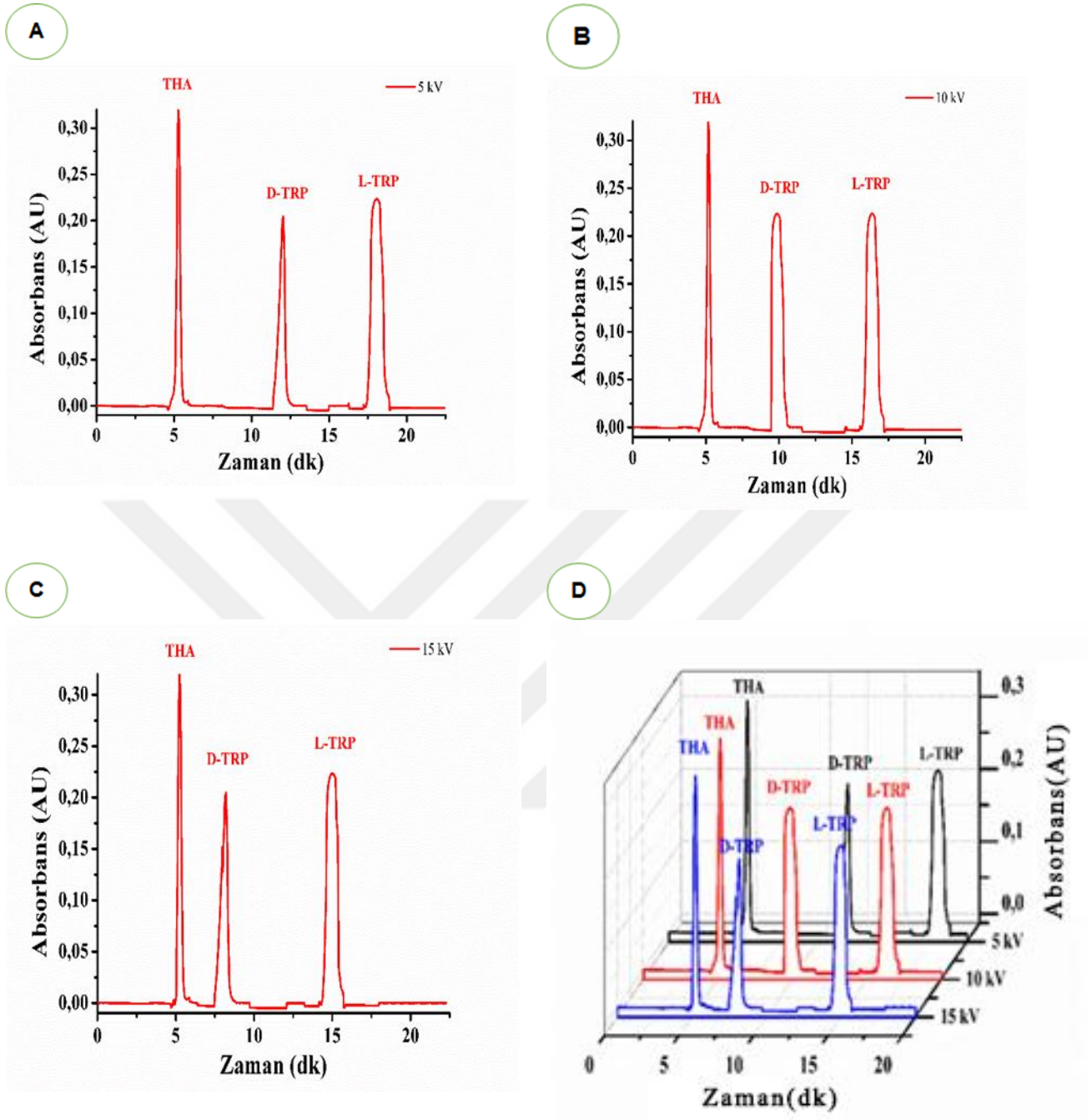
Fenilalanin							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
5	20.04	13.12	4,87	2.78	1.46	1.53	1.90
10	19.50	11.09	7.30	2.68	1.21	1.76	2.44
15	18.34	9.60	7.98	2.47	0.82	1.91	3.06

Fenilalaninin D,L, enantiyomerlerinin ayırımları için elektriksel alan farklı voltajlarda (5, 10, 15 kV) uygulanmıştır. Uygulanan voltajın 5 kV'dan, sırasıyla 10 kV ve 15 kV'a arttırılmasıyla birlikte ayırımlardaki etkinliğinde arttığı saptanmıştır. Çizelge 4.17.'den anlaşılacağı üzere ayırma gücü (R_s) tüm uygulamalarda 1.5'ten büyük olması, yapılan ayırımların etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Uygulanan elektriksel alanının şiddetinin arttırılmasıyla, diğer bir deyişle 5 kV'dan, 15 kV'a geçiş yapıldığında R_s değerlerindeki yükselmenin yanı sıra, seçicilik faktörü (α) değerinin artması iki maddenin birbirinden daha iyi ayrıldığını göstermektedir. Artan voltaj sonrası fenilalanin enantiyomerleri için elüsyon süresinin de kısaldığı dikkat çekmektedir. Bu durum, kapasite faktörü (k)'nın da düşüşünü açıklamaktadır.

Fenilalanin, mevcut hidrofobik karakterli amino asitler içerisinde en hidrofobik olması sebebiyle hidrofobik karakterli amino asit baskılanmış MAPA bazlı kolonda en kuvvetli hidrofobik etkileşimler yapmış, triptofan ve tirozine kıyasla elüsyon süresi daha uzamış ve kolondan sürüklenerek çıktığı için de piklerinde göreceli olarak yayvanlaşmalar olduğu gözlenmiştir.

Elektroozmotik akışın (EOF) artışı, elektroozmotik akış ile elektroforetik akışın anottan katoda doğru olduğu normal kapiler elektrokromatografide analiz süresini kısaltmaktadır. Elektroozmotik akış ise Eşitlik 3.1.'e göre artan akım şiddeti ile

azalmaktadır. Elektroozmotik akış azalınca analiz süresinin artması beklenmektedir. Ancak, pH 7.0 de negatif yüke sahip fenilalanin, elektroozmotik akış ile ters yönde hareket ettiği için analiz süresi uzamamış, kısalmıştır. 15 kV da en uzun elüsyon süresi fenilalanin için görülmüş, burada hidrofobik etkileşimlerin de katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.



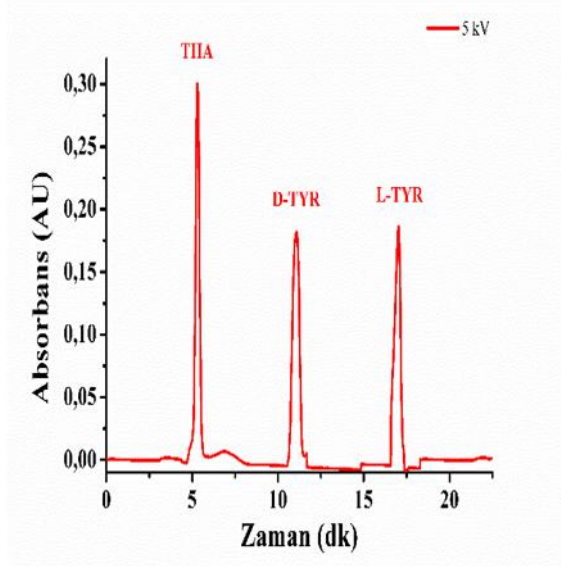
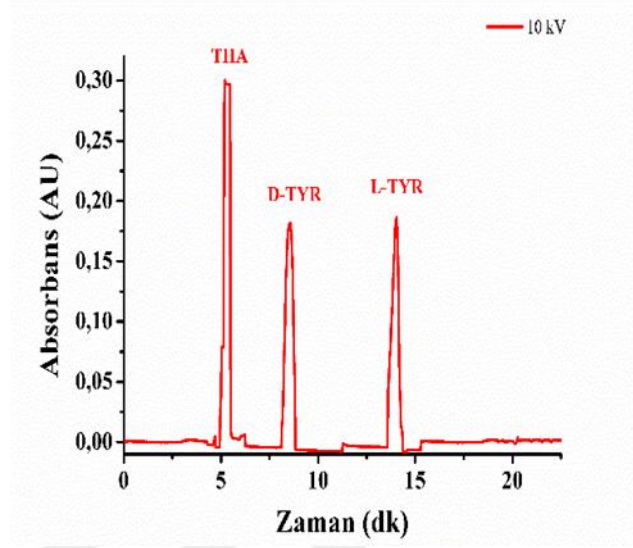
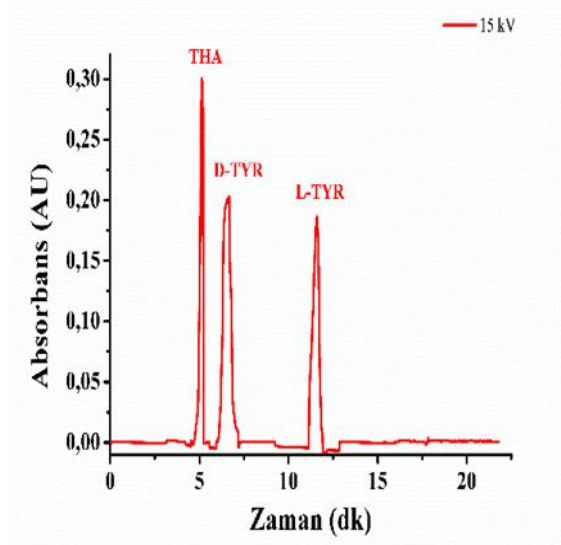
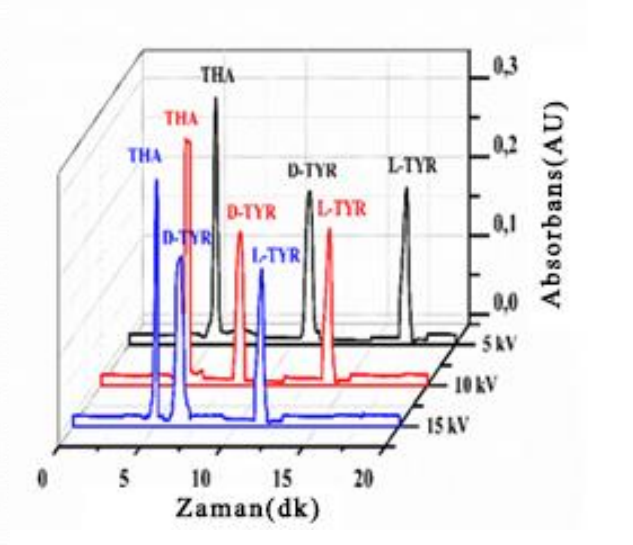
Şekil 4.8. Triptofanın D-, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5kV b)10kV c)15kV d) D,L Triptofanın elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırmada incelenmesini farklı akımlar için gösteren elektrogramların çakıştırılmış hali. (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7)).

Çizelge 4.18. Farklı voltajlarda (5kV, 10kV, 15kV) gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Tryptofan							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
5 kV	18.14	12.02	5.18	2.44	1.27	1.51	1.91
10 kV	16.46	9.94	5.53	2.15	0.90	1.65	2.38
15 kV	15.00	8.11	5,70	1.91	0.57	1.85	3.33

Tryptofanın D-,L, enantiyomerlerinin ayrımı üzerinde elektriksel alan uygulamalarını incelediğimizde 5,10 ve 15 kV'luk voltajlar uygulandığında, uygulanan voltajın artırılmasıyla birlikte R_s değerlerinde sırasıyla artış görülmüştür. Bu durum, ayrımın etkili gerçekleştiğini gösterir. Sayısal olarak değerlendirdiğimizde ise R_s değerlerinin uygulanan her voltaj için 1.5'ten büyük olması ve büyüyen α değerleri de ayrımın etkinliğinin yüksek olduğunu kanıtlamaktadır.

Uygulanan elektriksel alanın artırılmasıyla birlikte elektroozmotik akışın azalması ve böylece analiz süresinin uzaması beklenmektedir. Ancak, pH 7.0 de elektroozmotik akış ile negatif yüke sahip triptofan ile elektroforetik hareketlenmesinin ters yönlü olduğu için analiz süresi kısalmıştır. Triptofan ve tirozinin izoelektrik noktaları kıyaslandığında (pI : 5.88, pI : 5.65) tirozinin daha negatif yüklü olduğu görülür. Ancak triptofan daha hidrofobik olduğundan daha geç elue edilmiştir. 15 kV daki daha uzun elüsyon burada hidrofobik etkileşimlerin de katkıda bulunduğunu ve baskın olduğunu göstermektedir.

A**B****C****D**

Şekil 4.9. Tirozinin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisi: A) 5kV b)10kV c)15kV d) D,L-tirozinin elektriksel alan etkisinin enantiyomerik ayırımda incelenmesini farklı akım oranları için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali. (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; basınç: 0 mbar; (%50 ACN & %50 pH 7).

Çizelge 4.19. Farklı elektriksel akımlarda gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayırımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Tirozin							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	$\alpha_{(t_L-t_D/t_D-t_0)}$
5 kV	16.91	11.01	7.00	2.27	1.13	1.54	2.00
10 kV	13.98	8.53	8.43	1.62	0.60	1.64	2.70
15 kV	11.57	6.66	8.53	1.22	0.27	1.74	4.52

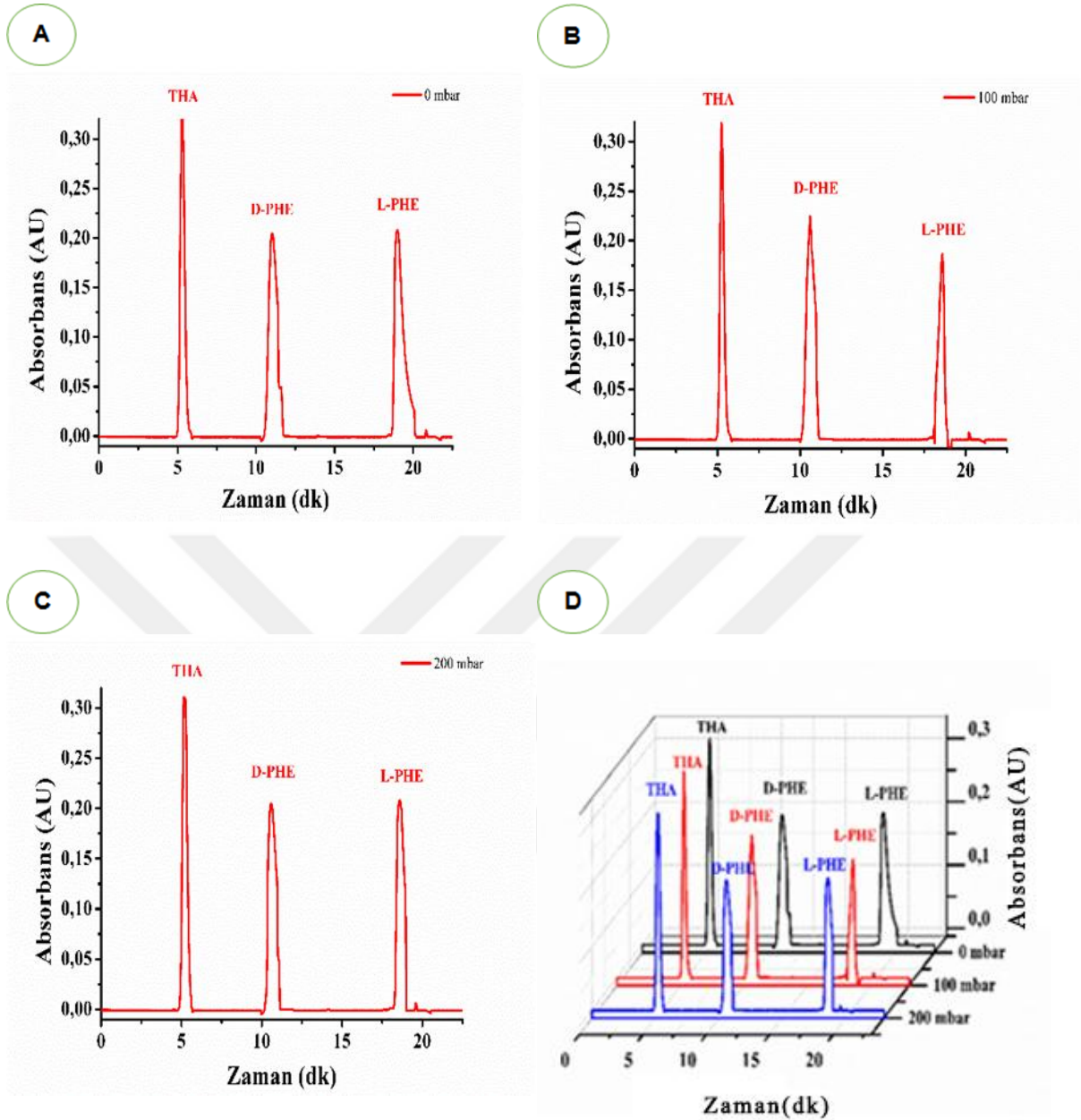
Tirozinin D,L enantiyomerlerinin elektriksel alan etkisinde ayırımlarının incelenmesi üzerine sırasıyla 5, 10 ve 15 kV'luk akımlar uygulandığında ayırımlardaki etkinliğin arttığı gözlenmiştir. Çizelge 4.18.'deki R_s değerleri için 5kV, 10kV ve 15kV'lık uygulamalar sonrası elde edilen sonuçların kıyaslaması yapıldığında ayırımlardaki etkinliğin, uygulanan voltajın yükseltilmesiyle artmakta olduğu gözükmemektedir. Fenilalanin ve triptofan ile kıyaslandığında molekül içerisinde sahip olduğu –OH grubu sebebiyle hidrofobisitesi daha düşük olan tirozinin elüsyon süresi de daha kısadır. Uygulanan elektriksel alanın şiddetinin artırılmasıyla elüsyon süresinin kısalması devam etmekte olup, uygulanan voltajın yükseltilmesi sonrası k değerlerindeki düşüşte bu yargıyı desteklemektedir. Artan voltaj sonrası ayırma gücü değerlerindeki artış ise birlikte seçicilik değerlerinde yükselmesi, ayırımın etkinliğinin, uygulanan elektriksel alanın yükseltilmesi ile artış gösterdiğini desteklemektedir.

4.4.2. Enantiyomerik Ayırma Basınç Etkisinin İncelenmesi

Üç farklı aminoasit enantiyomerlerinin fenilalanin, triptofan ve tirozinin enantiyomerik olarak ayırımında basıncın etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda sisteme basınç uygulanmadan sadece elektriksel alan uygulanmasıyla yapılan ayırımların yanı sıra, sırasıyla 100 ve 200 mbar basınç

uygulanarak basınç uygulanmasının artından ayırımlardaki etkinliğin nasıl değiştiği incelenmiştir. Kolon sistemine basınç uygulanmadan sadece elektrik alan uygulanmasıyla D,L enantiyomerlerinde ayırım görülmüş, ayırımın etkinliğini incelemek için sisteme 100 ve 200 mbar basınç da uygulanmıştır. Enantiyomerik ayırımlara basıncın etkisi, aşağıda yer alan elektrogramlarda şekil 4.10. - 4.12.' de görülmektedir.



