

**KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFİ İÇİN  
NANOKROMATOĞRAFİK ÖLÇEKLİ MONOLİT TASARIMI,  
SENTEZİ VE KROMATOĞRAFİK UYGULAMALARI**

**THE DESIGN, SYNTHESIS AND CHROMATOGRAPHIC  
APPLICATIONS OF NANOCHROMATOGRAPHIC SCALE  
MONOLITHS FOR CAPILLARY  
ELECTROCHROMATOGRAPHY**

**HÜSNÜ ARDA YURTSEVER**

**Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.**

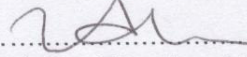
**2008**

*Furkan ve Eren'e Sevgilerimle*

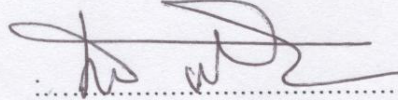
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Başkan

  
Prof. Dr. Zümriye AKSU

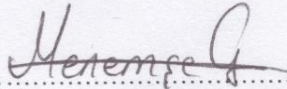
Üye (Birinci Danışman)

  
Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Üye (İkinci Danışman)

  
Prof. Dr. Süleyman PATIR

Üye

  
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye

  
Prof. Dr. Zakir RZAYEV

ONAY

Bu tez ...../...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. ....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFİ İÇİN NANOKROMATOĞRAFİK ÖLÇEKLİ MONOLİT TASARIMI, SENTEZİ VE KROMATOĞRAFİK UYGULAMALARI

HÜSNÜ ARDA YURTSEVER

## ÖZ

Tez çalışmasının amacı, nanokromatografik ölçekli yeni monolitik kolonların tasarımı, sentezi ve bu kolonların kromatografik performanslarının incelenmesi olarak belirlenmiştir. Öncelikle bütül metakrilat (BMA) bazlı monolitik kolonlar sentezlenmiştir. BMA bazlı monolit sentezi için yeni bir gözenek yapıcı sistemi önerilmiş ve termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu tekniği ile yeni kapiler monolitler elde edilmiştir. Ayrıca ilk kez flor (F) grubu içeren bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. F grubunun varlığı, organik bileşiklerin polaritesinde bir değişim meydana getirmektedir. Tez kapsamında F içeren monomer kullanımı ile sentezlenen monolitlerin kromatografik davranışları incelenmiş ve akrilik ve stiren bazlı monolitlere göre avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur. Flor içeren monomer olarak, 2,2,2-trifloroetil metakrilat (TFEM) seçilmiştir. Ayrıca tezin bu bölümünde monolitin kolon duvarına yapışması için kullanılan klasik yöntem yerine “Kolay bağlanma” (Click chemistry) bazlı yeni bir yöntem önerilmiştir. İlk kez polietilen glikol (PEG) bazlı bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Böylece polar formdaki monolitlerin sentezi ve kromatografik performanslarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında üretilen yeni monolitik kolonlar, alkilbenzen, fenol, benzoik asit ve anilin türevlerinin ayrılmasında başarıyla kullanılmış ve yaklaşık  $300.000 \text{ m}^{-1}$  değerine ulaşan kolon verimleri elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kapiler Elektrokromatografi (CEC), Monolit, Ters Faz Kromatografisi (RPC), Bütül metakrilat, Florlu Monolit, Poli(Etilen glikol).

**Danışman :** Prof. Dr. S. Ali Tuncel, Hacettepe Üniversitesi  
Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği ABD

**Yardımcı Danışman:** Prof. Dr. Süleyman Patır, Hacettepe Üniversitesi  
Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi ABD.

# THE DESIGN, SYNTHESIS AND CHROMATOGRAPHIC APPLICATIONS OF NANOCHROMATOGRAPHIC SCALE MONOLITHS FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

HÜSNÜ ARDA YURTSEVER

## ABSTRACT

The aim of this thesis is to design, synthesize and study the chromatographic performances of nanochromatographic scale monoliths for capillary electrochromatography. In the scope of this thesis, butyl methacrylate (BMA) based columns were synthesized. A new porogen system was introduced and thermally initiated polymerization technique was used to synthesize BMA based monolithic capillary columns in this thesis. Also a monomer containing fluor (F) group was introduced to synthesize new monolithic capillary columns. The presence of F group makes change in the polarity of organic compounds. In this purpose new monolithic columns containing F group were synthesized and their chromatographic performances were compared with acrylic and styrenic based monoliths in the literature. 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate (TFEM) was selected as fluorinated monomer. Also in this section of this thesis a new wall attachment protocol based on 'Click chemistry' was proposed. Poly(Ethylene glycol) based monolithic columns which were not present in the literature were also synthesized. So new polar monolithic columns were synthesized and their chromatographic performances were examined. These newly produced monolithic columns were used successfully for the separation of alkylbenzene, phenol, benzoic acid and aniline derivatives and theoretical plate numbers up to  $300.000\text{ m}^{-1}$  were achieved.

**Key words:** Capillary Electrochromatography (CEC), Monolith, Reversed Phase Chromatography (RPC), Fluorinated monolith, Butyl methacrylate, Poly(Ethylene glycol).

**Advisor :** Prof. Dr. S. Ali Tuncel, Hacettepe University  
Department of Chemical Engineering, Chemical Engineering  
Division.

**Co-Advisor:** Prof. Dr. Süleyman Patır, Hacettepe University  
Faculty of Science and Education, Chemistry Education Division.