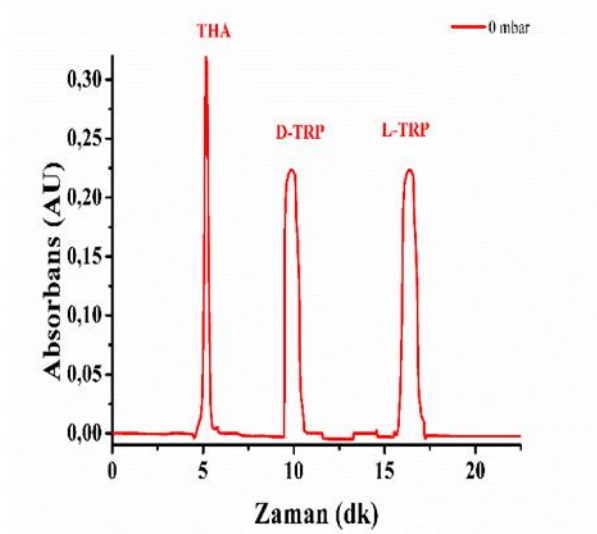
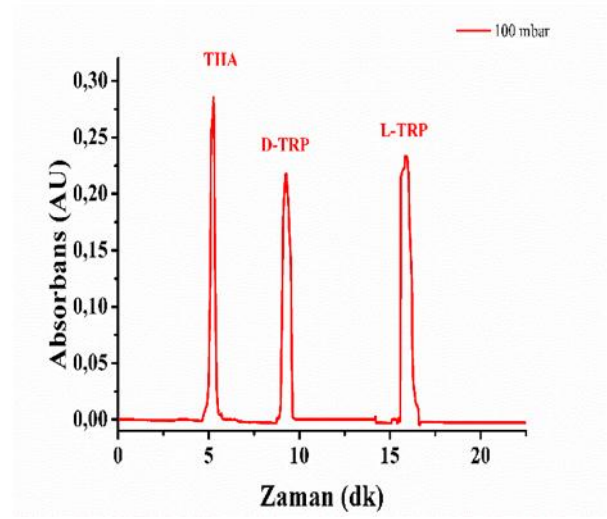
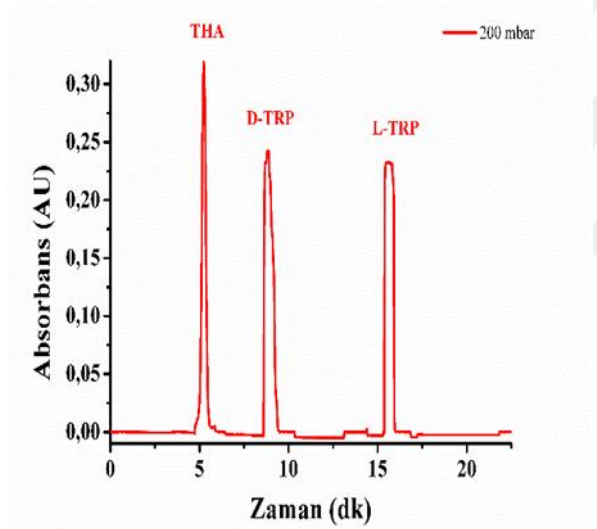
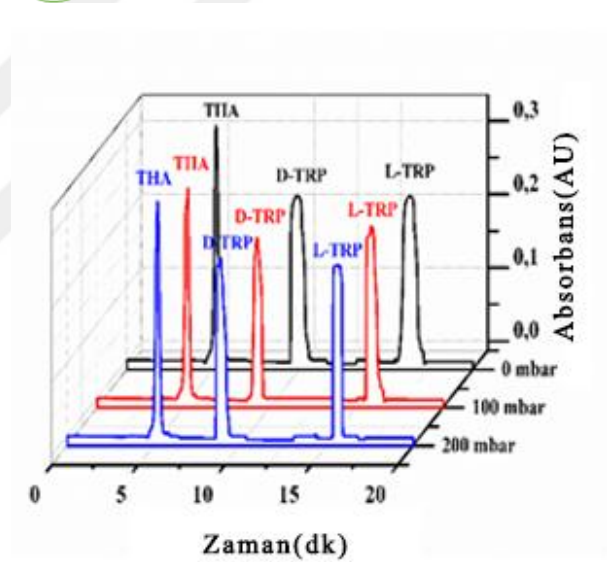


Şekil 4.10. Fenilalaninin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: a) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar; d) D,L-fenilalaninin enantiyomerik ayırımı incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7)).

Çizelge 4.20. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Fenilalanin							
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(tL/tD)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
0 mbar	18.93	10.84	6.26	2.58	1.05	1.75	2.46
100 mbar	18.55	10.73	9.86	2.52	1.03	1.72	2.43
200 mbar	18.42	10.71	11.80	2.50	1.01	1.71	2.41

Kolon sistemine basınç uygulanmadan sadece elektrik alan uygulanmasıyla D,L enantiyomerlerinde etkin ayırım görülmüş, ayırımın etkinliğine basıncın etkisini incelemek amacıyla sisteme 100 ve 200 mbar basınç uygulanmıştır. Ayırma gücü (R_s) değerleri, basınç uygulamadan önce ve basıncın artırılmasıyla birlikte oldukça yüksektir. Ancak, seçicilik faktörü değerlerinde düşüş meydana gelmiştir. Basıncın artırılmasıyla birlikte kolondaki etkileşimlerin azalması sonrası ayrımların etkinliğinde bu sebeple azalma meydana gelmiştir. Buna bağlı olarak 200 mbar a çıkmasıyla ise enantiyomerik formların alıkonmaları süreleri azalmıştır. En hidrofobik etkileşime ve en çok (-) yüke sahip fenilalanin, diğer amino asitler triptofan ve tirozine göre elüsyon süresi yine en uzun olan amino asit enantiyomer çifti olarak dikkat çekmektedir.

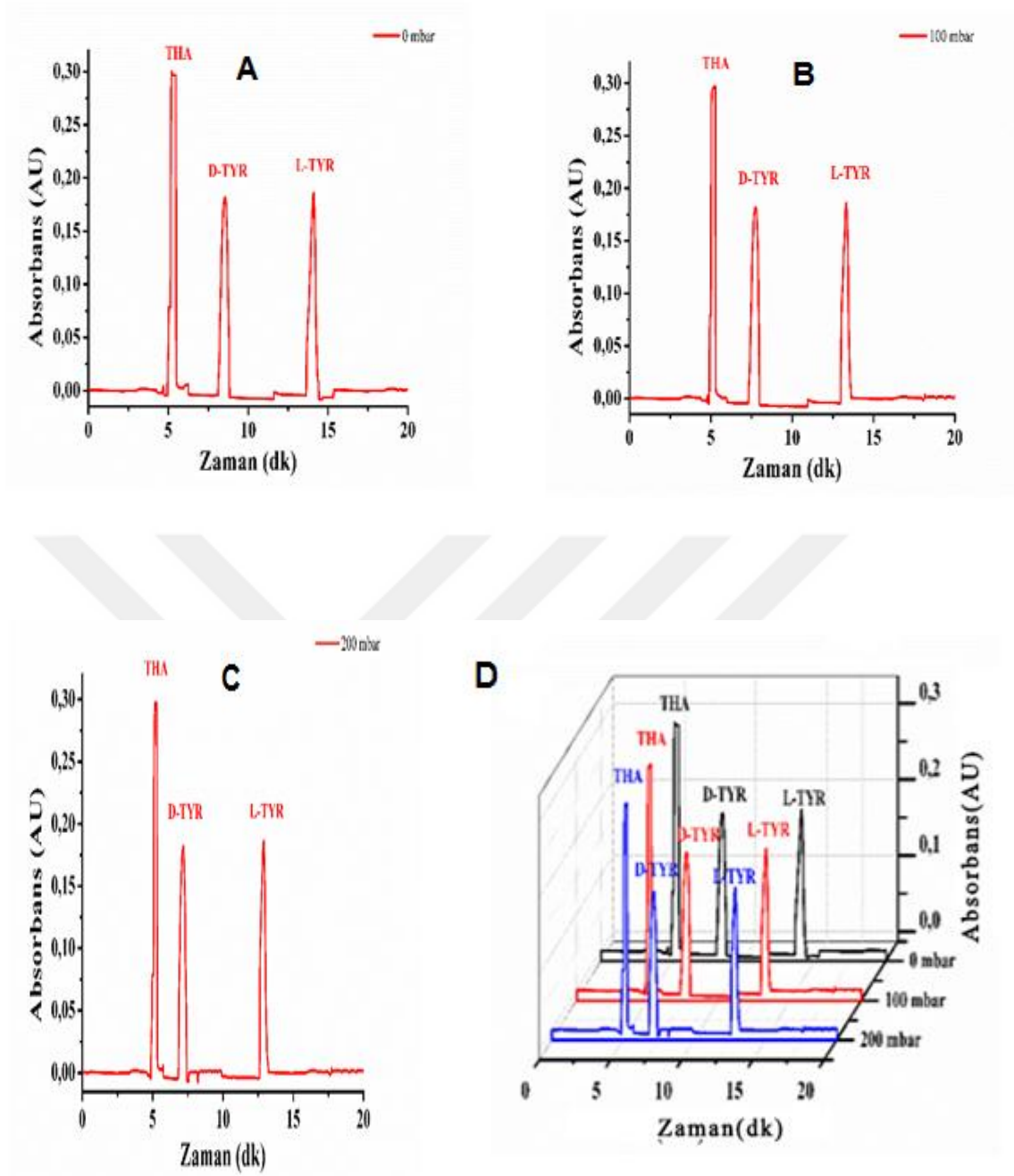
A**B****C****D**

Şekil 4.11. Triptofanın D,L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: A) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar d) D,L- Triptofanın basınç etkisinin enantiyomerik ayırımıda incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların çakıştırılmış hali. D,L-triptofanın basınç etkisinin enantiyomerik ayırımıda incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların çakıştırılmış hali. (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7)).

Çizelge 4.21. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayırımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Triptofan							
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
0 mbar	16.34	9.77	5.44	2.16	0.89	1.67	2.48
100 mbar	16.12	9.26	9.05	2.12	0.79	1.74	2.73
200 mbar	15.73	8.95	11.50	2.01	0.72	1.76	2.84

Triptofanın D,L, enantiyomerlerinin CEC sisteminde ayırımında uygulanan basıncın, ayırımlardaki etkinlik üzerine değişimi incelenmiştir. İlk olarak basınç uygulanmadan, yalnızca elektrik akım uygulanarak yapılan ayırma işleminin ardından basıncın 100 mbar ve 200 mbar değerlerine yükseltilmesiyle ayırma gücü ve seçicilik faktörleri değerleride artmasıyla birlikte ayırımlardaki etkinlikde artmıştır. Basıncın giderek arttırılmasıyla birlikte elüsyon sürelerinde düşme meydana gelirken, buna bağlı olarak kapasite faktörlerindeki düşüş bu sonucu desteklemektedir.



Şekil 4.12. Tirozinin D, L, enantiyomerlerinin ayırımına basıncın etkisi: A) 0 mbar b) 100 mbar c) 200 mbar d) D,L-tirozinin enantiyomerik ayırımını incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; (%50 ACN & %50 pH 7).

Çizelge 4.22. Farklı basınçlarda gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

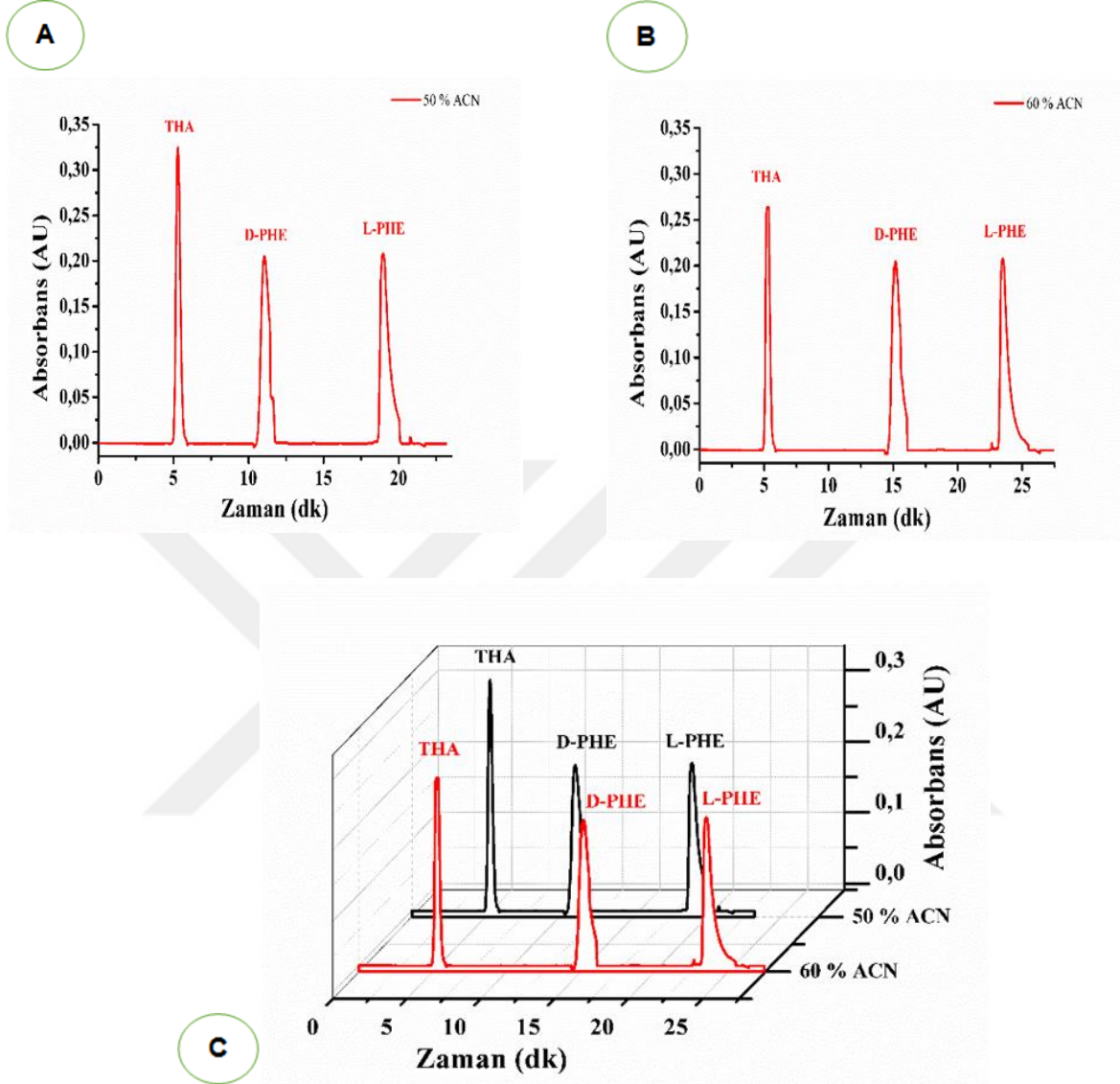
Tirozin							
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(tL/tD)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
0 mbar	14.00	8.50	8.46	1.62	0.59	1.65	2.75
100 mbar	13.30	7.75	9.65	1.58	0.51	1.72	3.09
200 mbar	12.90	7.10	11.60	1.48	0.36	1.82	4.11

Tirozinin D ve L, enantiyomerlerinin ayırımında artan basınç değerlerine karşılık, ayrımların performansının nasıl değiştiği incelenirken, ilk olarak yine basınç uygulanmadan numune kolona verilmiştir. Sonrasında ise 100 ve 200 mbar basınç uygulanarak ayırımın etkinliği gözlenmiştir. Hiç basınç uygulanmadan yapılan ayırım sonrasında 100 mbar ve 200 mbar'lık basınç uygulamaları sonrası artan R_s değerleri, tirozinin D ve L, enantiyomerlerinin CEC sistemindeki ayrımlarında uygulanan basıncın artırılmasıyla ayrımlardaki etkinliğinde arttığı gözlemlenmiştir. Seçicilik faktörü (α ve α') artış göstermiş ve ayrımların etkinliği vurgulanmıştır. Buna karşılık elüsyon süresinde azalma ile birlikte kapasite faktöründe (k ve k') düşüş gözlenmiştir. Fenilalanin ve triptofandan daha az hidrofobik karakterdeki tirozinin elüsyon süresi yine en kısa olarak gerçekleşmiştir.

4.4.3. Enantiyomerik Ayırma Organik Çözücü Etkisi

Aminoasitlerin enantiyomerik ayrılması üzerindeki organik çözücü içeriğinin etkisi, farklı yüzdelerde ACN ve pH 7.0'de seçici olarak araştırılmıştır. Ayırma kapasitesi seviyesi, EOF'ye bağlıdır ve hareketli faz içeriğindeki organik çözücü derişimi EOF'nin büyüklüğünü etkilemektedir. Bu nedenle, hareketli faz içerisindeki organik çözücü derişimi etkisi, enantiyomerik ayrımlar üzerindeki etkinliği incelenmiştir. ACN derişiminin artması ile birlikte, EOF'nin büyüklüğünü azaltmıştır. Hidrofobik

etkileşimler azalmış olmasına karşılık, EOF'nin azalması sonrası elüsyon süreleri artmıştır.

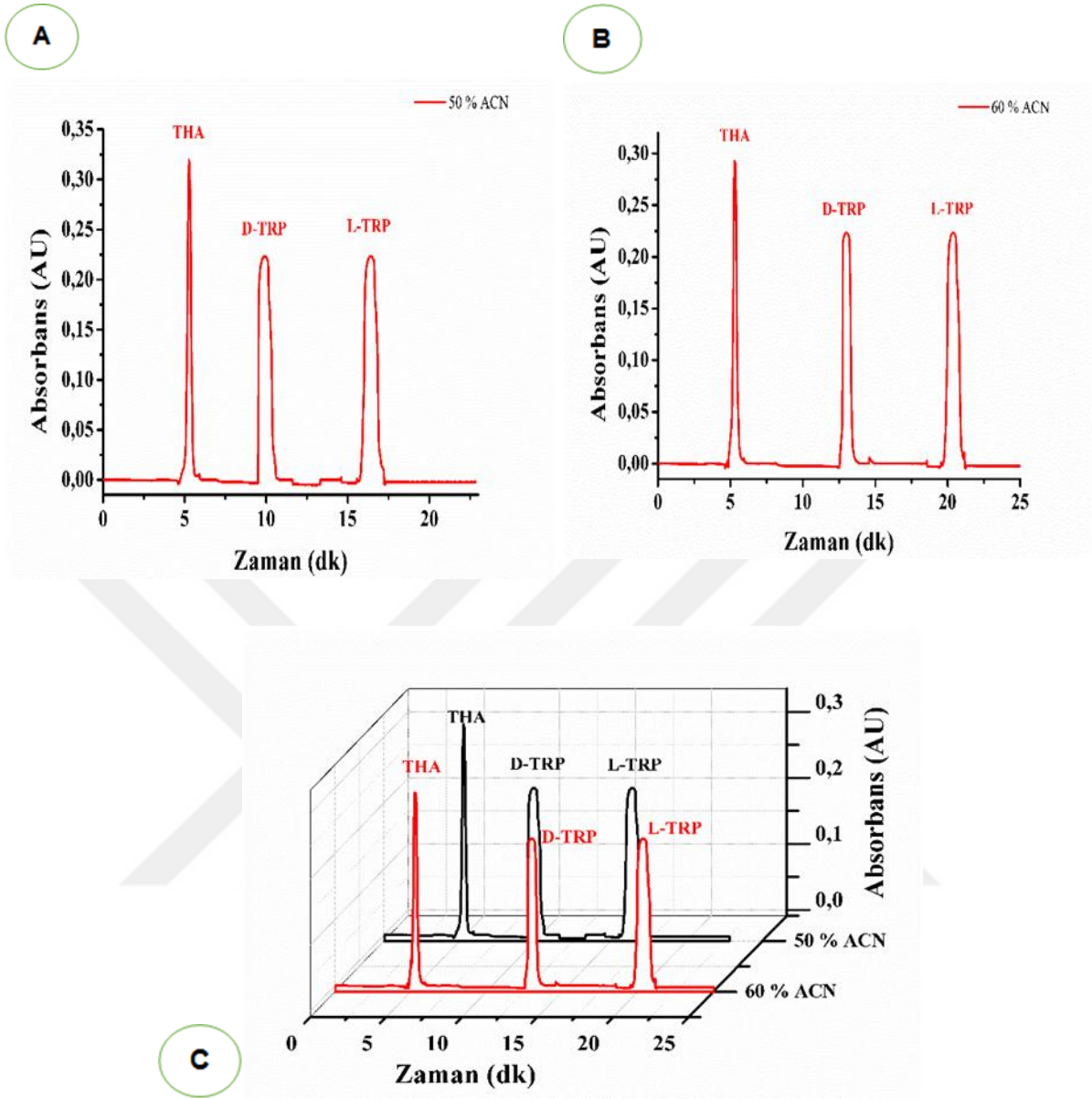


Şekil 4.13. Fenilalaninin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - % pH 7.0) c) D,L-tirozinin organik faz etkisinin enantiyomerik ayırmada incelenmesini gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar).

Çizelge 4.23. Farklı ACN derişimlerinde gerçekleştirilmiş olan fenilalaninin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Fenilalanin							
Organik Çözücü	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	α ($T_L - T_0 / T_D - T_0$)
%50 ACN	19.11	11.17	6.14	2.53	1.06	1.71	2.38
%60 ACN	23.42	15.26	4.58	3.34	1.83	1.53	1.83

Fenilalaninin enantiyomerik formları olarak D,L, amino asitlerinin ayırımında organik çözücü etkisi kapsamında hareketli fazı oluşturan çözücü sistemlerinden pH 7 tampon çözeltisinin yanında bir diğer bileşen olarak ACN derişiminin değiştirilmesiyle elde edilen elektrogramlar incelenmiştir. Hareketli faz içerisindeki organik çözücü olan ACN derişiminin %50 orandan %60'a çıkarılmasıyla EOF'de azalma meydana gelmektedir. Bu durum, kapasite faktöründeki artışla desteklendiği gibi bu kez ayırım gücü düşmüş ve seçicilik faktörü de azalmıştır. Hidrofobik etkileşimlerin en güçlü olarak içinde bulunan fenilalaninin kolonda tutunma süresinin uzamasının olası sebebi EOF'nin azalmasıyla birlikte moleküller kolondan sürüklenerek ayrılması ve sonucunda piklerde de böylece yayvanlaşmalar gözlenmiştir.

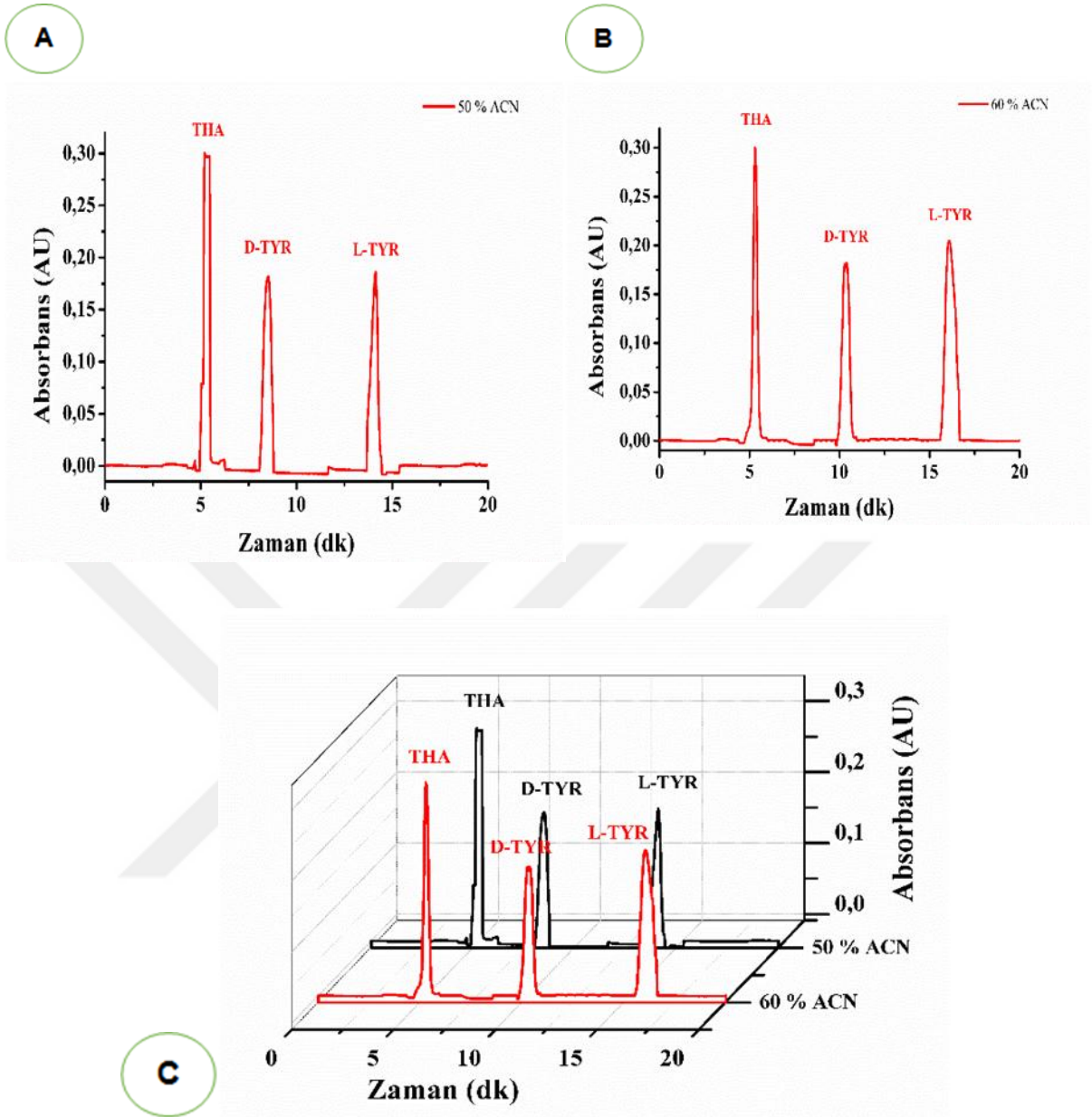


Şekil 4.14. Triptofanın D, L, enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - & %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - %40 pH 7.0) C) D,L-triptofanın organik faz etkisinin enantiyomerik ayırmada incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların çakıştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar).

Çizelge 4.24. Farklı ACN derişiminde gerçekleştirilmiş olan triptofanın enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

Tryptofan							
Organik Çözücü	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	α (T_L-T_0/T_D-T_0)
%50 ACN	16.37	9.88	5.65	2.06	0.85	1.65	2.42
%60 ACN	20.37	13.00	5.72	2.83	1.44	1.57	1.96

Tryptofanın enantiyomerik formları olarak D,L, türlerinin enantiyomerik ayrımlarında ACN derişiminin değıştirilmesiyle gözlemlenen organik faz etkisi neticesinde, ACN'nin yüzde miktarının arttırılmasıyla meydana gelen EOF'nin azalması sonrası karışım kolonda daha fazla alıkonmaya uğrayarak elüsyon süresi uzamış, ayırma gücü değerleri incelendiğinde ise artış gözlenmiştir. Buna karşılık, hidrofobik etkileşimlerin kuvvetinin azalması sebebiyle kolonda ayrımların seçiciliğini azaltmıştır.



Şekil 4.15. Tirozinin D-, L- enantiyomerlerinin ayırımına organik fazın etkisi etkisi: a) (%50 ACN - %50 pH 7.0) b) (%60 ACN - %40 pH 7.0) C) D,L-tirozinin organik faz etkisinin enantiyomerik ayırmada incelenmesini farklı basınçlar için gösteren elektrogramların karşılaştırılmış hali: (dalga boyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV; basınç: 0 mbar).

Çizelge 4.25. Farklı ACN derişiminde gerçekleştirilmiş olan tirozinin enantiyomerik ayrımlarına ait t_D , t_L , R_s , k ve α değerleri

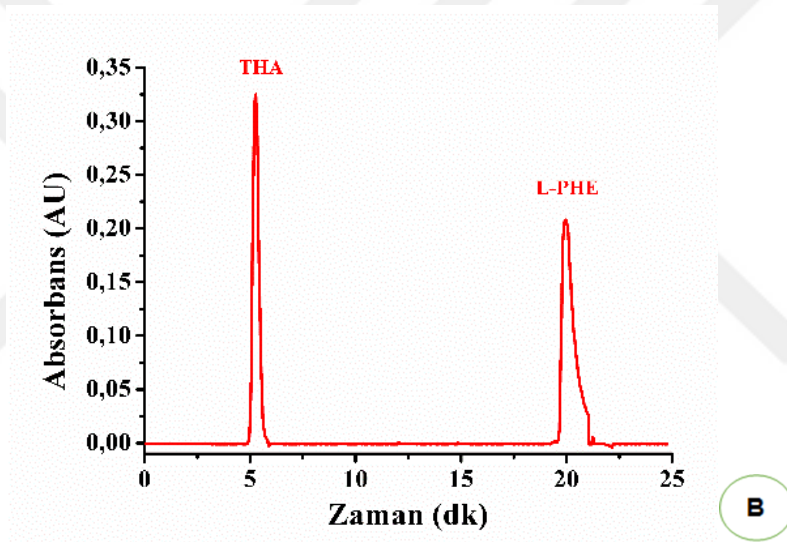
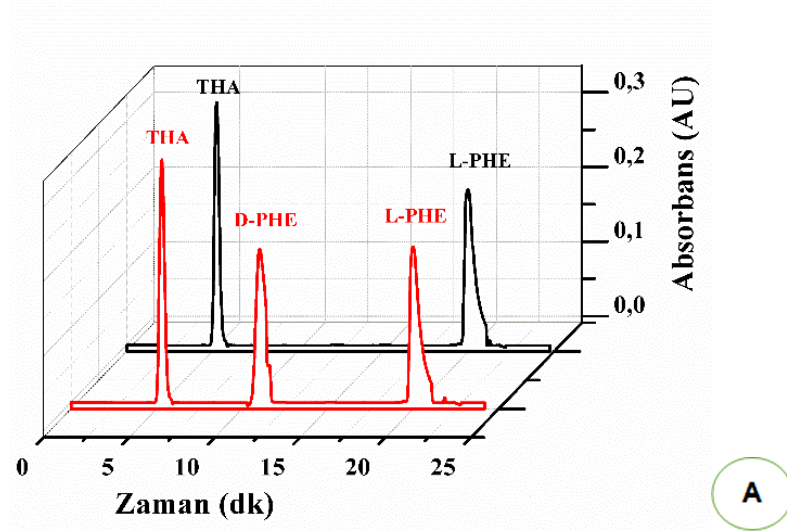
Tirozin							
Organik Çözücü	t_L (dk)	t_D (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{(t_L/t_D)}$	$\alpha_{(T_L-T_0/T_D-T_0)}$
%50 ACN	14.05	8.50	8.54	1.65	0.60	1.65	2.75
%60 ACN	16.10	10.40	6.33	1.97	0.92	1.55	2.14

Tirozinin enantiyomerik formlarının ayırımında ACN derişiminin artırılmasıyla birlikte türlerin kolonda alıkonma süreleri de artmıştır. Kapasite faktörü, kolondaki alıkonma süresinin artmasıyla doğru orantılı şekilde artarken, kolondaki ayırma gücü düşmüştür. EOF'nin yavaşlaması ile birlikte kolonun ayırma gücünün düşmesi, benzer şekilde seçicilik faktöründe de azalmayı beraberinde getirmiştir. Fenilalanin ve triptofana göre daha az hidrofobik karakterdeki tirozinin elüsyon süresi de uzamış olmasına karşılık, diğer iki enantiyomerik türlerin değerlerine göre daha az etkilenmiştir.

4.4.4. Enantiyomerik Türün Tespiti

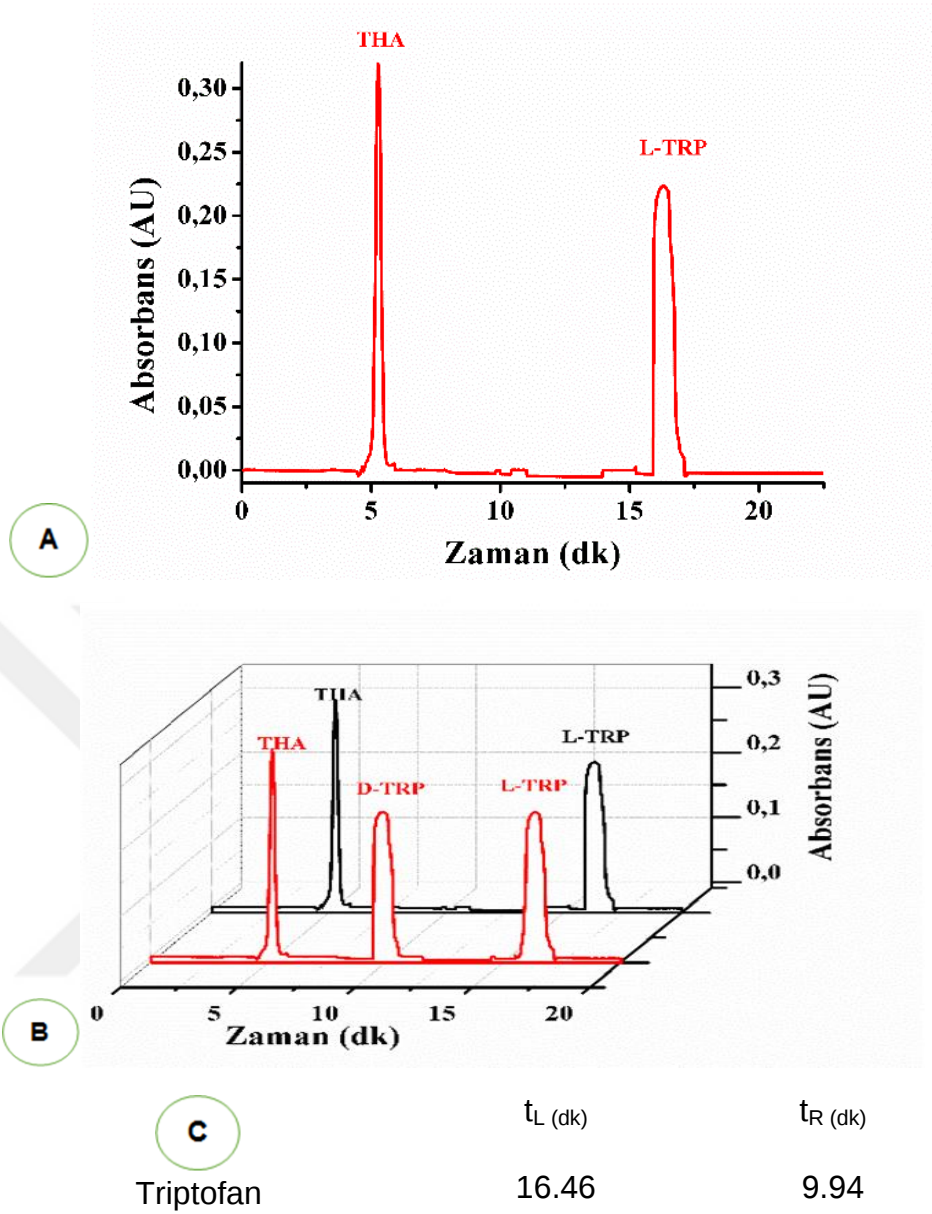
Baskılamanın etkinliğini tespit edebilmek için üç farklı amino asite ait olan enantiyomerik formların yalnızca L- formları örnek olarak kolona verilmiştir ve elüe edilen pikin hangi enantiyomere ait olduğu tespit edilmiştir.

Elektrokromatogramlara bakıldığında, geç elüe edilen enantiyomerik formun amino asitlerin L-formu olduğu gözlenmiştir. Bunu doğrulamak için D- ve L- enantiyomerik formları kolona birlikte de verilmiştir. Fenilalanin, triptofan ve tirozin için elektrogramlar ve sonuçlar sırasıyla Şekil 4.16, 4.17. ve 4.18.'de birlikte gösterilmiştir.

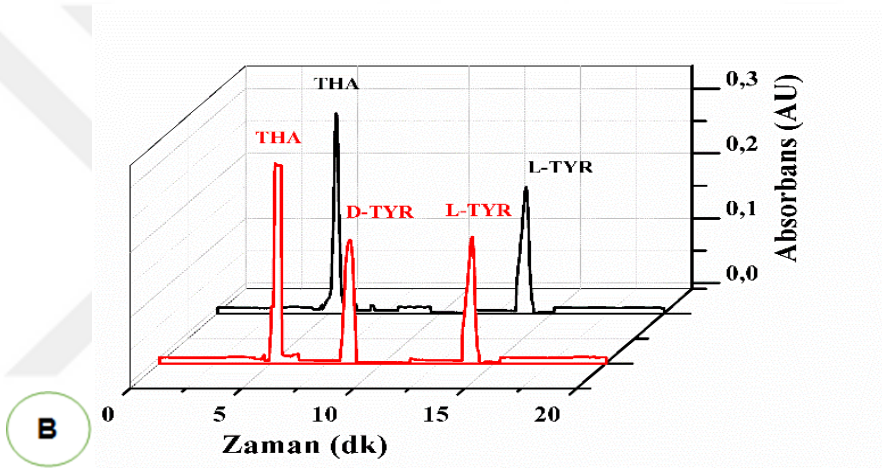
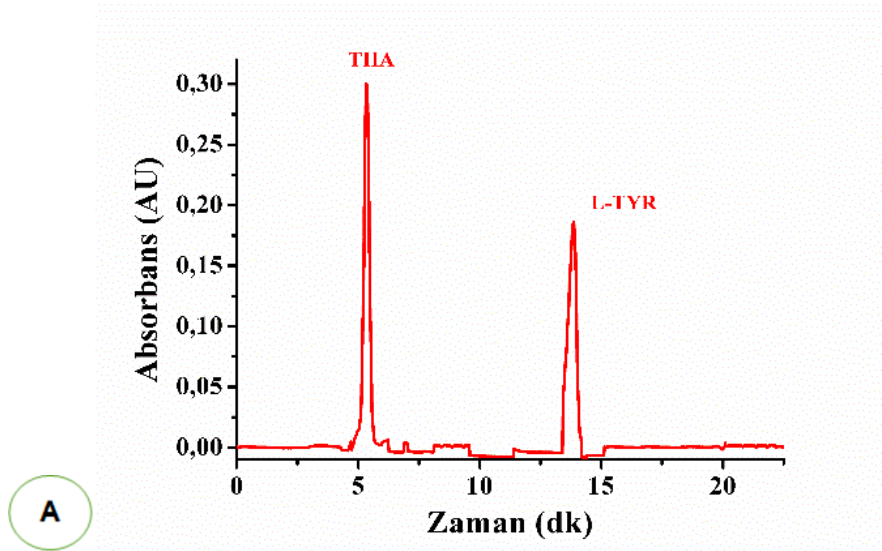


	t_L (dk)	t_R (dk)
Fenilalanin	19.50	11.09

Şekil 4.16. A) Fenilalaninin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L-formun kolona verildiği elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10kV) B) Fenilalaninin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde çıkarılmış elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) C) Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları.