## TEŞEKKÜR

*Bu sayfada adı geçen insanlara birkaç cümle ile teşekkür etmek kesinlikle onların benim için ne kadar değerli olduğunu göstermekte kafi değildir. Dolayısıyla bu cümleleri yeterli görmeyenlerden şimdiden özür dilerim.*

*Öncelikle Lisans eğitimimde tanıştığım ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca bana her açıdan, hem bilimsel hem de manevi açıdan destek olan değerli hocam Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e teşekkür ederim.*

*Tez çalışmalarım boyunca yorumlarını eksik etmeyen ve birçok kimyasal maddenin sentezlenmesini sağlayan, yardımcı danışmanım da olan Prof. Dr. Süleyman Patır'a teşekkür ederim.*

*Yine Lisans eğitimimde tanıştığım, bilgileri ve hayat tecrübeleri ile bana yol gösteren ,tez jüri üyelerim Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Prof. Dr. Zümriye Aksu, Prof. Dr. Zakir Rzayev'e teşekkürlerimi sunarım.*

*Kısa bir süre beraber çalışmış olsak da, yeterince tanıyamadığımı düşünüyorum, Berna Saraçoğlu'na hem bilimsel açıdan hem de duygusal açıdan bana destek olduğu için, zor zamanlarımda beni sürekli telkin ettiği için teşekkür ederim.*

*Hem mutlu zamanlarımızda hem de sıkıntılı zamanlarımızda birlikte olduğumuz için, beraberken her zaman gülecek bir şeyler bulabildiğimiz için dostlarım Soner Çakmak, Anıl Sera Kahraman, Tuğrul Tolga Demirtaş ve Seda Tıgılı'ya teşekkür ederim.*

*Ayrıca Lisans arkadaşım olan ve Yüksek Lisans boyunca yakından tanışma fırsatı bulduğum Tuğba Arabacı'ya teşekkür ederim.*

*Kankam Mehmet Çetinkaya'ya (Müstakbel kardiyoloji uzmanı) her zaman yanımda olduğu için, anlayamadığımız zamanlarda bile anlayabildiğimiz için teşekkür ederim.*

*Bu günlere gelmem de en büyük emeğe sahip anneme,babama ve ablalarıma en içten şükranlarımı sunarım.*

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZ .....                                                                                  | i   |
| ABSTRACT .....                                                                            | ii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                            | iii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....                                                                  | iv  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                      | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                     | ix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                   | xxi |
| <br>                                                                                      |     |
| 1. GİRİŞ .....                                                                            | 1   |
| <br>                                                                                      |     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                   | 3   |
| <br>                                                                                      |     |
| 2.1. CEC'de Elektrozmotik Akışın Oluşumu .....                                            | 3   |
| 2.2. CEC İçin Kolon Çeşitleri .....                                                       | 6   |
| 2.2.1. Open-tubular kolonlar .....                                                        | 6   |
| 2.2.2. Partikül dolgulu kolonlar .....                                                    | 7   |
| 2.2.3. Monolitik kolonlar .....                                                           | 9   |
| 2.2.3.1. Monolitik kolonların tarihsel gelişimi .....                                     | 11  |
| 2.2.3.2. Monolitik kolonların hidrodinamik özellikleri .....                              | 13  |
| 2.2.3.3. Monolitik kolonlar ile kapiler elektrokromatografi .....                         | 14  |
| 2.3. Polimerik Monolitik Kolon Türleri .....                                              | 15  |
| 2.3.1. Akrilamid bazlı monolitler .....                                                   | 15  |
| 2.3.2. Poli(stiren) bazlı monolitler .....                                                | 16  |
| 2.3.3. Metakrilat ester bazlı monolitler .....                                            | 16  |
| 2.4. Polimerik Monolitlerin Sentez Yöntemleri .....                                       | 18  |
| 2.5. Termal Başlatıcılı Serbest Radikal Polimerizasyonu İle Üretilmiş<br>Monolitler ..... | 19  |
| 2.5.1. Genel hususlar .....                                                               | 19  |
| 2.5.2. Polimerizasyon sıcaklığı .....                                                     | 20  |

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.3. Gözenek yapıcı sistemi.....                                                                                       | 20        |
| 2.5.4. Yapının oluşumu.....                                                                                              | 21        |
| 2.5.5. Gözeneklilik özelliklerinin kontrolü.....                                                                         | 22        |
| 2.5.6. Fonksiyonel grupların bağlanması.....                                                                             | 23        |
| 2.5.6.1. Fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonu.....                                                                 | 23        |
| 2.5.6.2. Polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması.....                                                         | 24        |
| 2.6. Monolit Özelliklerinin Ayırma Üzerindeki Etkisi.....                                                                | 26        |
| 2.6.1. Gözenek boyutu ve verimlilik.....                                                                                 | 26        |
| 2.6.2. Monolitik kolon boyunca mobil faz akışı.....                                                                      | 26        |
| 2.6.3. Yüzey kimyasının kontrolü (yükli gruplar).....                                                                    | 27        |
| 2.6.4. Alıkonma ve seçicilik (polarite).....                                                                             | 28        |
| 2.7. CEC’te Kullanılan Kolon Türlerinin Karşılaştırılması.....                                                           | 28        |
| 2.8. CEC Sistemi.....                                                                                                    | 30        |
| <b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....</b>                                                                                       | <b>32</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                                                       | 33        |
| 3.2. Kapiler Tüplerin Monolit Sentezine Uygun Forma Getirilmesi.....                                                     | 34        |
| 3.2.1. Standart kapiler kolon duvar modifikasyon prosedürü.....                                                          | 34        |
| 3.2.2. “Kolay bağlanma” (Click Chemistry) bazlı kapiler kolon duvar modifikasyon prosedürü.....                          | 34        |
| 3.3. Monolit Sentezi.....                                                                                                | 35        |
| 3.4. Monolit Karakterizasyonu.....                                                                                       | 39        |
| 3.4.1. Taramalı elektron mikroskopu (Scanning electron misroscop, SEM).....                                              | 39        |
| 3.4.2. Yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri.....                                                                      | 39        |
| 3.4.3. Hidrofilisitelerin tayini (Su temas açısı).....                                                                   | 39        |
| 3.5. Monolitik Kolonların Kromatografik Performanslarının İncelenmesi.....                                               | 40        |
| 3.6. Kromatografik Parametrelerin Tayini.....                                                                            | 41        |
| 3.6.1. Elektroozmotik mobilite ( $\mu_{eof}$ ).....                                                                      | 42        |
| 3.6.2. Alıkonma faktörü (Retention factor) (k).....                                                                      | 42        |
| 3.6.3. Pik çözünürlüğü (Resolution) (R).....                                                                             | 42        |
| 3.6.4. Teorik tabaka sayısı (Theoretical plate number, N) ve Teorik tabaka yüksekliği (Theoretical plate height, h)..... | 43        |