Şekil 4.17. A) Triptofanın D-, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L-formun kolona verildiği elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) B) Triptofanın D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde karşılaştırılmış elektrogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10kV) C) Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları.



C

	t_L (dk)	t_R (dk)
Tirozin	13.98	8.53

Şekil 4.18. A) Tirozinin D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde yalnızca L- formun kolona verildiği kromatogram: (basınç: 0 mbar; pH: 7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) B) Triptofanın D, L, enantiyomerik türlerinin tespitinde çakıştırılmış kromatogram: (basınç: 0 mbar; pH:7.0; dalgaboyu: 200 nm; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; uygulanan voltaj: 10 kV) C) Enantiyomerik türlerin alıkonma zamanları

4.4.5. Elektrozmozotik Akış (EOF) Hesaplamaları

Elektromigrasyon tekniklerinden bir tanesi olan CEC sisteminde gerçekleşen ayırımların davranışını ve mekanizmasını inceleyebilmek açısından elektrozmozotik akış (EOF)'yi hesaplamak önem taşımaktadır. Ortamın pH'sının değişmesine bağlı olarak değişen yükler bakımından monolitik kolonlar anodik ya da katodik EOF oluştururlar. Negatif yüklü iyonlar katodik EOF oluştururken, pozitif yüklü gruplar ise anodik EOF sağlar. Monolitik kolonun sahip olduğu karboksil grubu EOF'nin büyüklüğünü etkiler ve yüzeyde oluşan net yük EOF'nin yönünü belirler [38,39]. Barındırdığı iyonlaşabilen fonksiyonel gruplar sayesinde amino asit bazlı N-Metakriloil-L-fenilalanin (MAPA) monomerinin fonksiyonel monomer olarak tercih edildiği monolitik kolon EOF oluşturabilmektedir. Bu, aynı zamanda MAPA monomerinin ayrıcalıklı özelliğidir. İzoelektrik nokta ($pI= 5.48$) üzerindeki pH'da MAPA monomerinin fenilalanin kısmında yer alan karboksilik asit ($-COOH$) ve amino ($-NH_2$) grubundan kaynaklanan deprotonizasyon sebebiyle MAPA monomeri zayıf katyon değiştirici monomer olarak davranabilmekte ve bu durum da EOF oluşturmasını sağlamaktadır. Hareketli fazın pH'sının artmasıyla birlikte asidik fonksiyonel grup protonlanmaktadır [248]. Elektrokromatografik ayırım pH 7.0'de gerçekleştirilmiş olup, karboksilik asit grubunun iyonlaşması ve amin grubunun deprotonlanması neticesinde monolitik kolonun yüzeyi (-) yük ile kaplandı. Bu koşullar altında EOF'nin yönü anottan katoda olacak şekilde katodik EOF meydana geldi.

Elektrozmozotik akış (EOF), Eşitlik 3.1.'deki formül yardımıyla hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.26'da tablo halinde sunulmuştur.

Çizelge 4.26. (5, 10 ve 15 kV'lık uygulanan elektriksel alan; basınç: 0 mbar; (ACN %50 pH - 7.0 %50); dalgaboyu: 200 nm, konsantrasyon: 0.5 mg/mL)'lik koşullarda hesaplanmış EOF değerleri.

Amino asit	(5 kV) (10^{-8}) $m^2/V.s$	(10 kV)(10^{-8}) $m^2/V.s$	(15 kV)(10^{-8}) $m^2/V.s$
Fenilalanin	6.48	3.42	2.28
Triptofan	6.77	3.40	2.27
Tirozin	6.76	3.39	2.35

Elektroozmotik akışın (EOF) artışı, elektroozmotik akış ile elektroforetik akışın anottan katoda doğru olduğu normal kapiler elektrokromatografide analiz süresini kısaltmaktadır. Elektroozmotik akış ise Eşitlik 3.1.'deki denkleme göre artan akım şiddeti ile azalmaktadır. Elektroozmotik akış azalınca analiz süresinin artması beklenmektedir. Ancak, pH 7.0 de elektroozmotik akış ile negatif yüke sahip fenilalanin, triptofan ve tirozin moleküllerinin elektroforetik hareketi ile elektroozmotik akış zıt yönlü olduğu için analiz süresi kısalmıştır.

4.4.6. Kromatografik Ayırım Gücü Hesaplamaları

4.4.6.1. Alıkonma (Kapasite) Faktörü ve Seçicilik Hesaplamaları

MAPA bazlı monolitik kolonda fenilalanin, triptofan ve tirozinin amino asitlerinin enantiyomerik ayrımı için yapılan tüm çalışmalar sonucunda elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak enantiyomerlerin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α) ve alıkonma faktörleri (k) Eşitlik 3.2. ve 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır.

Aşağıdaki çizelgeler 4.27., 4.28. ve 4.29.'daki farklı koşullarda gerçekleştirilmiş enantiyomerik ayırımlara ilişkin t_L , t_D , R_s , k ve α değerleri sunulmuştur.

Çizelge 4.27. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak fenilalaninin enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k').

Fenilalanin							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{L/D}$	$\alpha_{(T_L-T_0/T_D-T_0)}$
5	20.04	13.12	4,87	2.78	1.46	1.53	1.90
10	19.50	11.09	7.30	2.68	1.21	1.76	2.44
15	18.34	9.60	7.98	2.47	0.82	1.91	3.06
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
0	18.93	10.84	6.26	2.58	1.05	1.75	2.46
100	18.55	10.73	9.86	2.52	1.03	1.72	2.43
200	18.42	10.71	11.80	2.50	1.01	1.71	2.41
Organik Faz Derişimi	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
%50 ACN	19.11	11.17	6.14	2.53	1.06	1.71	2.38
%60 ACN	23.42	15.26	4.58	3.34	1.83	1.53	1.83
Enantiyomerik Türün Tespiti	19.50	-	-	2.44	-	-	-

Çizelge 4.28. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak triptofanın enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k') .

Triptofan							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{L/D}$	$\alpha_{(T_L-T_0/T_D-T_0)}$
5	18.14	12.02	5.18	2.44	1.27	1.51	1.91
10	16.46	9.94	5.53	2.15	0.90	1.65	2.38
15	15.00	8.11	5,70	1.91	0.57	1.85	3.33
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
0	16.34	9.77	5.44	2.16	0.89	1.67	2.48
100	16.12	9.26	9.05	2.12	0.79	1.74	2.73
200	15.73	8.95	11.50	2.01	0.72	1.76	2.84
Organik Faz Değişimi	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
%50 ACN	16.37	9.88	5.65	2.06	0.85	1.65	2.42
%60 ACN	20.37	13.00	5.72	2.83	1.44	1.57	1.96
Enantiyomerik Türün Tespiti	16.46	-	-	2.15	-	-	-

Çizelge 4.29. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak tirozinin enantiyomerlerinin alıkonma zamanlarıyla (t_R , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α, α') ve alıkonma faktörleri (k , k').

Tirozin							
Akım (kV)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_D	$\alpha_{L/D}$	$\alpha_{(T_L-T_0/T_D-T_0)}$
5	16.91	11.01	7.00	2.27	1.13	1.54	2.00
10	13.98	8.53	8.43	1.62	0.60	1.64	2.70
15	11.57	6.66	8.53	1.22	0.27	1.74	4.52
Basınç (mbar)	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
0	14.00	8.50	8.46	1.62	0.59	1.65	2.75
100	13.30	7.75	9.65	1.58	0.51	1.72	3.09
200	12.90	7.10	11.60	1.48	0.36	1.82	4.11
Organik Faz Derişimi	t_L (dk)	t_R (dk)	R_s	k_L	k_M	α_1	α_2
%50 ACN	14.05	8.50	8.54	1.65	0.60	1.65	2.75
%60 ACN	16.10	10.40	6.33	1.97	0.92	1.55	2.14
Enantiyomerik Türün Tespiti	13.58	-	-	1.62	-	-	-

4.4.6.2. Monolitik Kolonda Teorik Tabaka Sayısı ve Teorik Tabaka Yükseklikleri Hesaplamaları

Teorik tabaka sayısı (N), kolonun verimliliğini ve hızını gösteren önemli bir kromatografik parametrelere bir tanesidir. Teorik tabaka yüksekliği (H), kolonun hızını gösteren bir diğer parametredir ve teorik tabaka sayısı 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 gelmektedir.

Enantiyomerik ayrımlara ilişkin elektriksel alan etkisi incelendiğinde, artan voltaj neticesinde fenilalanin için teorik tabaka sayısının arttığına ve paralelinde teorik tabaka yüksekliğinin azaldığı hesaplanırken, triptofan ve tirozin için ise uygulanan elektriksel akımın artırılmasıyla teorik tabaka sayısında azalma ve teorik tabaka yüksekliğinde ise artış hesaplanmıştır.

Basınç uygulanmasıyla birlikte enantiyomerik ayrımlardaki etkinliğin incelenmesinde her üç amino asit için de teorik tabaka sayılarında artış ve teorik tabaka yüksekliklerinde azalma hesaplanmıştır.

ACN derişiminin artırılması sonrası gerçekleştirilen enantiyomerik ayrımlarda teorik tabaka sayı değerleri fenilalanin ve tirozin için azalırken, triptofan için ise artış kaydedilmiştir. Bu değerler ile ters orantılı olarak teorik tabaka yüksekliği değerleri fenilalanin ve tirozin için artarken tirozin için azalmıştır.

Çeşitli parametrelere göre farklı koşullar altında gerçekleşen enantiyomerik ayrımlardaki kolonların verimliliğini göstermesi açısından monolitik kolonlardaki teorik tabaka sayıları ve teorik tabaka yükseklikleri Eşitlik 3.4. ve 3.5. yardımıyla hesaplanarak aşağıda yer alan sırasıyla Çizelge 4.30. , 4.31. ve 4.32.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.30. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak fenilalaninin enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri

Fenilalanin						
Akım (kV)	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
5	1,606,406	2,754,150	2,180,278	0.000236	0.000137	0.000159
10	3,217,983	1,563,235	2,390,609	0.000118	0.000243	0.000180
15	5,275,649	1,059,006	2,717,327	0.0000720	0.000358	0.000215
Basınç (mbar)	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
0	2,689,772	1,490,798	2,090,285	0.000141	0.000254	0.000197
100	12,119,592	2,284,371	7,201,981	0.0000313	0.000166	0.0000987
200	12,644,444	3,274,891	7,7959,667	0.0000300	0.000116	0.0000734
Organik Faz Değişimi	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
%50 ACN	2,939,023	1,443,483	2,191,253	0.000129	0.000263	0.000196
%60 ACN	1,829,808	1,988,026	1,908,917	0.000148	0.000191	0.000169
Enantiyomerik Türün Tespiti	3,425,867	-	-	0.000109	-	-

Çizelge 4.31. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak triptofanın enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri.

Triptofan						
Akım (kV)	N_L	N_D	N_{or}	H_L (m)	H_R (m)	H_{or} (m)
5	2,897,442	2,261,656	2,579,549	0.000129	0.000168	0.000148
10	2,385,612	1,549,708	1,967,660	0.000159	0.000245	0.000202
15	2,156,639	834,453	1,495,546	0,000176	0.000455	0.000315
Basınç (mbar)	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
0	2,004,095	1,674,566	1,610,800	0.000189	0.000226	0.000207
100	5,155,815	3,603,890	4,379,852	0.0000737	0.000105	0.0000893
200	15,523,679	2,821,280	9,172,479	0.0000244	0.000134	0,0000792
Organik Faz Değişimi	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
%50 ACN	2,257,470	2,440,360	2,348,915	0.000168	0.000155	0.000161
%60 ACN	3,511,532	2,704,000	3,107,766	0.000108	0.00140	0.000124
Enantiyomerik Türün Tespiti	4,187,755	-	-	0.0000907	-	-

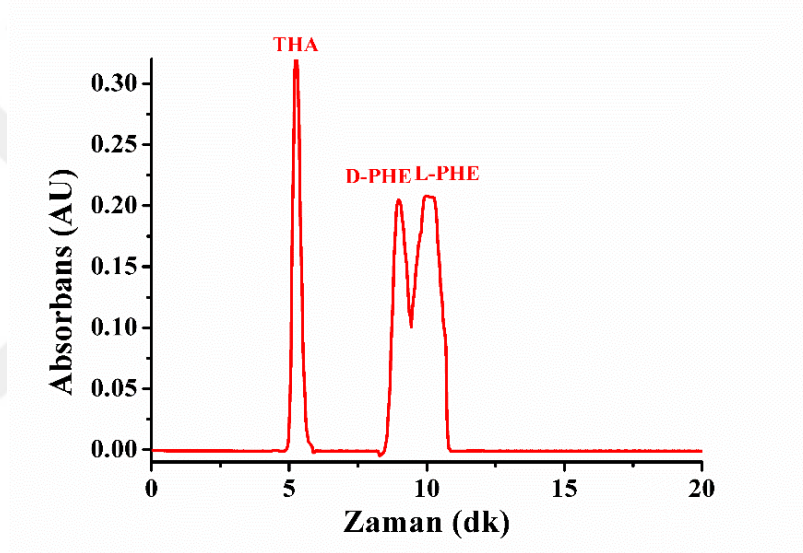
Çizelge 4.32. Tüm elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak tirozinin enantiyomerlerinin teorik tabaka sayıları ve ortalamaları ile (N_L , N_D ve N_{or}) teorik tabaka yükseklikleri ve ortalamalarının (H_L , H_D ve H_{or}) hesaplanmış değerleri.

Tirozin						
Akım (kV)	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
5	10,071,343	1,897,545	5,984,444	0.0000353	0.000200	0.000117
10	6,883,582	3,048,183	2,808,070	0.0000552	0.000124	0.0000899
15	5,949,551	2,263,040	2,975,907	0.0000638	0.000167	0.000115
Basınç (mbar)	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
0 mbar	6,409,146	3,211,111	3,073,360	0.0000592	0.000118	0.0000886
100 mbar	9,356,165	2,669,444	6,012,804	0.0000406	0.000142	0.0000913
200 mbar	10,650,240	3,226,240	6,938,240	0.0000356	0.000117	0.0000763
Organik Faz Değişimi	N_L	N_D	N_{or}	H_L	H_R	H_{or}
%50 ACN	6,445,795	3,211,111	3,224,503	0.0000589	0.000118	0.0000886
%60 ACN	4,147,360	2,704,000	2,075,032	0.0000916	0.000140	0.000115
Enantiyomerik Türün Tespiti	4,187,755	-	-	0.0000768	-	-

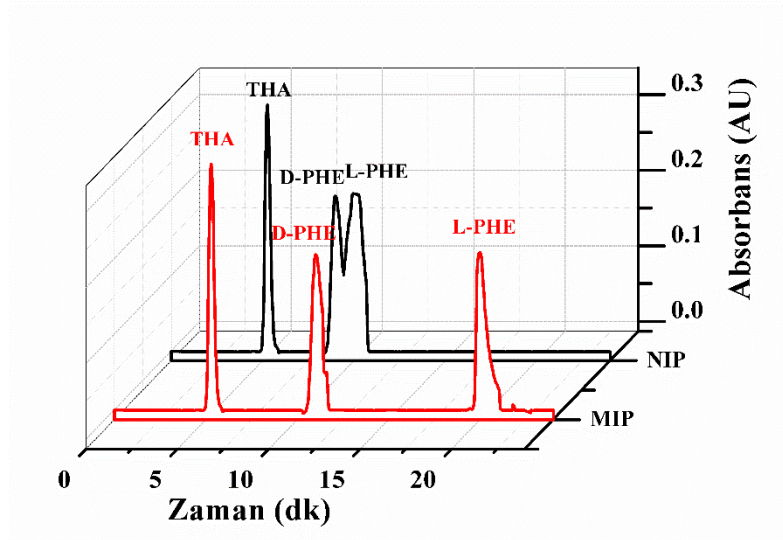
4.5. Moleküler Baskılanma Faktörünün Belirlenmesi

Hidrofobik amino asitler ve enantiyomer çiftleri için amino asit baskılanmış monolitik kolondaki enantiyomerik ayırımlarının, moleküler baskılanmış kolonun ayırma gücü ile baskılanmamış kolon arasındaki ayırma gücü arasında yapılan oranlama Eşitlik 3.7.'deki formül yardımıyla hesaplanması sonucu elektrokromatografik ayırma moleküler baskılanmanın etkinliği ifade edildi.

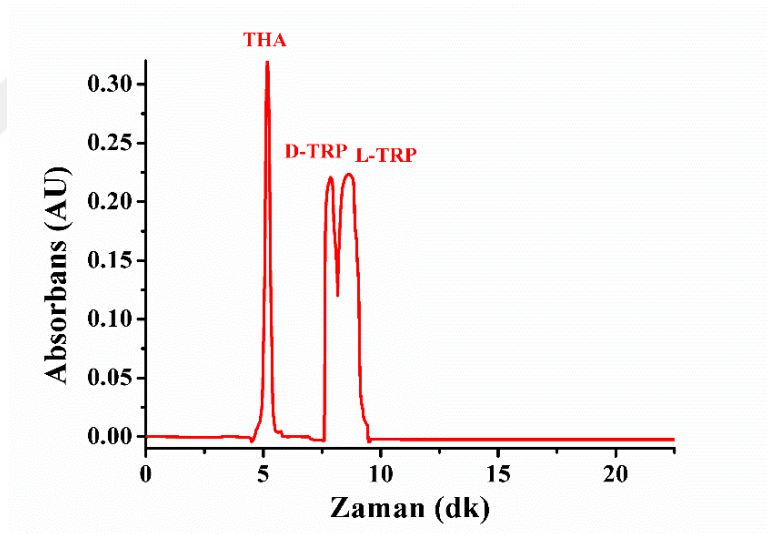
Aşağıdaki kromatogramlarda baskılanmamış (NIP) kolonlarda gerçekleşen enantiyomerik ayırımlar yer almaktadır.