|                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.6.5. Tekrarlanabilirlik (Reproducibility).....                                                 | 43         |
| <b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>                                                              | <b>45</b>  |
| 4.1. Bütil Metakrilat Bazlı Monolitler.....                                                      | 45         |
| 4.1.1. Poli(BMA-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu.....                                       | 46         |
| 4.1.2. Poli(BMA-co-EDM) monolitlerin kromatografik performanslarının<br>incelenmesi.....         | 51         |
| 4.2. Trifloroetil Metakrilat Bazlı Monolitler.....                                               | 62         |
| 4.2.1. Poli(Trifloroetil Metakrilat-co-Etilen Dimetakrilat) monolitler.....                      | 62         |
| 4.2.1.1. Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu.....                                    | 63         |
| 4.2.1.2. Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin kromatografik<br>performanslarının incelenmesi.....      | 69         |
| 4.2.2. Poli(Trifloroetil Metakrilat-co-Propargil Akrilat-co-Etilen<br>Dimetakrilat) monolit..... | 84         |
| 4.2.2.1. Poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolitin karakterizasyonu.....                                 | 84         |
| 4.2.2.2. Poli(TFEM-co-PA-EDM) monolitin kromatografik<br>performansının incelenmesi.....         | 88         |
| 4.3. (Polietilen Glikol)Fenileter Akrilat Bazlı Monolitler.....                                  | 94         |
| 4.3.1. Poli(PEGPEA-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu.....                                    | 95         |
| 4.3.2. Poli(PEGPEA-co-EDM) monolitlerin kromatografik<br>performanslarının incelenmesi.....      | 103        |
| <b>5. SONUÇLAR.....</b>                                                                          | <b>123</b> |
| <b>6. REFERANSLAR.....</b>                                                                       | <b>126</b> |
| <b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                          | <b>135</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|              |   |                                                                           |
|--------------|---|---------------------------------------------------------------------------|
| $\delta$     | : | Elektriksel çifte tabakanın kalınlığı (Electrical Double Layer thickness) |
| $\zeta$      | : | Zeta Potansiyeli                                                          |
| $\epsilon$   | : | Mobil fazın dielektrik sabiti,                                            |
| $\epsilon_0$ | : | Vakumun permitivitesi                                                     |
| $\epsilon_p$ | : | Gözenek hacim kesri                                                       |
| $\epsilon_z$ | : | Boşluk hacim kesri                                                        |
| $\mu_{eof}$  | : | Elektroozmotik mobilite                                                   |
| $\rho_{app}$ | : | Görünen yoğunluk                                                          |
| $\sigma$     | : | Özgül yüzey alanı                                                         |
| AIBN         | : | 2,2'-azobisisobutironitril                                                |
| AMPS         | : | 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit.                                 |
| BD           | : | 1,4-bütandiol                                                             |
| BET          | : | Brunauer-Emmet-Teller                                                     |
| BMA          | : | Bütil metakrilat                                                          |
| BPO          | : | Benzoilperoksit                                                           |
| CE           | : | Kapiler Elektroforez (Capillary Electrophoresis)                          |
| CEC          | : | Kapiler Elektrokromatografi (Capillary Electrochromatography)             |
| DMF          | : | Dimetil formamit                                                          |
| $d_p$        | : | Ortalama çap                                                              |
| DSA          | : | Damlacık Şekli Analiz Cihazı (Drop Shape Analyzer)                        |
| DVB          | : | Divinil benzen                                                            |
| E            | : | Elektrik alanının kuvvetidir                                              |
| EB           | : | Elektron ışınması (Electron Işınması)                                     |
| EDM          | : | Etilen dimetakrilat                                                       |
| EG           | : | Etilen glikol                                                             |
| EOF          | : | Elektroozmotik akış (Electroosmotic Flow)                                 |
| FT           | : | 5 mM pH7 fosfat tamponu                                                   |
| GC           | : | Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)                                   |
| GMA          | : | Glisidil metakrilat                                                       |