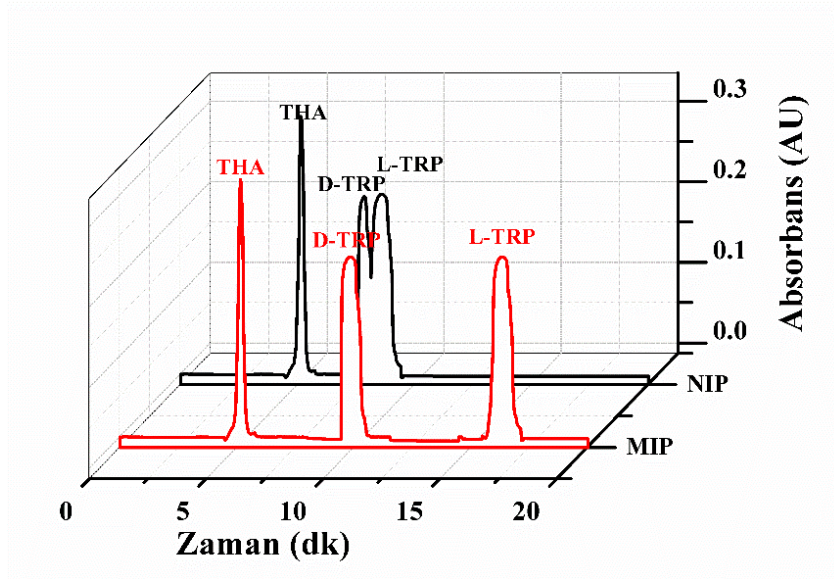
Şekil 4.19. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda fenilalaninin enantiyomerik ayırımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).



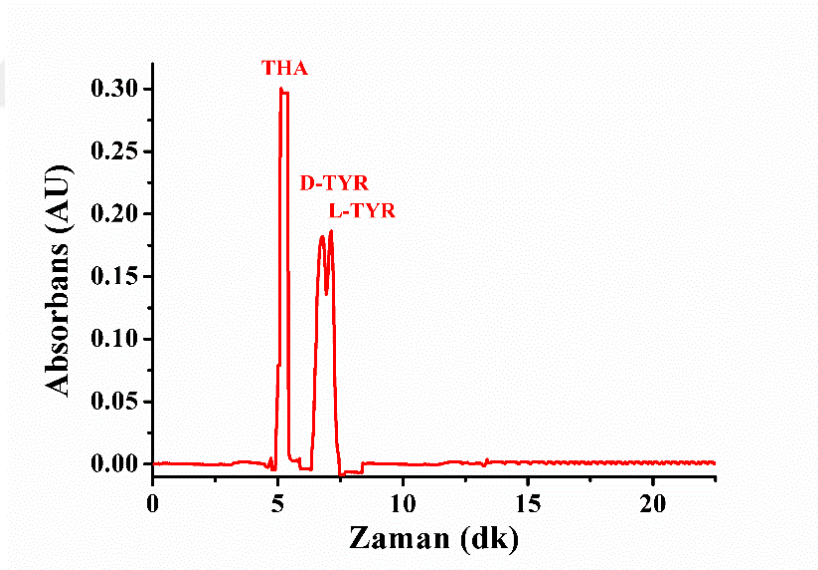
Şekil 4.20. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda fenilalaninin çakıştırılmış elektrogramda enantiyomerik ayırımı: uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).



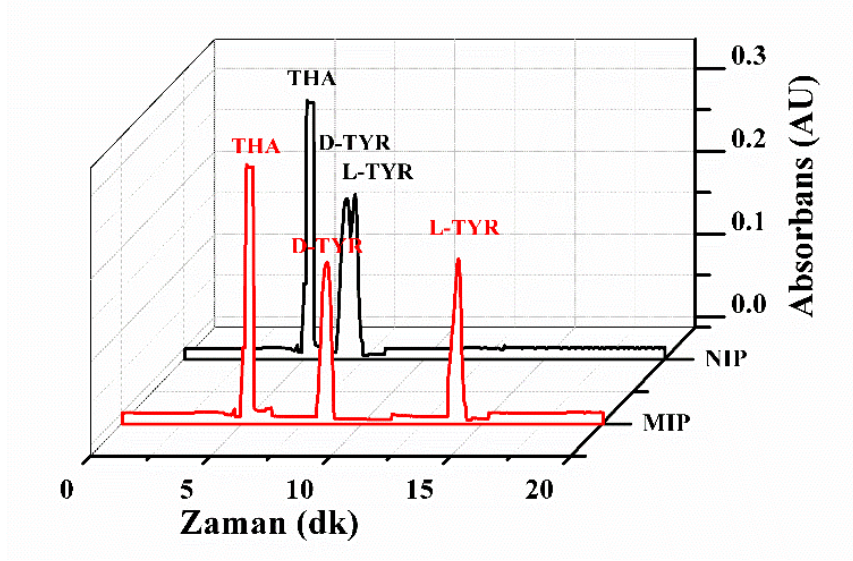
Şekil 4.21. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda triptofanın enantiyomerik ayırımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).



Şekil 4.22. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda çakıştırılmış elektrogramda triptofanın enantiyomerik ayrımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).



Şekil 4.23. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda tirozinin enantiyomerik ayrımı: (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).



Şekil 4.24. Baskılanmamış (NIP)-(boş) kolonda çakıştırılmış elektrogramda tirozinin enantiyomerik ayırımı: uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).

Aşağıda bulunan 4.33. no'lu çizelgede baskılanmamış (NIP) kolonda gerçekleştirilen enantiyomerik ayırımlara ilişkin kolonun kromatografik performansına ilişkin değerler sunulmuştur.

Çizelge 4.33. Hidrofobik amino asitlerin baskılanmamış kolondaki enantiyomerik ayırımına ilişkin kromatografik parametrik değerler (alığınma zamanları ve alığınma faktörleri): (uygulanan voltaj: 10 kV, basınç: 0 mbar, konsantrasyon: 0.5 mg/mL, dalgaboyu: 200 nm; (ACN %50 - pH 7 %50).

Amino asit	Akım (kV)	t_L	t_R	k	k'
Triptofan	10	8.71	7.86	0.108	0.738
Tirozin	10	7.13	6.85	0.0408	0.395
Fenilalanin	10	9.90	9.10	0.0879	0.875

Moleküler baskılanmış kolonun etkinliğini hesaplayabilmek için baskılama faktörü (k_{MIP}), baskılanmış kolonun alıkonma (kapasite) faktörünün (MIP), baskılanmamış kolonun (NIP) alıkonma (kapasite) faktörlerinin oranı Eşitlik 3.7.'deki hesaplamayla bulunmuş olup, sonuçlar Çizelge 4.34'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. Enantiyomerik ayırimda moleküler baskılanmış (MIP) kolon ve baskılanmamış (NIP) kolona ilişkin alıkonma faktörleri ve baskılama faktörünün etkinlik değerleri.

Amino asit	k_{MIP}	k'_{MIP}	k_{NIP}	k'_{NIP}	k_{IF}	k'_{IF}
Triptofan	0.656	2.105	0.108	0.738	6.07	2.85
Tirozin	0.638	1.632	0.0408	0.395	15.63	4.13
Fenilalanin	0.758	2.70	0.0879	0.875	8.62	3.08

•Moleküler baskılama teknolojisinin kullanımı ile baskılamanın etkinliğini sayısal olarak tespit etmek amacıyla, moleküler baskılanmış monolitik kolondaki enantiyomerik ayırımın gücü, moleküler baskılanmamış monolitik kolondaki enantiyomerik ayırımın gücüne oranlanmış ve baskılanma faktörü hesaplanmıştır. Hesaplanan baskılama faktörü (k_{IF}) değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla 3.08, 2.85 ve 4.13 olarak tespit edilerek baskılama etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak MIP tekniğinin, CEC sisteminde başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır.

Kapasite faktörünün 1'den büyük olması, belirli bir etkileşim seviyesini göstermektedir ve olumlu bir durumdur. Bir analiz işlemi esnasında kapasite faktörünün, örneğin 20'den daha yüksek değerlerde çıkması halinde ise maddenin kolonda oldukça uzun süre alıkonduğunun göstergesidir. İdeal olarak ise kapasite faktörünün 1 ile 5 arasında olması tercih edilir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki, fenilalanin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin enantiyomerik formlarının, moleküler baskılanmış MAPA bazlı hidrofobik karakterli kolonlardaki ayırımları istenilen seviyelerde gerçekleşmiştir.

4.6. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Fenilalanin, triptofan ve tirozinin CEC sisteminde enantiyomerik ayrımını gerçekleştirmek üzere hazırlanan MAPA bazlı monolitik kolonların gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik veya farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği gibi verimlilik analizleri yapılmıştır ve kromatografik analizlere ilişkin bulgular aşağıdaki çizelgelerde sunulmuştur.

Çizelge 4.35. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla fenilalaninin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanının etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri : (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalga boyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7))

Fenilalanin			
t_R (dk)	t_L (dk)	R_s	α
19.50	11.09	7.30	2.44
19.86	11.43	7.25	2.40
19.56	11.26	7.27	2.41
19.40	11.05	7.29	2.42

Çizelge 4.36. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla triptofanın D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanının etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri: (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalga boyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7))

Triptofan			
t_R (dk)	t_L (dk)	R_s	α
16.46	9.94	5.53	2.38
16.63	10.09	5.49	2.34
16.40	9.90	5.50	2.35
16.50	9.92	5.45	2.36

Çizelge 4.37. Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları amacıyla tirozinin D,L, enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanın etkisinde elde edilen; alıkonma zamanları, ayırım gücü ve seçicilik faktörleri : (akım: 10 kV; basınç: 0 mbar; konsantrasyon: 0.5 mg/mL; dalgaboyu: 200 nm; (%50 ACN & %50 pH 7))

Tirozin			
t_R (dk)	t_L (dk)	R_s	α
13.98	8.53	8.43	2.70
14.02	8.56	8.35	2.58
14.03	8.58	8.32	2.55
13.99	8.55	8.40	2.63

CEC sisteminde tekrarlı olarak MAPA kolonuna 4 kez doldurulan fenilalanin, triptofan ve tirozinin D,L, enantiyomerik formlarının alıkonma zamanları, pik genişlikleri ve seçicilik faktörleri birbiriyle uyumluluk göstermektedir. Bu bulgular Bölüm 4.4.6' daki kromatografik ayırım gücü hesaplamalarıyla elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

- Bu çalışmada ilk olarak, hidrofobik karakterli amino asitlerden fenilalanin, triptofan ve tirozinin kapiler elektrokromatografi sisteminde moleküler baskılama tekniği ile enantiyomerik ayırımlarında kullanılmak üzere hidrofobik karakterli monolitik kolon hazırlanmıştır. Bunun için, amino asidin L- formu baskılanacak kalıp molekül olarak seçilirken, monolitik ve hidrofobik karakterli kolon hazırlanması amacıyla hidrofobik karakterli N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) monomeri, polimetakrilat bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak tercih edilmiştir. Hazırlanan kolonlarda hidrofobik yüzey sağlamak için MAPA monomerinin kullanılmasının yanı sıra, çarpaz bağlayıcı olarak etilendimetakrilat EDMA, uygun gözenek yapıcı sistem oluşturmak için Etanol/Metanol karışımı (ETOH/MeOH) kullanıldı.
- Hazırlanan monolitik kolonların geçirgenliğini ölçmek için metanol çözeltisinin değişken akış hızlarında kullanılması ile kolon boyunca gerçekleşen basınç düşmesi, incelendi. Metanol çözeltisinin akış hızının arttırılmasıyla birlikte geri basınç düşmesinde artış gözlemlendi. Geçirgenliğin olduğu MIP2 (phe, trp ve tyr) kolonları çalışma kolonu olarak seçilmiş ve bu monolitik kolonların geçirgenliğinin yanı sıra mekanik açıdan kararlılığının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Metanolün akış hızı 5 µL/dk'ya ulaştığı anda geri basınç değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla 34.16 mbar, 31.61 mbar ve 31.01 mbar olarak ölçülmüştür. Moleküler baskılanmış monolitik kolonların sahip olduğu geri basınç değerleri, moleküler baskılama sonucu kolonda meydana gelen kaviteler üzerinde hareketli fazın akış göstermesine olanak sağlamaktadır. Diğer taraftan, monolitik kolonlar için önemli bir diğer parametre olan geçirgenlik değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla $1.521 \times 10^{-11} \text{ m}^2$, $1.644 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ ve $1.676 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ olarak hesaplanmıştır. Geçirgenlik değerlerine bakılarak, kolonun hidrofobik karakterinin diğer kolonlar ile kıyaslandığında daha yüksek olduğunu göstermektedir.

- Literatürde ilk kez gerçekleşen amino asit baskılanmış monolitik kolonların karakterizasyon işlemleri kapsamında ilk olarak morfolojik yapılarının incelenmesi amacıyla monolitik kolonların SEM görüntüleri incelenmiştir. SEM görüntülerinden edinilen değerlendirmeler kapsamında polimerik yapının kolonların yüzeyi ile sıkı bir şekilde bağlantı oluşturduğu gözlenmiş 2 µm'lik küresel mikroglobüler yapıların iç içe kümeler halinde birleşerek geniş gözenek kanallarıyla birlikte monolitik kolonları oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durum, monolitik kolonların genel karakteristik özellikleriyle uyumlu yapıdadır. Bunun yanısıra, kolonun moleküler baskılanma sürecinde ise makrogözenekli yapıda çok ciddi boyutta değişiklik gözlenmemiştir. PMAPA bazlı monolitik kolonların yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri Brunauer-Emmet-Teller (BET) ve civa porozimetre yöntemi ile incelenmiştir. Spesifik yüzey alanları moleküler baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kolonlar için sırasıyla; tirozin baskılı, triptofan baskılı, fenilalanin baskılı ve baskılanmamış monolitik kolonlar (MIPTYR, MIPTRP, MIPPHE, NIP) için 9.3, 9.1, 9.0, 8.7 m²/g şeklinde bulunduğu rapor edilmiştir.
- Monolitik kolonların hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak tercih edilen MAPA ve polimerizasyon sonucu elde edilen PMAPA'nın içerdiği fonksiyonel monomerlerin tayini olarak MAPA monomerinin ve PMAPA bazlı monolitinin FTIR-ATR spektrumları incelenmiştir. Polimerin doğal yapısına ait bilgi edinebilmek amacıyla polimerizasyon derecesi FTIR-ATR spektrumuyla karakterize edildiğinde, tüm MAPA gruplarının polimerik ağ yapısına başarılı bir şekilde katıldığı ve polimerizasyon işleminin sonunda esas itibarıyla hiçbir polimerleşmeden kalan monomer bulunmadığı gözlenmiştir.
- Monolitik kolonların kromatografik ayırma performansları, hareketli faz olarak ACN/fosfat tamponunun (%60:40; pH 7.0, 10mM) çözücü sistemi olarak seçildiği ortamda uygulama bileşikler olarak seçilen alkil benzenlerin ayrılmasıyla test edilmiştir. Baskılanmış kolonun elektrokromatografik davranışı, farklı elektriksel alan uygulamaları ile test edildi. İşaretleyici (alıkonmayan) bileşik olarak ise tiyoüre bileşiği kullanıldı. Ayırımların etkin bir şekilde gerçekleştiği hesaplanan %RSD değerleri ile tespit edilmiştir.

- PMAPA kolon ile hidrofobik etkileşim prensibinden yararlanılarak sırasıyla fenilalanin (Phe), triptofan (Trp) ve tirozin (Tyr) enantiyomerlerinin ayırımına elektrik alanının etkisi incelenmiştir. Ayırımlar için farklı şiddetlerde (5, 10, 15 kV) elektrik alanı voltaj olarak uygulanmıştır. Ayırma gücü (R_s) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler ışığında elde edilen sonuçlarda, ayırımların etkinliğinin en yüksek 15 kV voltajda oluşan elektrik alanı ortamında olduğu saptanmıştır.
- Elektroozmotik akış azalınca, analiz süresinin artması beklenmektedir. Ancak, pH 7.0 de elektroozmotik akış ile negatif yüke sahip triptofan ile elektroozmotik akış zıt yönlü olduğu için analiz süresi kısalmıştır. Triptofan ve tirozinin izoelektrik noktaları kıyaslandığında (pI : 5.88, pI :5.65) tirozinin daha negatif olduğu görülür. Ancak triptofan daha hidrofobik olduğundan daha geç elue edilmiştir. 15 kV da ki gözlenen uzun elüsyon süresi ayırma hidrofobik etkileşimlerin de katkıda bulunduğunu ve baskın olduğunu göstermektedir.
- Elektroozmotik akışın (EOF) artışı, elektroozmotik akış ile elektroforetik akışın anottan katoda doğru olduğu normal kapiler elektrokromatografide analiz süresini kısaltmaktadır. Elektroozmotik akış ise artan akım şiddeti ile azalmaktadır. Elektroozmotik akış azalınca analiz süresinin artması teorik olarak beklenmektedir. Ancak, enantiyomerik ayırımın gerçekleştiği pH 7.0 de elektroozmotik akış ile negatif yüke sahip fenilalaninin elektroforetik hareketliliği zıt yönde olduğu için analiz süresi kısalmıştır. 15 kV da en uzun elüsyon süresi fenilalanin için görülmüş, burada hidrofobik etkileşimlerin de katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.
- Elektroforez prensibine dayalı sistemlerdeki en önemli sorunlardan bir tanesi Joule ısınması olayıdır. Kolonda yüklü türlerin olması uygulanan elektrik alanı sonucunda fazla akım oluşmasına sebep olur. Bu da joule ısınmasına yol açar. Fakat, D ve L enantiyomerlerinin ayırımlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görüldüğünden 15 kV da dahil joule ısınmasının ayırımı etkilemediği görülmüştür. Ancak, uygulanan elektriksel alanın arttırılmasıyla oluşabilecek olası akım kopması gibi olumsuz durumlar ile karşılaşmamak adına 15 kV'dan daha yukarı akım değerlerine çıkılmamıştır. Netice itibariyle ayırıcılık ve seçicilik faktörü gibi

kromatografik performans değerlerinin 1.5'tan fazla olduğu 10 kV'luk voltaj uygulaması çalışmaların yürütülmesi için tercih edilmiştir.