|                 |   |                                                                                  |
|-----------------|---|----------------------------------------------------------------------------------|
| h               | : | Teorik tabaka yüksekliği (Theoretical plate height,)                             |
| HPLC            | : | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) |
| IAA             | : | İzoamilalkol                                                                     |
| k               | : | Alıkonma faktörü (Retention factor)                                              |
| MS              | : | Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry)                                         |
| N               | : | Teorik tabaka sayısı (Theoretical plate number,)                                 |
| N <sub>i</sub>  | : | Analiz Sayısını                                                                  |
| NMR             | : | Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance)                           |
| PA              | : | Propargil akrilat                                                                |
| PEGPEA          | : | Poli(etilen glikol)fenileter akrilat                                             |
| Pr-OH           | : | n-propanol                                                                       |
| R               | : | Pik çözünürlüğü (Resolution)                                                     |
| RSD             | : | Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)                               |
| RT <sub>i</sub> | : | i no'lu alıkonma süresi                                                          |
| SD              | : | Standart Sapma (Standart Deviation)                                              |
| SEM             | : | Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)                      |
| TFEM            | : | 2,2,2-trifloroetil metakrilat                                                    |
| TMSPM           | : | 3-trimetoksisililpropil metakrilat                                               |
| T <sub>p</sub>  | : | Polimerizasyon sıcaklığı                                                         |
| UV              | : | Ultraviole                                                                       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Şekil 2.1.</b> Elektriksel Çifte Tabaka'nın temsili resmi. (Smith, N., Capillary electrochromatography).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 3               |
| <b>Şekil 2.2.</b> HPLC ve CEC'te akış profillerinin karşılaştırılması. (A) HPLC, (B) CEC. (Jason A. Starkey, PhD Tezi, 2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 5               |
| <b>Şekil 2.3.</b> HPLC ve CEC ile elde edilen piklerin karşılaştırılması. (A) HPLC, (B) CEC.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 5               |
| <b>Şekil 2.4.</b> Fenilalanin fonksiyonlu poli(Glisidil metakrilat) (poli(GMA)) kaplı bir açık-tübüler kolonun SEM görüntüsü. (Xu, L. et al., 2008).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7               |
| <b>Şekil 2.5.</b> Poli(GMA-co-DVB) partikül dolgu malzemesi. (Zhang, S. et al., 2002).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 8               |
| <b>Şekil 2.6.</b> CEC yayın sayısındaki gelişim. (Wu, R. et al., 2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 9               |
| <b>Şekil 2.7.</b> Partikül dolgulu ve monolitik kolonların temsili resimleri. (A) Büyük çaplı partiküllerle doldurulmuş kolon, (B) Küçük çaplı partiküllerle doldurulmuş kolon, (C) Monolitik kolon.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 10              |
| <b>Şekil 2.8.</b> Poli(stiren-co-divinilbenzen) kolon ile protein ayrımı. (Xie, S. et al., 1999).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 13              |
| <b>Şekil 2.9.</b> Alkil fenonların izokrotik koşullarda ayrılması. Kolon: Akrilik asitle derivatize edilmiş poli(Akrilamid)-poli(etilen glikol). Etkin kolon uzunluğu: 20.5 cm, Enjeksiyon: 0.5 kV 1 s, UV 260 nm, Uygulanan voltaj: 22.5 kV, Mobil faz: %20 ACN-%80 10 mM Tris, 15 mM borik asit tamponu, pH 8.2, Pik sırası: vitamin B (1), anilin (2), asetofenon (3), propiofenon (4), bütirofenon (5) dihidroksiasetofenon (6) dihidroksipropiofenon (7). (Palm, A. et al., 1997)..... | 16              |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.10.</b> | Kapiler kolon hazırlama prosedürü. (Svec, F. et al., 2000).....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| <b>Şekil 2.11.</b> | Alkilbenzen türevlerinin ayrımı. Mobil faz: % 80 ACN-% 20 tampon, pH 7, UV. 215 nm, Uygulanan voltaj: 25 kV, Enjeksiyon: 5 kV 3s, Efektif kolon uzunluğu: 25 cm, Pik sırası: tiyoüre (1), benzil alkol (2), benzaldehid (3), benzen (4), toluen (5), etilbenzen (6), propilbenzen (7), bütilbenzen (8), amilbenzen (9). (Peters, E.C. et al., 1998)..... | 18 |
| <b>Şekil 2.12.</b> | Bir monolitın şematik çizimi ve $d_p$ , $\epsilon_z$ , $\epsilon_p$ nin fiziksel anlamı. (Buchmeiser, M. R., 2007).....                                                                                                                                                                                                                                  | 19 |
| <b>Şekil 2.13.</b> | Glisidil metakrilat bazlı monolitlere polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması. (Buchmeiser, M. R., 2007).....                                                                                                                                                                                                                                 | 24 |
| <b>Şekil 2.14.</b> | Gözenek çapı ve doğrusal akış hızı arasındaki ilişki. (Svec, F. et al., 2000).....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 27 |
| <b>Şekil 2.15.</b> | AMPS derişiminin ayırım üzerindeki etkisi. (Svec, F. et al., 2000).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 28 |
| <b>Şekil 2.16.</b> | CEC Sistemi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 30 |
| <b>Şekil 3.1.</b>  | TFEM-co-PA monolitın kapiler kolon duvarına ‘Kolay bağlanma’ bazlı yapışma prosedürü.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 35 |
| <b>Şekil 3.2.</b>  | Kullanılan monomerlerin yapıları. (A) BMA, (B) TFEM, (C) PA, (D) PEGPEA, (E) Çapraz bağlayıcı: EDM.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 36 |
| <b>Şekil 3.3.</b>  | Kromatografik ayırmada kullanılan analit grupları. (A) Alkilbenzen türevleri, (B) Fenol türevleri, (C) Benzoik asit türevleri, (D) Anilin türevleri.....                                                                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: Sol sütün:                                                                                                                                                                                                                                               |    |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                   | 2500X, Sağ sütün: 5000X, DMF oranları (% v/v): (A) 67, (B) 70, (C) 74, (D) 78, (E) 81.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 46 |
| <b>Şekil 4.2.</b> | Farklı DMF derişimleri ile hazırlanan BMA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 48 |
| <b>Şekil 4.3.</b> | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 49 |
| <b>Şekil 4.4.</b> | % 67 ve % 70 DMF derişimine sahip BMA monolitlerin pH a karşı elektroozmotik mobilite değerleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Şekil 4.5.</b> | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. DMF derişimleri (% v/v): (A) 67, (B) 70, (C) 81, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 80/20, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4. Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen..... | 52 |
| <b>Şekil 4.6.</b> | % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolit kullanılarak farklı ACN/pH 7 tamponu oranları elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 15 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Çap: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4.Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen.....                                | 56 |
| <b>Şekil 4.7.</b> | % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile derişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.....                                                                                                                                                                                                                  | 57 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.8.</b>  | Farklı DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolitlerde alıkonma faktörünün DMF derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 80/20, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm..... | 58 |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi (Van-Deemter grafiği). Analit: tiyoüre.....                                                                                                                             | 59 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi. Analit: tiyoüre.....                                                                                                                                               | 59 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka sayısının DMF derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre.....                                                                                                                                               | 61 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: Sol sütün: 2500X, Sağ sütün: 5000X, IAA oranları (% v/v): (A) 55, (B) 67, (C) 75, (D) 83, (E) 92.....                                                                        | 63 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | Farklı IAA derişimleri ile hazırlanan TFEM monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.....                                                                                                                                                              | 64 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | % 83 IAA derişimi ile ve farklı çaplara sahip tüplerde sentezlenen TFEM monolit için Merkürü porozimetresi ile elde edilen gözeneklilik dağılımı grafikleri. (A) 1.5 mm kapiler tüp, (B) 2.5 mm kapiler tüp.....                                                              | 66 |
| <b>Şekil 4.15.</b> | % 55 IAA derişimi ile ve farklı çaplara sahip tüplerde sentezlenen TFEM monolit için Merkürü porozimetresi ile elde edilen gözeneklilik dağılımı grafikleri. (A) 1.5 mm kapiler tüp, (B) 2.5 mm kapiler tüp.....                                                              | 66 |