- Üç farklı aminoasit enantiyomerlerinin (Phe, Trp ve Tyr) kiral olarak ayırımında basıncın etkisi incelenmiştir. Sisteme sırasıyla 0, 100 ve 200 mbar basınç uygulanmıştır. Kolon sistemine basınç uygulanmadan sadece elektrik alan uygulanmasıyla D,L, enantiyomerlerinde ayırım görülmüş, ayırma basıncın etkisini incelemek için sisteme 100 ve 200 mbar'lık basınç karşılaştırma yapmak amacıyla uygulanmıştır. Basıncın artırılmasıyla ayırımların etkinliğinin arttığı görülürken, alıkonma sürelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Üç farklı basınç koşulunda (0, 100 ve 200 mbar) ayırma gücünün etkinlik değerinin 1.5'tan yüksek olması sebebiyle kromatografik ayırımların basınç uygulamadan gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.
- Organik çözücünün fenilalanin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin D,L, enantiyomerik formlarının kromatografik ayırımına etkisini incelemek için asetronitril (ACN) oranları değiştirilerek hazırlanan tampon çözelti sistemleri kullanılmıştır. Elektrokromatografik sistemlerde kullanılan tampon çözelti içerisindeki ACN oranı, elektroozmotik akış (EOF)'nin büyüklüğünü etkilemektedir. Ayırma kapasitesinin seviyesi, EOF'ye bağlıdır. Ayırma mekanizması üzerinde organik faz etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ACN miktarının artmasıyla elektroozmotik akışın (EOF) azaldığı görülmektedir. Bu nedenle ayırımı gerçekleştiren türler daha fazla alıkonmaya uğramıştır. Ayırımlar için kullanılan çözücü sisteminde tampon çözelti olarak pH 7 ile birlikte hacimsel olarak %50 ACN ve %60 ACN olarak hazırlanmıştır. Bu tamponlarla yapılan ayırımlarda da ACN miktarının %60'a çıkarılmasıyla türlerin alıkonmaları artmış ve pikler yayvanlaşmaya başlamıştır. Bu sebeple çalışmalar %50 ACN ortamında yürütülmüştür.
- Moleküler baskılamanın etkinliğini tespit edebilmek için üç farklı aminoasite ait olan enantiyomerik formların yalnızca L- formları örnek olarak kolona verilerek enantiyomerik tür tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda elüsyona uğrayan pikin hangisi olduğu tespit edilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde ise kolonda daha fazla tutulan amino asitlerin enantiyomerik türlerinin L-formları olduğu gözlenmiştir. Bunu doğrulamak için D ve L enantiyomerik formları kolona birlikte de verilmiştir.

- CEC sisteminde gerçekleşen enantiyomerik ayırımların davranışını ve mekanizmasını inceleyebilmek açısından elektroozmotik akış (EOF) sayısal değeri hesaplanmıştır. Barındırdığı iyonlaşabilen fonksiyonel gruplar sayesinde amino asit bazlı N-Metakriloil-L-Fenilalanin (MAPA) monomerinin fonksiyonel monomer olarak tercih edildiği monolitik kolon EOF oluşturabilmektedir. Bu, aynı zaman da MAPA monomerinin ayrıcalıklı özelliğidir. İzoelektrik nokta ($pI= 5.48$) üzerindeki pH'da MAPA monomerinin fenilalanin kısmında yer alan karboksilik asit ($-COOH$)'ın iyonlaşması ve amino ($-NH_2$) grubundan kaynaklanan deprotonlanma sebebiyle MAPA monomeri zayıf katyon değiştirici olarak davranabilmekte ve bu durum da EOF oluşturmasını sağlamaktadır. Bu özelliği sebebiyle monolitik kolon hazırlanma sürecinde polimerizasyona katkı sağlayıcı başka bir monomer katılmasına gereksinim olmaması, MAPA monomerinin fonksiyonel monomer olarak tercih edilme sebeplerinden bir tanesi olmuştur.
- Enantiyomerik ayırımlar pH 7.0'de gerçekleştirilmiş olup bu değer MAPA monomerinin içerisinde yer alan fenilalanin amino asidinin izoelektrik noktasının üzerinde bir değer olduğu için, karboksilik asit grubunun iyonlaşması ve amin grubunun deprotonlanması neticesinde monolitik kolonun yüzeyi (-) yük ile kaplandı. Bu koşullar altında EOF'nin yönü anottan katoda olacak şekilde katodik EOF, yüklü türler açısından bir diğer deyişle ters akım oluşmuştur.
- Elektroozmotik akışın (EOF) artışı, elektroozmotik akış ile elektroforetik akışın anottan katoda doğru olduğu normal kapiler elektrokromatografide analiz süresini kısaltmıştır. Elektroozmotik akış, artan akım şiddeti ile azalmaktadır. Elektroozmotik akış azalınca analiz süresinin artması teorik olarak beklenmektedir. Ancak, enantiyomerik ayırımın gerçekleştiği pH 7.0 de elektroozmotik akış ile negatif yüke sahip fenilalanin, triptofan ve tirozin moleküllerinin elektroforetik hareketi zıt yönlü olduğu tespit edilerek analiz süresi beklenenden kısa olmuştur.
- Kromatografik performansların değerlendirilebilmesi kapsamında MAPA bazlı monolitik kolonda fenilalanin, triptofan ve tirozinin amino asitlerinin enantiyomerik ayırımı için yapılan tüm çalışmalar sonucunda elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak enantiyomerlerin alıkonma zamanlarıyla

(t_D , t_L) ayırıcılık (R_s), seçicilik faktörleri (α) ve alıkonma faktörleri hesaplanmıştır. Artan elektriksel akım ile birlikte her üç amino asit için (R_s) ve (α) değerleri artış göstermiş ve ayırımların etkinliğinin arttığı görülmüştür. Basınç uygulandığında ise artan basınç sonrası fenilalanin için (R_s) değerlerinde artış gözlemlenirken, (α) değerlerinde ise düşüş meydana geldiği görülmüştür. Triptofan ve tirozin için ise hem (R_s), hem de (α) değerlerinde artış olduğu görülmüştür. ACN derişiminin arttırılmasıyla enantiyomerik ayırimda organik faz etkisinin incelenmesinde ise fenilalanin ve tirozin için (R_s) ve (α) değerlerinde azalma kaydedilirken, triptofan için ise (R_s) değerlerinde artış, (α) değerlerinde azalma meydana geldiği görülmüştür.

- Kolonun hız ve verimliliğinin ölçüsü olan önemli parametrelerden teorik tabaka sayıları ve yükseklikleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, enantiyomerik ayırımlara ilişkin elektriksel alan etkisi incelendiğinde, artan voltaj ile fenilalanin için teorik tabaka sayısının arttığı ve paralelinde teorik tabaka yükseliğinin azaldığı hesaplanırken, triptofan ve tirozin için ise uygulanan elektiksel akımın arttırılmasıyla teorik tabaka sayısında azalma ve teorik tabaka yükseliğinde artış olduğu görülmüştür. Basınç uygulamasının enantiyomerik ayırımlardaki etkinliği incelendiğinde her üç amino asit için teorik tabaka sayılarında artış ve teorik tabaka yüksekliklerinde azalma olduğu görülmüştür. ACN derişiminin arttırılması ile gerçekleştirilen enantiyomerik ayırımlarda teorik tabaka sayı değerlerinin fenilalanin ve tirozin için azaldığı, triptofan için ise arttığı görülmüştür. Bu değerler ile ters orantılı olarak teorik tabaka yüksekliği değerlerinin fenilalanin ve tirozin için arttığı, tirozin için ise azaldığı görülmüştür.
- Moleküler baskılama teknolojisinin kullanımı ile baskılamanın etkinliğini sayısal olarak tespit etmek amacıyla, moleküler baskılanmış monolitik kolondaki enantiyomerik ayırımın gücü, moleküler baskılanmamış monolitik kolondaki enantiyomerik ayırımın gücüne oranlanmış ve baskılanma faktörü hesaplanmıştır. Hesaplanan baskılama faktörü (k_{IF}) değerleri fenilalanin, triptofan ve tirozin için sırasıyla 3.08, 2.85 ve 4.13 olarak tespit edilerek baskılama etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak MIP tekniğinin, CEC sisteminde başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır.

- Ayırım etkinliğinin göstergesi olan kapasite faktörünün 1'den büyük olması, belirli bir etkileşim seviyesini göstermektedir ve bu istenen bir durumdur. Bir analiz işlemi esnasında kapasite faktörünün, örneğin 20'den daha yüksek değerlerde çıkması halinde ise maddenin kolonda oldukça uzun süre alıkondüğunun göstergesidir. İdeal olarak ise kapasite faktörünün 1 ile 5 arasında olması tercih edilir. Yapılan çalışmanın sonuçları göstermektedir ki, fenilalanin, triptofan ve tirozin amino asitlerinin enantiyomerik formlarının, moleküler baskılanmış MAPA bazlı hidrofobik karakterli kolonlardaki ayırımları etkin seviyelerde gerçekleştirilmiştir.
- Sentezlenen amino asit bazlı monolitik kolonlarla elde edilen enantiyomerik amino asitlerin ayrılma verimliliği ve kolon etkinlikleri, literatürdeki benzer polimerik monolitler ile elde edilen ayrılma verimliliği ile kıyaslanabilir büyüklüktedir [30, 122, 126]. Literatürde yaklaşık son 10 yılda enantiyomerik olarak doğrudan ve dolaylı yöntemler ile gerçekleştirilen çalışmalar Çizelge 5.1. ve 5.2.'de sunulmuştur. Sonuç olarak, çalışma kapsamında amino asit bazlı moleküler baskılanmış monolitik kolon sentezlenerek, literatürde amino asitlerin enantiyomerik ayırımında, ilk defa kullanılmış, enantiyomerik ayırımların seçici ve hassas bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1. 2004-2014 Yılları Arası Dolaylı Yöntemler ile Gerçekleştirilmiş Amino Asitlerin Enantiyomerik Ayırımları [249].

Teknik	Amino asit	Dolaylı Yöntem	Tayin edilme
HPLC-UV	D,L-Selenomethiyonin	Difloronitrobenzen kiral türevleme aracı	UV-340 nm
2D-HPLC	Amino asitler	4-flor-7-nitro-2,1,3-benzodiazol	UV
HPLC	Amino asitler	NBD-Cl ve FDAA türevli kiral sabit faz	UV-470 nm
HPLC	Selenomethiyonin	Ftalimit-(S)-naproksen türevli kiral ajan	UV-231 nm
HPLC	Aromatik amino asitler	Magnetik nanopartikül modifiye edilmiş kolon	UV-258 nm
HPLC	Protoinojenik amino asitler	(S)-naproksen-benzotriazol	UV-231 nm
HPLC	15 Protoinojenik amino asit ve D,L-Selenomethiyonin	CNCl ve onun 6-bütoksi türevi içerisinde kiral ajan olarak R-(+)-naftiletil amin ve (S)-(+)-1-benzil-3-aminopirolidin	DAD
HPLC	Selenomethiyonin, Methiyonin ve Sistein	DFDNB ve CNCl karışımından sentezli 12 türevlendirilmiş kiral ajan	UV
HPLC	Selenomethiyonin	(R)-Metil benzil izotiyosiyanat (MBIC) ve (S)-1-(1-naftil) etil izotiyosiyanat (NEIC)	UV
HPLC	13 Protoinojenik amino asit	CNCl türevli kiral ajan	UV
HPLC	Sütteki D-amino asitler	OPA-N-asetil-L-sistein	UV
HPLC	Gıda analizlerindeki amino asitler	NBD-F	UV-CD
HPLC	Pensilamin, Sistein ve Homosistein	Kiral ajan olarak (S)-Naproksen-benzotriazol	UV
HPLC	Protein ve proteinsiz amino asitler	N-(4-Klor-6-piperidinil-[1, 3, 5]-triazin-2-yl)-l-lizin amit ve N- (4-klor-6-piperidinil-[1,3,5]-triazin- 2-yl)-l-lözin triazin bazlı türevlendirilmiş kiral ajanlar	UV
HPLC	Proteinsiz amino asitler ve PenA	S)-N-(4-Nitrofenoksikarbonil) fenilalanin metoksietil ester	UV-205 nm

HPLC	Proteinojenik ve non-proteinojenik amino asitler	FDNP-Leu,Phe,Val, Ala türevli kiral ajanlar	UV-340 nm
HPLC	Serebrospinal sıvısındaki serin ve glisin enantiyomerleri	Marfey reaktifi	UV
HPLC	Pensilamin	N-Suisinimidil-(S)-2-(6-metoksinaftil-2-yl) propiyonat	UV-231 nm
HPLC	α -Amino asitler	Marfey reaktifi	UV-340 nm
HPLC	α -Amino asitler	S-triazin klorür bazlı kiral ajan	UV-230 nm
HPLC	α -Amino asitler	N-(R)-mandelil-l-sistein türevli kiral ajan	UV-340 nm
GC-MS	Amino asitler	Kiral olmayan reaktif türevli kiral kolon ve kiral olmayan kolon üzerinde kiral türevli grup içeren kolon	MS
GC-MS	Amino asitler	Chirasil-Valinden in-situ türevli Heptaflorbutil kloroformat	MS
TLC	Amino asitler	Marfey reaktifi	UV-340 nm
TLC	Amino asitler	Marfey reaktifi ve onun kiral türevleri	UV-340 nm
TLC ve HPLC	Pensilamin	Marfey reaktifi	UV-340 nm
TLC ve HPLC	Proteinsiz- α -amino asitler	Marfey reaktifi ve onun kiral türevleri	UV-340 nm

Çizelge 5.2. 2004-2014 Yılları Arası Doğrudan Yöntemler ile Gerçekleştirilmiş Amino Asitlerin Enantiyomerik Ayırımları [249].

Teknik	Amino asit	Doğrudan Yöntem	Tayin edilme
TLC	D,L-Selenomethiyonin	Kiral selektör olarak kinin vasıtasıyla Ters Faz TLC	Ninhidrin ve İyodür buharı
TLC	D,L-Penisilin	Kiral reaktifler olarak (R)-Mandelik asit ve L-tartarik asit ve hareketli faz ilavesi	İyodür buharı
HPLC	Serbest amino asitler	Alkaloid türevli zwitter ionlu kiral sabit faz	DAD
HPLC	Doymamış β 2-Amino asitler	Kiral sabit faz olarak 11-methylene-birimleri içeren aminoundesil silica jel bağlı (+)-(18-krawn-6)-2,3,11,12-tetrakarboksilik asit	UV-205 nm
HPLC	Proteinojenik amino asitler	6-Metoksikinolin-4-karboksilik asit-susinit ester, anyon dönüştürücü kiral sabit faz	MS
LE-HPLC	D,L-Methiyonin, D,L-Lözin, D,L-Valin ve D,L-Tirozin	Copper (II) complex of N,N-dimetil-L-fenilalaninin Cu(II) kompleksi	UV-PDA
HPLC	β 2-Amino asitler	Kiral sabit faz içeren kinin ya da – kinolin bazlı zwitter iyon selektör	UV
HPLC	D,L-Penicilamin ve D,L-Sistein	α -Asit glikoprotein ve β -siklodekstrin kolonları	UV-231 nm
HPLC	γ -Aminoasitler	(+)-(18-krawn-6)-2,3,11,12-tetrakarboksilik asit bazlı kiral sabit faz	UV-210 nm
HPLC	N-Florenilmetoksikarbonil α -amino asit	Polisakkarid türevli kiral sabit fazlar	DAD
HPLC	β 3-Homo-amino asit	(+)-(18-krawn-6)-2,3,11,12-tetrakarboksilik asit bazlı kiral sabit faz	UV-210 nm
HPLC	Dansil amino asitler	Siklik heksapeptid, kiral selektör olarak	
HPLC	β -Amino asitler	(+)-(18-krawn-6)-2,3,11,12-tetrakarboksilik asit bazlı kiral sabit faz	
HPLC	N-(3,5-Dinitrobenzoil)- α -amino asitler	(+)-(18-krawn-6)-2,3,11,12-tetrakarboksilik asit bazlı kiral sabit faz	

HPLC	Amino asitler	NBD-Cl ve FDAA türevli kiral sabit faz	UV-470 nm
Mikro-HPLC	Doymuş ve Doymamış Amino asitler	Ristoketin A-bazlı kiral sabit faz	
HPLC	Dansil Amino asitler	Norvankomsin bağlı kiral sabit faz	
GC-MS	Serebrospinal sıvısındaki serin ve glisin enantiyomerleri	L-Valin, kiral selektör	MS
GC	D-Amino asit analizleri	vankomsin-modifiyeli silica–diol partikül dolgulu Flöresan izosiyanat türevli kapiler kolon	UV-205 nm
GLEC	α -Amino asitler	Cu(II) iyonlarıyla birlikte kompleksleşmiş alkoloid türevleri, kiral selektör olarak	DAD
CE	Amino asitler	(FITC)	LIF
CLE-CE	Dansil Amino asitler	γ -Cyclodekstrin (γ -kiral türevli)	UV
CLE-CE	Amino asitler ve glisil dipeptidler	Şeker asitleriyle Cu(II), Co(II), Ni(II) ve Zn(II) kompleksleri, kiral selektör olarak	DAD
LE-CE	Dansil Amino Asitler	Dansyl amino asitlerin Cu(II) l-prolinamit kompleksi, kiral selektör olarak	
CE-MS	Serbest Amino asitler	Siklodekstrin, kiral selektör	MS
LE-MEKC	Serbest Amino asitler	Cu (II)-L-prolin, kiral selektör	
CE-MS	Amino asitler	Teikoplanin üzerinde 7-Flor-4-nitrobenzodiazol (NBD-F) ve 1-flor-2,4-dinitrobenzen (DNB-F) kiral sabit fazı	MS
EKC	Dns-Amino asitler	γ -siklo dekstrin	MS
Kolon Kromatog rafisi	α -Amino asitler	Ksantan yapılı reçine üzerinde metilmetakrilat dolgulu kiral sabit faz	Polarimetre

6. KAYNAKLAR

- [1] Sakairi N, Tano C, Son SH, Furukawa J, Furuike T. Enantiomeric separation by MEKC using dodecyl thioglycoside surfactants: importance of an equatorially oriented hydroxy group at C-2 position in separation of dansylated amino acids. *Electrophoresis* 30:2743–2746, (2009).
- [2] Kumar AP., Park JH. Chiral separation of basic compounds on a cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate-coated zirconia monolithic basic eluents by capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 1218:6548–6553, (2011)
- [3] Yang J, Hage DS. Characterization of the binding and chiral separation of D- and L-tryptophan on a high-performance immobilized human serum albumin column. *J Chromatogr A* 645:241–250, 1993.
- [4] W.A. König, *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*, Hiithig Verlag, Heidelberg, 1989.
- [5] W.A. König, *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*, Hüthig Verlag, Heidelberg, 1989.
- [6] D.R. Taylor and K. Maher, *J. Chromatogr. Sci.*, 30 (1992) 67.
- [7] R. Rosset, M. Caude and A. Jardy, *Chromatographies en Phases Liquide et Supercritique*, Masson, Paris, France, 1991, ch. XVI, pp. 555-631.
- [8] A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, 1989.
- [9] L. Siret, N. Bargmann-Leyder, A. Tambute and M. Caude, *Analisis*, 20 (1992) 427.
- [10] N. Bargmann, A. Tambute and M. Caude, *Analisis*, 20 (1992) 189.
- [11] E. Gassmann, J.E. Kuo and R.N. Zare, *Science*, 230 (1985) 813.
- [12] P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelsen and R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 44.
- [13] J. Snopek, I. Jelinek and E. Smolkov~i-Keulemansovrl, *J. Chromatogr.*, 609 (1992) 1.