- Şekil 4.16.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.....67
- Şekil 4.17.** % 83 IAA derişimine sahip TFEM monolitin (A) pH, (B) ACN derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.....68
- Şekil 4.18.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. IAA derişimleri (% v/v): (A) 67, (B) 83, (C) 92, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 60/40, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Fenol 3. Benzen, 4. Toluen, 5. Etilbenzen, 6. Propilbenzen, 7. Bütilbenzen.....69
- Şekil 4.19.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolit kullanılarak farklı ACN/pH 7 tamponu oranları elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 10 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Fenol, 3. Benzen, 4. Toluen, 5. Etilbenzen, 6. Propilbenzen, 7. Bütilbenzen.....70
- Şekil 4.20.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 10 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.....72
- Şekil 4.21.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolittlerde alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 10 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.....73

- Şekil 4.22.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi (Van-Deemter grafiği). Analit: tiyoüre..... 74
- Şekil 4.23.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi. Analit: tiyoüre..... 74
- Şekil 4.24.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka sayısının IAA derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre..... 76
- Şekil 4.25.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda fenol türevlerinin elektrokromatografik ayırımına uygulanan voltaj değerinin etkisi. Mobil faz: 35/65 v/v ACN/10 mM fosfat tamponu pH 7 veya 8, 22°C, ID:100 µm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Enjeksiyon 5 kV, 3s. 200 nm. pH ve voltaj (kV): (a) 8, 10, (b) 8, 15, (c) 8, 20, (d) 8, 25, (e) 8,30, (f) 7, 25, (g) 7, 30, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. 3,5-dinitrofenol..... 77
- Şekil 4.26.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda anilin ve benzoik asit türevlerinin elektrokromatografik ayırımının farklı voltaj ve ACN/10 mM pH 4.5 fosfat tamponu oranlarında incelenmesi, Kolon çapı:100 µm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Enjeksiyon 10 kV, 5 s, DAD dedektör 254 nm, Uygulanan voltaj: 20 kV. Pik sırası: Benzoik asitler: 1. Tiyoüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit, Anilinler: 1. Tiyoüre, 2. 2-nitroanilin, 3. 3-nitroanilin, 4. 2,4-dinitroanilin, 5. 3,5-dinitroanilin..... 79
- Şekil 4.27.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda benzoik asit ve anilin türevlerinin eş-zamanlı elektrokromatografik ayırımının farklı ACN/10 mM pH 4.5

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                    | fosfat tamponu oranlarında incelenmesi, Kolon çapı:100 µm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon 10 kV, 5 s, DAD dedektör 254 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit 5. 2-nitroanilin, 6. 3-nitroanilin, 7. 2,4-dinitroanilin, 8. 3,5-dinitroanilin.....                                                                        | 80 |
| <b>Şekil 4.28.</b> | % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolitte yüklü analitler için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 5 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 254 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.....                                                                                                                                                       | 82 |
| <b>Şekil 4.29.</b> | TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: (A) 2500X, (B) 5000X, (C) 10000X.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 84 |
| <b>Şekil 4.30.</b> | TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının gözeneklilik özelliklerini gösteren BET grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 85 |
| <b>Şekil 4.31.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolitin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 86 |
| <b>Şekil 4.32.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolitin pH a karşı elektroozmotik mobilite değerleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 87 |
| <b>Şekil 4.33.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: 60/40, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehid, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... | 88 |
| <b>Şekil 4.34.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak farklı ACN/5 mM pH7 fosfat tamponu değerlerinde elde edilen alkilbenzen                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| karışımına ait elektrokromatogramlar. Uygulanan volтаж: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehit, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... | 90 |
| <b>Şekil 4.35.</b> TFEM-co-PA-EDM monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.....                                                                                      | 92 |
| <b>Şekil 4.36.</b> TFEM-co-PA-EDM monolitte teorik tabaka sayısının ve teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi. Analit: tiyöüre.....                                                                                                                                                                       | 93 |
| <b>Şekil 4.37.</b> Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: 5000X, Pr-OH oranları (% v/v): (A) 62, (B) 66, (C) 69.....                                                                                                                                   | 95 |
| <b>Şekil 4.38.</b> Farklı Pr-OH derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.....                                                                                                                                                                              | 96 |
| <b>Şekil 4.39.</b> Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.....                                                                                                                                                                           | 97 |
| <b>Şekil 4.40.</b> % 69 (v/v) Pr-OH derişimine sahip PEGPEA monolitinin (A) pH, (B) Asetonitril derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.....                                                                                                                                                              | 98 |
| <b>Şekil 4.41.</b> Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: 5000X, AMPS oranları (% w/w): (A) 0.3, (B) 0.6, (C) 0.9.....                                                                                                                                  | 99 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.42.</b> Farklı AMPS derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 100 |
| <b>Şekil 4.43.</b> Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 101 |
| <b>Şekil 4.44.</b> % 0.3 (w/w) AMPS derişimine sahip PEGPEA monolitinin (A) pH, (B) Asetonitril derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 102 |
| <b>Şekil 4.45.</b> Farklı Pr-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlar: Pr-OH derişimleri: (A) 62, (B) 69, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... | 103 |
| <b>Şekil 4.46.</b> Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile düşük voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan Voltaj: 15 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.....             | 106 |
| <b>Şekil 4.47.</b> Farklı Pr-OH derişimler ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile yüksek voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan Voltaj: 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1.                                                                                                                                               |     |

- Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 107
- Şekil 4.48.** PEGPEA monolitler için alıkonma faktörünün Pr-OH derişimi ile değişimi. Uygulanan voltaj: (A) 15 kV, (B) 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm..... 108
- Şekil 4.49.** Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler için teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliğinin mobil faz akış hızı ile değişimi. Analit: Tiyoüre, Uygulanan voltaj aralığı: 10-30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, DAD dedektör, 200 nm..... 109
- Şekil 4.50.** Farklı AMPS derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan kromatogramlar: Monolit türü: (A) 0.3, (B) 0.9, ACN/fosfat tamponu oranı: 75/25, pH 7, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 110
- Şekil 4.51.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile düşük voltaj değerinde alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 15 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 113

- Şekil 4.52.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile yüksek voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan voltaj: 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Büttilbenzen..... 114
- Şekil 4.53.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA bazlı monolitler için alıkonma faktörünün AMPS derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Uygulanan voltaj: 20 kV..... 115
- Şekil 4.54.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler için teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliğinin mobil faz akış hızı ile değişimi. Uygulanan voltaj aralığı: 10-30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm..... 116
- Şekil 4.55.** PEGPEA monolit ile farklı analitler için teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi. Monolit türü: (A) % 69 Pr-OH derişimi ile sentezlenen monolit, (B) % 0.3 AMPS derişimi ile sentezlenene monolit. ACN/5 mM pH 7fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm..... 117
- Şekil 4.56.** % 69 Pr-OH derişimi kullanılarak sentezlenen PEGPEA monolit için farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tampon oranları ile alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2.

Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 118

**Şekil 4.57.** % 0.3 AMPS derişimi kullanılarak sentezlenen PEGPEA monolit için farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tampon oranları ile alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 119

**Şekil 4.58.** PEGPEA monolitler için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Monolit türü: (A) % 69 Pr-OH derişimi ile sentezlenen monolit, (B) % 0.3 AMPS derişimi ile sentezlenen monolit, Uygulanan voltaj: 20 kV, Tampon: 5 mM pH 7, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen..... 122

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

|                     |                                                                                                                                                        |    |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.1.</b> | BMA bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları.....                                                                                          | 37 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> | TFEM bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları.....                                                                                         | 37 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> | TFEM-co-PA bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları.....                                                                                   | 38 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> | PEG bazlı monolitler için uygulanan deney koşulları.....                                                                                               | 38 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> | Sentezlenen monolitler için su temas açısı değerleri.....                                                                                              | 45 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> | Farklı DMF derişimleri ile hazırlanan BMA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.....                                                | 48 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> | Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitler kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında elde edilen pik çözünürlük değerleri..... | 53 |
| <b>Çizelge 4.4.</b> | % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monoliti kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.....        | 56 |
| <b>Çizelge 4.5.</b> | % 74 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolit için alkilbenzelerde kromatografik cevabın tekrarlanabilirliği.....                                      | 60 |

|                      |                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.6.</b>  | Farklı IAA derişimleri ile hazırlanan TFEM monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.....                                                                 | 64 |
| <b>Çizelge 4.7.</b>  | % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monoliti kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.....                        | 71 |
| <b>Çizelge 4.8.</b>  | % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolit için farklı pH değerlerinde fenol türevlerinin ayırımında voltajın pik çözünürlüğüne etkisi.....                            | 78 |
| <b>Çizelge 4.9.</b>  | % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monoliti kullanılarak, benzoik asitlerin ve anilinlerin kromatografik ayırımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.....        | 81 |
| <b>Çizelge 4.10.</b> | % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolit için alkilbenzelerde kromatografik cevabın tekrarlanabilirliği.....                                                       | 83 |
| <b>Çizelge 4.11.</b> | TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.....                                                                                     | 85 |
| <b>Çizelge 4.12.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında farklı voltajlarda elde edilen pik çözünürlük değerleri.....                              | 89 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> | TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranlarında elde edilen pik çözünürlük değerleri..... | 91 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> | Farklı Pr-OH derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.....                                                             | 96 |

|                      |                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 4.15.</b> | AMPS derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.....                                                                                   | 100 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> | Farklı PR-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....                           | 104 |
| <b>Çizelge 4.17.</b> | Farklı AMPS derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....                            | 111 |
| <b>Çizelge 4.18.</b> | En iyi kromatografik performansa sahip PEGPEA monolitler kullanılarak farklı ACN/tampon oranları ile alınan elektrokromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri..... | 120 |

## 1. GİRİŞ

Kapiler elektroforez (CE) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'nin bir birleşimi olan Kapiler Elektrokromatografi (CEC) ilk olarak Pretorius ve arkadaşları tarafından 1974 yılında önerilmiştir (Pretorius, V. et al., 1974). Fakat CEC, 1981 yılında Jorgensen ve Lukacs'ın CEC'in yüksek verimliliğini 170 µm lik bir kapiler kolon içerisinde göstermesine kadar fazla dikkat çekmemiştir (Jorgensen, J.W. ve Lukacs, K.D., 1981). 1990'ların başında Knox ve Grant yaptığı teorik çalışmalarla CEC'in potansiyelini ortaya koymuştur (Knox, J.H. et al., 1994, Grant, I.H. et al., 1996). O tarihten bu güne CEC yüksek verimliliği ve eşsiz seçiciliği ile sıvı-faz ayırma tekniği olarak gelişimini sürdürmüştür.

Kapiler elektrokromatografi (CEC), mobil fazı ve analitleri bir kolon içerisinde hareket ettirmek için elektrik alanını sürücü kuvvet olarak kullanan bir çeşit mikrokolon ayırma tekniğidir. CEC ile CE de yığın akışı sağlayan sürücü kuvvet elektroforetik mobilitedir (EOF), fakat CEC de analitlerin transferinde CE'de olduğu gibi yalnızca elektroforetik mobilite değil, HPLC'de olduğu gibi analitlerin mobil faz ve sabit faz arasındaki etkileşimi de aynı oranda öneme sahiptir. Böylece şunu söyleyebiliriz ki CEC, CE'nin yüksek ayırma verimini ve HPLC'nin seçiciliğini birleştiren hibrid bir teknolojidir. CEC HPLC'den sabit faz ve kolon fabrikasyonu tekniklerinden çoğunu ödünç almıştır, fakat EOF'nin sağlanması için bazı özel tekniklere ihtiyaç duymaktadır. CEC kolon fabrikasyonu için iki farklı dolgu çeşidi vardır: partikül dolgulu kolonlar ve monolitik kolonlar. Partikül dolgulu kolonlar, stabil ve tekrarlanabilirliğin sağlanması için gelişmiş deneysel vasıflara ve tecrübeye ihtiyaç duyar. En büyük zorluklardan biri mobil faz akışını engellemeyen ve partikülleri kolon içerisinde uygun şekilde tutabilecek fritlerin fabrikasyonudur. Buna karşın monolitik kolonlar kendi kendilerini silika kapiler kolon duvarına sabitlediğinden frite ihtiyaç duymazlar. Bu yüzden monolitik kolonlar kararlı, yeterli mobil faz geçirgenliğine sahip ve kabarcık oluşumunu engelleyen bir yapıya sahiptirler.

Günümüzde monolitik kolonlar partikül dolgulu kolonlara oranla daha fazla ilgi çekmektedir. Fabrikasyonlarının kolay olması ve istenen kimyasal özellikte elde edilebilmeleri monolitik kolonların en önemli avantajlarıdır. CEC, Kütle

Spektrometresi (Mass Spectrometer, MS) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, NMRS) ile bağlanma uyumluluğuna sahip olduğundan tıp, farmasötik ve çevre bilimleri için yaygın kullanılan bir ayırma tekniğidir.

CEC yeni yeni ortaya çıkmakta olan bir tekniktir. Günümüzdeki uygulayıcıları bu alana ya HPLC'den ya da CE'den girmiştir. Bu nedenle CEC için uygulanan yaklaşımlar genelde bu iki farklı alandan adapte edilmiştir. Günümüzdeki araştırmaların çoğu yeni kolon teknolojilerinin geliştirilmesi üzerinedir ve bu alanda da HPLC'den örnek alınmaktadır. Örneğin: frit ve partikül dolgu kolonların kullanılması, HPLC'nin CEC kolon teknolojisi üzerinde nasıl etkili olduğunu göstermektedir. Hatta CEC kapiler kolonları içerisine doldurulan partiküller ticari HPLC kolonlarında kullanılanlar ile aynıdır. Bu ayırma ortamları her zaman kullanılan HPLC modları için uyarlanmıştır ve yüzey kimyaları bu uygulamalar için optimize edilmiştir. Fakat bu yaklaşım CEC'in HPLC nin altkütmesi olarak görülmesine neden olmuştur, çünkü ayırma ortamı CEC'de ikili bir rol oynamaktadır: gerekli etkileşimlerin sağlanması için uygun bölgelerin oluşması ve elektroozmotik akışın sağlanması. Sonuç olarak mükemmel HPLC dolgu malzemeleri bile CEC'de çok düşük verimlere neden olmuştur. Böylece bu, CEC ve HPLC arasındaki temel farkın anlaşılmasını ve CEC'e spesifik, HPLC'e alternatif kolon teknolojisinin geliştirilmesi için uygun koşulları sağlamıştır.

Bu nedenler temelinde tez çalışmasının amacı, nanokromatografik ölçekli yeni monolitik kolonların tasarımı, sentezi ve bu kolonların kromatografik performanslarının ölçülmesi olarak belirlenmiştir.