- [14] R. Kuhn and S. Hoffstetter-Kuhn, *Chromatographia*, 34 (9/10) (1992) 505.
- [15] I.E. Valko, H.A.H. Billiet, H.A.L. Corstjens and J. Frank, *LC. GC Int.*, 6 (7) (1993) 420.
- [16] H. Nishi and S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 694 (1995) 245.
- [17] F. Lelièvre, P. Gareil and M. Caude, *Analysis*, 22 (1994) 413.
- [18] S. Ahuja, *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, 1991, Chapter 1.
- [19] D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis* 2000, 4136-4158, Review.
- [20] S. Mayer and V. Schurig, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15 (1992) 129.
- [21] S. Mayer and V. Schurig, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (4) (1993) 915.
- [22] S. Mayer and V. Schurig, *Electrophoresis*, 15 (1994) 835.
- [23] S. Mayer, M. Schleimer and V. Schurig, *J. Microcolumn Sep.*, 6 (1994) 43.
- [24] D.W. Armstrong, Y. Tang, T. Ward and M. Nichols, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1114.
- [25] S. Li and D.K. Lloyd, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3684.
- [26] S. Li and D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 321.
- [27] F. Svec, Y. Lv, *Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography*, *Anal. Chem.* 87 (2015) 250–273.
- [28] Z.A. Al-Othman, A. Al-Warthan, I. Ali, *Advances in enantiomeric resolution on monolithic chiral stationary phases in liquid chromatography and electrochromatography*, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1033–1057.
- [29] M. Lämmerhofer, A. Gargano, *Monoliths with chiral surface functionalization for enantioselective capillary electrochromatography*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1091–1123.
- [30] D. Wistuba, *Chiral silica-based monoliths in chromatography and capillary electrochromatography*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 941–952.
- [31] Cabrera, K., *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) (747)

- [32] Ansell RJ. Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(12):1809–35.
- [33] Yanez F, Chianella I, Piletsky SA, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts. *Anal Chim Acta.* 2010;659(1/2):178–85.
- [34] Nilsson, K., Lindell, J., Norrlöw, O., Sellergen, B., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 57-61
- [35] Schweitz, L., Andersson, L. I., Nilsson, S., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1179-1183.
- [36] Brüggeman, O., Freitag, R., Whitcombe, M. J., Wulfson, E. N., *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 43-53
- [37] Tan, J.Z., Remcho, V. T., *Electrophoresis* 1998, 19, 2055-2060.
- [38] Schwitz, L., Spegel, P., Nilsson, S., *Analyst* 2000, 125, 1899-1901.
- [39] Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:636–43.
- [40] Porath J. From gel filtration to adsorptive size exclusion. *J Protein Chem* 1997;16:463–8.
- [41] Harris DC. *Exploring chemical analysis.* 3rd ed, WH. Freeman & Co 2004.
- [42] Gerberding SJ, Byers CH. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *J Chromatogr A* 1998;808:141–51.
- [43] Donald PL, Lampman GM, Kritz GS, Engel RG. *Introduction to Organic Laboratory Techniques* (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole 2006. p. 797–817.
- [44] Laurence M. Harwood, Christopher J. Moody. *Experimental organic chemistry: Principles and Practice.* Wiley, John & Sons, Incorporated 1989. p. 180–5.
- [45] Das M, Dasgupta D. Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase. *Prep Biochem Biotechnol* 1998;28:339–48.

- [46] Karlsson E, Ryden L, Brewer J. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications, 2nd Edition, Ion Exchange chromatography. Wiley-VCH, New York;1998.
- [47] Amercham Biosciences, Ion Exchange chromatohgraphy, Principles and methods, Amercham Pharmacia. Biotech, SE 751;2002.
- [48] Walls D, Sinéad T. Loughran. Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.vol. 681;2011.
- [49] Helmut D. Gel Chromatography, Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves. A laboratory Hand book, Springer-Verlag;1969.
- [50] Determann H. Gel Chromatography Gel Filtration· Gel Permeation· Molecular Sieves: A Laboratory Handbook Chapter 2. Materyals and Methods; 2012.
- [51] Wilchek M, Chaiken I. An overview of affinity chromatography in affinity chromatography–Methods and protocols. Humana Press 2000. p. 1–6.
- [52] Firer MA. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods 2001;49:433–42.
- [53] Stoddard JM, Nguyen L, Mata-Chavez H, Nguyen K. TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions. Chem Commun (Camb) 2007;12:1240–1.
- [54] Gündüz, T., İnstrümental Analiz, Gazi Kitapevi, 6. Baskı, Ankara, 2002
- [55] Donald PL, Lampman GM, Kritz GS, Randall G. Engel Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole 2006. p. 797–817.
- [56] Anonim, http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html. (Kasım, 2017)w
- [57] Amicon, Dye-ligand chromatography. Applications method. Theory of matrix gel media, Amicon Division, N.R. Grace&Company- Conn. 24 Cherry Hill Drive, MA 01923;1989.

- [58] Scopes RK. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis*. *Anal Biochem* 1984;136:525–9.
- [59] Cutler P. *Methods in molecular biology, Dye-ligand affinity chromatography*, Second Edition. Humana Press 2004.
- [60] Mahn A, Asenjo JA. Prediction of protein retention in hydrophobic interaction Chromatography. *Biotechnol Adv* 2005;23:359–68.
- [61] Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JM. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol* 2001;87:143–59.
- [62] Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 1992;3:263–81.
- [63] Regnier FE. High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science* 1983. p. 245–52.
- [64] Gündüz, T., *Kromatografi ve Elektroforez*, Gazi Kitabevi, 2015.
- [65] Kunkel, H.G. Tselius, A. Electrophoresis of proteins on filter paper *The Journal of general physiology*. 35, 89-118, 1951
- [66] Aydoğan, C., *Hidrofilik etkileşim kromatografisi ve ters faz sıvı kromatografisi için yeni polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonların hazırlanması, karakterizasyonu ve biyokromatografide kullanımı*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013
- [67] Bartle, K.D., Myers, P., Theory of capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 916, 3-23, 2001.]
- [68] Y, Chao., W. Yan., Y, Xue., *Capillary Electrochromatography*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006–2016 JohnWiley & Sons, Ltd.
- [69] Cikaló, 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.
- [70] Grant, I.H., *Capillary electrochromatography*, *Methods in Molecular Biology* 52, 197-209, 1996.

- [71] Knox, J.H., Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems, *Journal of Chromatography A*, 680, 3-13, 1994.
- [72] Denizli, A., Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, 2. Baskı, ISBN:978-605-64274-4-2, 2014.
- [73] Cikaloa, G.M., Keith, D.B., Mark, M.R., Myersa, P., Melvin, R.E., *Analyst*, 123 (1998) 87R.
- [74] Engelke, J.L., Strain, H.H., Electrical mobility of phosphate ions in paper electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 26, 1872-1874, 1954.
- [75] Shepard, C., Tiselius, A., *Discuss. Faraday Soc.*, 7 (1949) 285.
- [76] Pretorius, V., Hopkins, B.J., Schieke, J.D., *J. Chromatogr. A.*, 99 (1974) 30.
- [77] Jorgensen, J.W. ve Lukacs, K.D., *J. Chromatogr. A.*, 218 (1981) 216.
- [78] T. Tsuda, 'Electrochromatography Using High Applied Voltage', *Anal. Chem.*, 59, 521–523 (1987)..
- [79] J.H. Knox, 'Thermal Effects and Band Spreading in Capillary Electro-Separation', *Chromatographia*, 26, 329–337 (1988).
- [80] Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Frechet, J.M., *Anal.Chem.*, 69 (1997) 3649.
- [81] Smith N.W., Evans M.B., The analysis of pharmaceutical compounds using electrochromatography, *Chromatographia*, 38, 649-657, 1994.
- [82] 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.
- [83] K. Mistry, I. Krull, N. Grinberg, 'Capillary Electrochromatography: An Alternative to HPLC and CE', *J. Sep. Sci.*, 25, 935–958 (2002).
- [84] F. Steiner, B. Scherer, 'Instrumentation for Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 887, 55–83 (2000).
- [85] C. Yan, *Contemporary Microscale Separation Technology*, HNB Publishing, New York, 2013.

- [86] 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.
- [87] Jiskra, J., Claessens, H.A., Cramers, C.A., Stationary and mobile phases in capillary electrochromatography (CEC), *Journal of Separation Science*, 26, 1305-1330, 2003.
- [88] Xie, R., Oleschuk, R., Photoinduced polymerization for entrapping octadecylsilane microsphere columns for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 79, 1529-1535, 2007.
- [89] Enlund, A.M., Hagman, G., Isaksson, R., Westerlund, D., *Trends in Anal. Chem.*, 21 (2002) 412.
- [90] Euerby, M.R., Johnson, C.M., Bartle, K.D., *LC-GC Int.*, 11 (1938) 39.
- [91] Maruska, A., Pyell, U., *Chromatographia*, 45 (1997) 229.
- [92] Lane, S.J., Boughtflower, R., Paterson, C., Morris, M., *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 10 (1996) 733.
- [93] Euerby, M.R., Gilligan, D., Johnson, C.M., Bartle, K.D., *Analyst*, 122 (1927) 1087.
- [94] Lelievre, F., Yan, C., Zare, R.N., Gareil, P., *J.Chromatogr. A.*, 723 (1996) 145.
- [95] Lane, S.J., Boughtflower, R., Paterson, C., Underwood, T., *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 9 (1995) 1283.
- [96] Schmeer, K., Behnke, B., Bayer, E., *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3656.
- [97] Euerby, M.R., Gilligan, D., Johnson, C.M., Roulin, S.C.P., Myers, P., Bartle, K.D., *J. Microcol. Sep.*, 9 (1997) 373.
- [98] Dittman, M.M., Rozing, G.P., *J. Chromatogr. A* (1996) 744; 63-74.
- [99] A.M. Enlund, G. Hagman, R. Isaksson, D. Westerlund, 'Capillary Electrochromatography of Basic Compounds in Pharmaceutical Analysis', *Trend. Anal. Chem.*, 21, 412–427 (2002).

- [100] C.H. Hsu, Y.J. Cheng, B. Singco, H.Y. Huang, 'Analyses of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs by On-Line Concentration Capillary Electrochromatography Using Poly(Stearyl Methacrylate-Divinylbenzene) Monolithic Columns', *J. Chromatogr. A*, 1218, 350–358 (2011).
- [101] S.Kositarat, N.W. Smith, D. Nacapricha, P. Wilairat, P. Chaisuwan, 'Repeatability in Column Preparation of a Reversed-Phase C18 Monolith and Its Application to Separation of Tocopherol Homologues', *Talanta*, 84, 1374–1378 (2011).
- [102] Y. Lu, H.Wang, Y. Xue, X. Gu, Y.Wang, C. Yan, 'Preparation and Evaluation of Monodispersed, Submicron, Non- Porous Silica Particles Functionalized with -Cd Derivatives for Chiral-Pressurized Capillary Electrochromatography', *Electrophoresis*, 36, 2120–2127 (2015).
- [103] R. Auditore, N.A. Santagati, Z. Aturki, S. Fanali, 'Enantiomeric Separation of Amlodipine and Its Two Chiral Impurities by Nano-Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography Using a Chiral Stationary Phase Based on Cellulose Tris(4-Chloro-3- Methylphenylcarbamate)', *Electrophoresis*, 34, 2593–2600 (2013).
- [104] C. Pan, W. Wang, H. Zhang, L. Xu, X. Chen, 'In Situ Synthesis of Homochiral Metal-Organic Framework in Capillary Column for Capillary Electrochromatography Enantioseparation', *J. Chromatogr. A*, 1388, 207–216 (2015).
- [105] J.Wang, I. Tanret, D. Mangelings, G. Fan, Y.Wu, Y. Vander Heyden, 'Fingerprint Development for Ginkgo Biloba Extracts by Pressurized Capillary Electrochromatography: Comparison of Column Types', *J. Chromatogr. Sci.*, 48, 428–435 (2010).
- [106] Y. Wu, Y. Wang, X. Gu, L. Zhang, C. Yan, 'Two- Dimensional Strong Cation-Exchange Liquid Chromatography/Reversed-Phase Pressurized Capillary Electrochromatography for Separation of Complex Samples', *J. Sep. Sci.*, 34, 1027–1034 (2011).
- [107] Gucek, M., Pilar, B., *Chromatographia*, 51 (2000) 139.

- [108] Suzuki, S., Kuwahara, Y., Makiura, K., Honoda, S., J. Chromatogr A., 873 (2000) 247
- [109] Guo, W., Koropchak, J., Yan, C., J. Chromatogr A., 849 (1999) 587.
- [110] X. Xiao, W. Wang, J. Chen, L. Jia, 'Polydopamine-Coated Open Tubular Column for the Separation of Proteins by Capillary Electrochromatography', J. Sep. Sci., 38, 2893–2899 (2015).
- [111] F. Ali, W.J. Cheong, 'Open Tubular Capillary Column for the Separation Of Cytochrome C Tryptic Digest in Capillary Electrochromatography', J. Sep. Sci., 38, 3645–3654 (2015).
- [112] M. Hamer, A. Yone, I. Rezzano, 'Gold Nanoparticle- Coated Capillaries for Protein and Peptide Analysis on Open-Tubular Capillary Electrochromatography', Electrophoresis, 33, 334–339 (2012).
- [113] Pesek, J.J., Matyska M.T., Salgatora, V., Electrophoresis, 29 (2008) 3842.
- [114] Chartova, J., Kral, V., Deyl, Z., J. Chromatogr B., 770 (2002) 155.
- [115] Chartova, J., Kral, V., Deyl, Z., J. Chromatogr B., 770 (2002) 165.
- [116] Walhagen, K., Unger, K.K., Hearn, M.T., Anal. Chem. 73 (2001) 4924.
- [117] Choudhary, G., Horvath, C., J. Chromatogr. A., 781 (1197) 161.
- [118] Ericson, C., Hjerten S., Anal Chem. 71 (1999) 1621.
- [119] Gusev, I., Horvat, C., J. Chromatogr A., 855 (1999) 273.
- [120] Wu, R., Zu, H., Ye, M., Lei, Z., Anal Chem., 73 (2001) 4918.
- [121] Dulay, M., Quirino, J., Bennet, B., B., Zare, R. J. Sep. Sci., 25 (2002) 3.
- [122] L. Xu, P.F. Cui, D.M. Wang, C. Tang, L.Y. Dong, C. Zhang, H.Q. Duan, V.C. Yang, 'Preparation and Characterization of Lysine-Immobilized Poly(GlycidylMethacrylate) Nanoparticle-Coated Capillary for the Separation of Amino Acids by Open Tubular Capillary Electrochromatography', J. Chromatogr. A, 1323, 179–183 (2014).
- [123] Aydoğan, C., Denizli, A., Analyst, 138 (2013) 2118.

- [124] Aydoğan, C., Yılmaz, F., Çimen, D., Uzun, L., Denizli, A., *Electrophoresis*, 34 (2013) 1908.
- [125] Aydoğan, C., Denizli, A., *Chirality*, 24 (2012) 606.
- [126] Aydoğan, C., Denizli, A., *Anal. Biochem.*, 447, (2014) 55.
- [127] R. Jang, K.H. Kim, S.A. Zaidi, W.J. Cheong, M.H. Moon, 'Analysis of Phospholipids Using an Open-Tubular Capillary Column with a Monolithic Layer of Molecularly Imprinted Polymer in Capillary Electrochromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry', *Electrophoresis*, 32, 2167–2173 (2011).
- [128] G.X. Xie, M.M. Su, P. Li, X. Gu, C. Yan, Y.P. Qiu, H.K. Li, W. Jia, 'Analysis of Urinary Metabolites for Metabolomic Study by Pressurized CEC', *Electrophoresis*, 28, 4459–4468 (2007).
- [129] H.P. Zhang, Y. Wang, X. Gu, J.Y. Zhou, C. Yan, 'Metabolomic Profiling of Human Plasma in Pancreatic Cancer Using Pressurized Capillary Electrochromatography', *Electrophoresis*, 32, 340–347 (2011).
- [130] Q.Wu, X. Yu, Y.Wang, X. Gu, X. Ma, W. Lv, Z. Chen, C. Yan, 'Pressurized CEC Coupled with Qtof-Ms for Urinary Metabolomics', *Electrophoresis*, 35, 2470–2478 (2014).
- [131] Huber, C., Choudhary, G., Horvath, C., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4429.
- [132] Euerby, M.R., Gilligan, D., Johnson, C.M., Roulin, S.C.P., Myers, P., Bartle, K.D., *Chromatographia* (1998) 47; 135-140.
- [133] Taylor, M.R., Teale, P., *J. Chromatogr. A* (1997), 768, 89-95.
- [134] C. Aydoğan, K. Cetin, A. Denizli, 'Novel Tentacle-Type Polymer Stationary Phase Grafted with Anion Exchange Polymer Chains for Open Tubular CEC of Nucleosides and Proteins', *Analyst*, 139, 3790–3795 (2014).
- [135] Helboe, T., Hansen, S., *J. Chromatogr. A.*, 836 (1999) 315.
- [136] Zhang, M., Yang, C., El Rassi, Z., *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3277.
- [137] Mesplet, M., Norin, P., Francois, C., Agrofoglio, L., *J. Chromatogr. A.*, 927 (2001) 161.

- [138] V. Garcia-Canas, C. Simo, M. Castro-Puyana, A. Cifuentes, 'Recent Advances in the Application of Capillary Electromigration Methods for Food Analysis and Foodomics', *Electrophoresis*, 35, 147–169 (2014).
- [139] Y.J. Cheng, S.H. Huang, B. Singco, H.Y. Huang, 'Analyses of Sulfonamide Antibiotics in Meat Samples by On-Line Concentration Capillary Electrochromatography-Mass Spectrometry', *J. Chromatogr. A*, 1218, 7640–7647 (2011).
- [140] H.Y. Huang, C.L. Lin, S.H. Jiang, B. Singco, Y.J. Cheng, 'Capillary Electrochromatography-Mass Spectrometry Determination of Melamine and Related Triazine by-Products Using Poly(Divinyl Benzene-Alkene-Vinylbenzyl Trimethylammonium Chloride) Monolithic Stationary Phases', *Anal. Chim. Acta*, 719, 96–103 (2012).
- [141] Y. Zhang, X. Tian, Y. Guo, H. Li, A. Yu, Z. Deng, B.B. Sun, S. Zhang, 'Analysis of Nitrites and Nitrates in Hams and Sausages by Open-Tubular Capillary Electrochromatography with a Nanolatex-Coated Capillary Column', *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3400–3404 (2014).
- [142] C. Aydogan, V. Karakoc, A. Denizli, 'Chiral Ligand- Exchange Separation and Determination of Malic Acid Enantiomers in Apple Juice by Open-Tubular Capillary Electrochromatography', *Food Chem.*, 187, 130–134 (2015).
- [143] X.K. Ouyang, Y.Y. Luo, Z.S. Wen, W.J. Wu, G.Z. Cao, X.Y. Zhu, L.Y. Yang, Y.G. Wang, J.Y. Dong, 'Simultaneous Determination of Flumequine and Oxolinic Acid Residues in Aquatic Products Using Pressurized Capillary Electrochromatography', *Food Anal. Method.*, 7, 1770–1775 (2014).
- [144] T. Zhao, Q. Wang, J. Li, X. Qiao, Z. Xu, 'Study on an Electrochromatography Method Based on Organic–inorganic Hybrid Molecularly Imprinted Monolith for Determination of Trace Trichlorfon in Vegetables', *J. Sci. Food Agric.*, 94, 1974–1980 (2014).
- [145] Dittman, M.M., Rozing, G.P., *J. Microcool. Sep.*, 9 (1997) 399.
- [146] A. Salwinski, R. Delepee, 'Comparison of Monolithic Capillary Electrochromatography and Micellar Electrokinetic Chromatography for the

- Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons', *Talanta*, 122, 180–186 (2014).
- [147] J. Zhang, T. Bao, Z. Chen, 'Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Sma-Egdma Polymeric Monolith Column by Capillary Electrochromatography', *Anal. Methods*, 4, 4140–4145 (2012).
- [148] V. Perez-Fernandez, E. Dominguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L. Crego, M. Angeles Garcia, M. Luisa Marina, 'Evaluation of New Cellulose-Based Chiral Stationary Phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the Enantiomeric Separation of Pesticides by Nano Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1234, 22–31 (2012).
- [149] W. Wu, Y. Wu, M. Zheng, L. Yang, X. Wu, X. Lin, Z. Xie, 'Pressurized Capillary Electrochromatography with Indirect Amperometric Detection for Analysis of Organophosphorus Pesticide Residues', *Analyst*, 135, 2150–2156 (2010).
- [150] W. Wu, X. Yuan, X. Wu, X. Lin, Z. Xie, 'Analysis of Phenolic Xenoestrogens by Pressurized Cec with Amperometric Detection', *Electrophoresis*, 31, 1011–1018 (2010).
- [151] M. Bahatibieke, Y. Xue, Y.Wang, Y.Wang, C. Yan, 'Pressurized Capillary Electrochromatography for Analysis of Tetracyclines Insecticides in Egg', *Chin. J. Antibiot.*, 36, 536–539, 561 (2011).
- [152] Ross, G., Dittmann, M., Bek, F., Rozing, G., *Am. Lab.*, 28 (1996) 34.
- [153] Aydoğan, C., Tuncel, A., Denizli., *J. Sep. Sci.*, 35 (2012) 1010.
- [154] Iijima, S., *Nature*, 354 (1991) 56.
- [155] Pauwels, J., Schepdael, V., *Cent. Eur., J. Chem.*, 10 (2012) 785.
- [156] Li, Y., Chen, Y., Xiang, R., Ciuparu, D., Pfefferle, LD., Horvath, C, Wilkins, J.A., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1398.
- [157] Luong, J.H.T., Bouvrette, P., Liu, Y., Yang, D., Sacher, E., *J.Chromatogr. A.*, 1074 (2005) 187.

- [158] Jimenez-Soto, J.M., Moliner-Martinez, Y., Cardenas, S., Valcarcel, M., Electrophoresis, 31 (2010) 2242.
- [159] Stege, P.Q., Sombra, L.L., Messina, G., Martinez, Y., L.D., Silva, M.F., Electrophoresis, 31 (2010) 2242.
- [160] Chen, J.L., Lu, T.L., Lin, Y.C., Electrophoresis, 31 (2010) 3217.
- [161] Chen, J.L., Hsieh, K.H., Electrophoresis, 31 (2010) 3937.
- [162] J.H. Knox, I.H. Grant, 'Electrochromatography in Packed Tubes Using 1.5 to 50 Silica Gels and Ods Bonded Silica Gels', Chromatographia, 32, 317–388 (1991).
- [163] Z. Deyl, F. Švec, Capillary Electrochromatography, Elsevier, Amsterdam–London–New York–Oxford–Paris– Shannon–Tokyo, 2001.
- [164] Chen, J.L., Lin, Y.C., Electrophoresis, 31 (2010) 3949.
- [165] Fu, H., Huang, X., Jin, W., Zou., H., Current Opinion in Biotechnol., 14 (2003) 96.
- [166] Rocco, A., Marusca, A., Fanali, S., Enantioseparations by nano liquidchromatography, Journal of Separation Science 36, 421-444, 2013.
- [167] Gritti, F., Guiochon, G., Heterogeneity of the adsorption mechanism of low molecular weight compounds in reversed-phase liquid chromatography Analytical Chemistry 78, 5823 – 5834, 2006.
- [168] Guiochon, G., Foreword, Journal of Chromatography A 1142 (1 SPEC. ISS.) , pp. 1, 2007.
- [169] Dionex Co. (Sunnyvale, CA, USA) under the trade name ProSwift.
- [170] Colin, H., Schmitter, J.M., Guiochon, G., Liquid chromatography of azarenes. Analytical Chemistry 53, 625 – 631, 1981.
- [171] Guiochon, G., Comparison of the theoretical limits of separating speed in liquid and gas chromatography Analytical Chemistry 52, 2002-2008, 1980.
- [172] Guiochon, G., Conventional packed columns vs. packed or open tubular microcolumns in liquid chromatography Analytical Chemistry 51, 1318-1325, 1981.

- [173] Kimata, K., Hosoya, K., Araki, T., Tanaka, N. [2-(1-pyrenyl)ethyl]silyl silica packing material for liquid chromatographic separation of fullerenes. *Journal of Organic Chemistry* 58, 282-283, 1993.
- [174] Nakanishi, K., Minakuchi, H., Soga, N., Tanaka, N. Structure Design of Double-Pore Silica and Its Application to HPLC. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 13, 163-169, 1999.
- [175] Go, H., Sudo, Y., Hosoya, K., Ikegami, T., Tanaka, N. Effects of Mobile-Phase Composition and Temperature on the Selectivity of Poly(N-isopropylacrylamide)-Bonded Silica Gel in Reversed-Phase Liquid Chromatography *Analytical Chemistry* 70, 4086-4093, 1998.
- [176] Svec, F., Frechet, J.M.J., Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis *Chemistry of Materials* 184, 707-715, 1995.
- [177] Svec, F., Frechet, J.M.J., Continuous rods of macroporous polymer as high performance liquid separation media,. *Analytical Chemistry* 64, 820, 1992.
- [178] Unger, Lamotte, S., K.K., Machtejevas, E., *Column Technology in Liquid Chromatography Chapter 3*, Merk KGaA Darmstadt, Germany. 2012.
- [179] W. Li, D.P. Fries, A. Malik, 'Sol–Gel Stationary Phases for Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1044, 23–52 (2004).
- [180] 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.
- [181] 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.
- [182] 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.

- [183] 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.
- [184] 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.
- [185] 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.
- [186] Behnke, B., Johansson, J., Bayer, E., Nilsson, S., Fluorescence imaging of frit effects in capillary separations, *Electrophoresis*, 21, 3102-3108, 2000.
- [187] 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.
- [188] 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.
- [189] 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.
- [190] W.J. Cheong, F. Ali, Y.S. Kim, J.W. Lee, 'Comprehensive Overview of Recent Preparation and Application Trends of Various Open Tubular Capillary Columns in Separation Science', *J. Chromatogr. A*, 1308, 1-24 (2013).

- [191] F.I. Onuska, M.E. Comba, T. Bistricki, R.J. Wilkinson, 'Preparation of Surface-Modified Wide-Bore Wall-Coated Open-Tubular Columns', *J. Chromatogr.*, 142, 117–125 (1977).
- [192] X. Liu, X. Liu, M. Li, L. Guo, L. Yang, 'Application of Graphene as the Stationary Phase for Open-Tubular Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1277, 93–97 (2013).
- [193] H. Liu, X. Li, L. Huang, L. Zhang, W. Zhang, 'An Open Tubular Capillary Electrochromatography Column with Porous Inner Surface for Protein Separation', *Anal. Biochem.*, 442, 186–188 (2013).
- [194] T. Li, Y. Xu, Y.Q. Feng, 'Open Tubular Capillary Electrochromatographic Separation of Proteins and Peptides Using a TiO₂ Nanoparticle-Deposited Capillary by Liquid Phase Deposition', *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 32, 2484–2498 (2009).
- [195] L. Xu, P.F. Cui, D.M. Wang, C. Tang, L.Y. Dong, C. Zhang, H.Q. Duan, V.C. Yang, 'Preparation and Characterization of Lysine-Immobilized Poly(Glycidyl Methacrylate) Nanoparticle-Coated Capillary for the Separation of Amino Acids by Open Tubular Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1323, 179–183 (2014).
- [196] Unger K.K, Skudas R, Schulte M. Particle packed columns and monolithic columns in HPLC e a comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A* 1184, 393. 2008.
- [197] C.J. Chen, C.H. Chang, G.R. Her, 'Use of a Fritless Dual Tapered Column and a Low Flow Interface for Capillary Electrochromatography-Mass Spectrometry', *J. Chromatogr. A*, 1159, 22–27 (2007).
- [198] J. Gwon, J. Jin, C.V. Mcneff, J.H. Park, 'Cellulose Dimethylphenylcarbamate-Immobilized Zirconia for Chiral Separation in Reversed-Phase CEC', *Electrophoresis*, 30, 3846–3854 (2009).
- [199] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H.F. Zhang, 'Core-Shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography', *J. Chromatogr. A*, 1357, 36–52 (2014).

- [200] S. Fanali, G. D'orazio, T. Farkas, B. Chankvetadze, 'Comparative Performance of Capillary Columns Made with Totally Porous and Core-Shell Particles Coated with a Polysaccharide-Based Chiral Selector in Nano-Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1269, 136–142 (2012).
- [201] H. Zhang, M.J. Wirth, 'Electromigration of Single Molecules of DNA in a Crystalline Array of 300 nm Silica Colloids', *Anal. Chem.*, 77, 1237–1242 (2005).
- [202] S.P. Zheng, E. Ross, M.A. Legg, M.J. Wirth, 'High-Speed Electroseparations inside Silica Colloidal Crystals', *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 9016–9017 (2006).
- [203] B.C. Wei, D.S. Malkin, M.J. Wirth, 'Plate Heights Below 50 nm for Protein Electrochromatography Using Silica Colloidal Crystals', *Anal. Chem.*, 82, 10216–10221 (2010).
- [204] Huck, C.W., Stecher, G., Bakry, R., Bonn, G.K., Recent progress in high-performance capillary bioseparations. *Electrophoresis*, 24, 3977-3987, 2003.
- [205] Svec F., Peters E.C., Sykora D., Frechet J.M.J., 2000, Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 887, 3-29.
- [206] D. Allen, Z. El Rassi, 'Silica-Based Monoliths for Capillary Electrochromatography: Methods of Fabrication and Their Applications in Analytical Separations', *Electrophoresis*, 24, 3962–3976 (2003).
- [207] E.F. Hilder, F. Svec, J.M. Fréchet, 'Development and Application of Polymeric Monolithic Stationary Phases for Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1044, 3–22 (2004).
- [208] K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, P. Coufal, 'Monolithic Organic Polymeric Columns for Capillary Liquid Chromatography and Electrochromatography', *J. Chromatogr. B*, 841, 79–87 (2006).

- [209] F. Ye, S. Wang, S. Zhao, 'Preparation and Characterization of Mixed-Mode Monolithic Silica Column for Capillary Electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1216, 8845–8850, (2009).
- [210] M.H. Wu, R.A. Wu, Z.B. Zhang, H.F. Zou, 'Preparation and Application of Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary Columns', *Electrophoresis*, 32, 105–115 (2011).
- [211] G.Z. Fang, H.L. Qian, Q.L. Deng, X.Q. Ran, Y.K. Yang, C.C. Liu, S.Wang, 'A Novel C18 Reversed Phase Organic- Silica Hybrid Cationic Monolithic Capillary Column with an Ionic Liquid as an Organic Monomer Via a "One-Pot" Approach for Capillary Electrochromatography', *RSC Adv.*, 4, 15518–15525 (2014).
- [212] R.H. Yan, Y. Gao, X.C. Wang, X.H. Zhang, C. Yan, Y. Wang, 'Selectivity Tuning in Pressurized Capillary Electrochromatography with a Zwitterionic Monolithic Column', *J. Chromatogr. Sci.*, 51, 468–470 (2013).
- [213] J.Y. Lu, F.G. Ye, A.Z. Zhang, X. Chen, Y. Wei, S.L. Zhao, 'Preparation and Evaluation of Ionic Liquid-Gold Nanoparticles Functionalized Silica Monolithic Column for Capillary Electrochromatography', *Analyst*, 137, 5860–5865 (2012).
- [214] F. Svec, 'Recent Developments in the Field of Monolithic Stationary Phases for Capillary Electrochromatography', *J. Sep. Sci.*, 28, 729–745 (2005).
- [215] C. Legido-Quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W. Smith, 'Advances in Capillary Electrochromatography and Micro-High Performance Liquid Chromatography Monolithic Columns for Separation Science', *Electrophoresis*, 24, 917–944 (2003).
- [216] Z.B. Zhang, R.A. Wu, M.H. Wu, H.F. Zou, 'Recent Progress of Chiral Monolithic Stationary Phases in CEC and Capillary LC', *Electrophoresis*, 31, 1457–1466 (2010).
- [217] Wackerli, J., Lieberzeit, P.A., *Polymers, Molecularly Imprinted, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2016

- [218] [Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8, 461-473, 2012.
- [219] Mosbach, K. and Ramström, O. (1996) The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/Technol.*, 14, 163–170.
- [220] Zahedi, P., Ziaee, M., Abdouss, M., Farazin, A., and Mizaikoff, B. (2016) Biomacromolecule template-based molecularly imprinted polymers with an emphasis on their synthesis strategies: A review. *Polym. Adv. Technol.* DOI: 10.1002/ pat.3754
- [221] Haupt, K. Mosbach, K. (2000) Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.*, 100, 2495–2504.
- [222] Haupt, K. (2003) Molecularly imprinted polymers: The next generation. *Anal. Chem.*, 75, 376a–383a.
- [223] Mayes, A.G., Whitcombe, M.J. (2005) Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Adv. Drug Deliver Rev.*, 57, 1742–1778.
- [224] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J. (2006) Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit*, 19, 106–180.
- [225] Algieri, C., Drioli, E., Guzzo, L., Donato, L. (2014) Bio- Mimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Membranes. *Sensors*, 14, 13863–13912.
- [226] Andac, M., Denizli, A. (2014) Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. *RSC Adv.*, 4, 31130–31141.
- [227] Wan, W., Wagner, S., Rurack, K. (2016) Fluorescent monomers: “bricks” that make a molecularly imprinted polymer “bright”. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 1753- 1771.
- [228] Bedwell, T.S., Whitcombe, M.J. (2016) Analytical applications of MIPs in diagnostic assays: future perspectives. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 1735–1751.

- [229] Haupt, K., Mosbach, K. (2000) Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.*, 100, 2495–2504.
- [230] Pichon, V., Haupt, K. (2006) Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 29, 989–1023.
- [231] Martin-Esteban, A. (2016) Recent molecularly imprinted polymer- based sample preparation technique in environmental analysis. *TrEAC*, 9, 8–14.
- [232] Zhang, H.Q., Ye, L., Mosbach, K. Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *J. Mol. Recognit*, 19, 248–259, (2006).
- [233] Whitcombe, M.J., Chianella, I., Larcombe, L., Piletsky, S.A., Noble, J., Porter, R., and Horgan, A. (2011) The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. *Chem. Soc. Rev.*, 40, 1547–1571.
- [234] Yan, H.Y. and Row, K.H. (2006) Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *Int. J. Mol. Sci.*, 7, 155–178.
- [235] Wulff, G., Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem. Rev.*, 102, 1–27.(2002)
- [236] Dai, H., Xiao, D.L., He, H., Li, H., Yuan, D.H., and Zhang, C., Synthesis and analytical applications of molecularly imprinted polymers on the surface of carbon nanotubes: a review. *Microchim. Acta*, 182, (2015) 893–908.
- [237] Song, X.L., Xu, S.F., Chen, L.X., Wei, Y.Q., and Xiong, H. Recent Advances in Molecularly Imprinted Polymers in Food Analysis. *J. Appl. Polym. Sci.*, 131, 40766, (2014).
- [238] Sarafraz-Yazdi, A. and Razavi, N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 73, (2015) 81–90.
- [239] Zhang, H.Q., Ye, L., and Mosbach, K. Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *J. Mol. Recognit*, 19, 2006, 248–259.

- [240] Zheng, C., Huang, Y.P., and Liu, Z.S. Synthesis and theoretical study of molecularly imprinted monoliths for HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 2147–2161, 2013.
- [241] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., and Whitcombe, M.J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit*, 19, 106–180, 2006.
- [242] Tiwari, M.P. and Prasad, A. Molecularly imprinted polymer based enantioselective sensing devices: A review. *Anal. Chim. Acta*, 853, 1–18, 2015.
- [243] Mu, L.N., Wei, Z.H., and Liu, Z.S. (Current trends in the development of molecularly imprinted polymers in CEC. *Electrophoresis*, 36, 764–772, 2015.
- [244] Wackerlig, J. and Schirhagl, R. Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review. *Anal. Chem.*, 88, 250–261, 2016.
- [245] Schirhagl, R. Bioapplications for Molecularly Imprinted Polymers. *Analytical Chemistry*, 86, 250–261, 2014.
- [246] Alexander, C., Smith, C.R., Whitcombe, M.J., and Vulfson, E. N. Imprinted polymers as protecting groups for regioselective modification of polyfunctional substrates. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 6640–6651, 1999
- [247] Aydoğar, C. Yılmaz, F. Denizli A. Cation exchange/hydrophobic interaction monolithic chromatography of small molecules and proteins by nano liquid chromatography, *Journal of Separation Science* 36, 1685-1692, 2013.
- [248] Aydogan, C., Yılmaz, F., Cimen, D., Uzun, L., Denizli, A., *Electrophoresis* 2013, 34, 1908–1914.
- [249] S, Tanwar., Ravi Bhushan, Enantioresolution of Amino Acids: A Decade's Perspective, Prospects and Challenges, *Chromatographia* (2015) 78:1113–1134.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Koray ŞARKAYA
Doğum Yeri : Denizli
Doğum Yılı : 1986
Medeni Hal : Bekar
E-posta : koraysarkaya@hotmail.com
Adresi : Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü.
81620 Konuralp, Merkez / DÜZCE

Eğitim

Lise : Denizli Y.D.A. Lisesi
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya A.B.D.

Yabancı Dil ve Düzeyi : 71/ KPDS, Mayıs / 2009

Deneyim Alanları : Araştırma Görevlisi (2009-)/Düzce Üniversitesi



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:13/02/2018

Tez Başlığı / Konusu: **MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE CEC (KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFI) SİSTEMİNDE HİDROFOBİK AMİNO ASİT ENANTİYOMERLERİNİN AYRILMASI**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 174 sayfalık kısmına ilişkin, 13/02/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

13/02/2019

Adı Soyadı: Koray ŞARKAYA
Öğrenci No: N10246561
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)