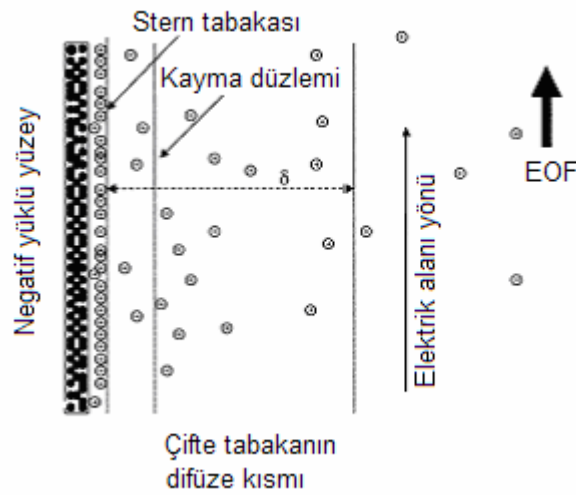
Tez kapsamında üretilen yeni monolitik kolonlar, farklı deney koşullarında sentezlenmiş ve çeşitli analiz koşullarında alkilbenzen, fenol, benzoik asit ve anilin türevlerinin ayrılmasında kullanılmıştır. Öncelikle geçirgen monolitik kolonların elde edilebilmesi için farklı sentez koşulları denenmiştir. Geçirgen monolitlerin elde edilmesi ile bu monolitlerin kromatografik performanslarının ölçülmesi için analizlere geçilmiştir. Ardından elde edilen kromatogramlarla kolonların verimleri hesaplanmış ve bu verimlerin artırılabilmesi için yeni sentez koşulları belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. CEC'de Elektrozmotik Akışın (Electroosmotic flow, EOF) Oluşumu

Elektrokromatografi mobil fazın küçük çaplı dolgulu bir kolon içerisinde hareketini sağlamak için HPLC'de olduğu gibi hidrolik basınç yerine elektrozmozü sürücü kuvvet olarak kullanan bir kromatografi tekniğidir.

Elektrozmoz sabit fazla etkileşim içerisindeki bir mobil fazın elektrik alanı yardımı ile hareket etmesine denir ve CEC'de sürücü kuvvet olarak bilinir ve bu kuvvet mobil faz ve sabit faz arasında oluşan Elektriksel Çifte Tabaka (Electrical Double Layer) ile sağlanır.

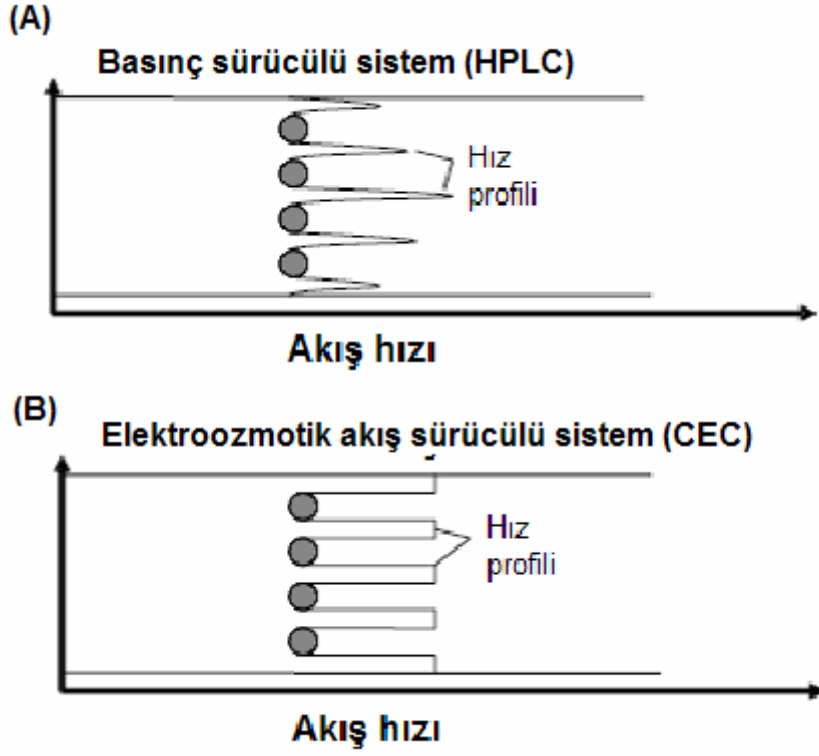


**Şekil 2.1.** Elektriksel Çifte Tabaka'nın temsili resmi. (Smith, N., Capillary electrochromatography)

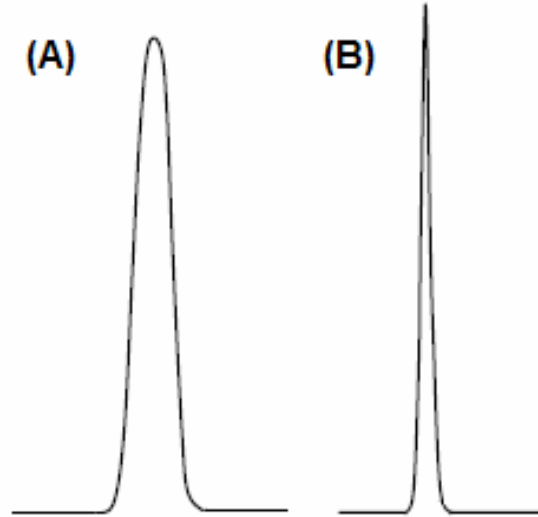
Elektriksel Çifte Tabaka sıkı ve dağınık olmak üzere iki bölgeden oluşur. Alkalin koşullar altında dolgu malzemesinin yüzeyindeki iyonlaşabilir gruplar iyonlaşarak negatif yüklü hale gelirler ve mobil faz içerisindeki pozitif yüklü iyonları çekerek sıkı ve hareketsiz bir bölge oluştururlar. Bu tabakaya "Stern Tabakası" adı verilir. Fazla yükler ise mobil faz içerisine difüzlenirler, bu sıkı olmayan dağınık bölgeye ise "Goüy Tabakası" adı verilir (Şekil 2.1). Bu katmandaki iyonlar tipik çözülmüş iyon davranışı sergilerler.

Elektriksel Çifte Tabaka içerisindeki yük konsantrasyonu toplam iyon konsantrasyonuna oranla düşüktür ve dolgu malzemesinin yüzeyinden uzaklaştıkça daha da düşer. Bu da yük yoğunluğu ile doğru orantılı olan elektriksel potansiyelin de düşmesine yol açar. Stern Tabakası ve Elektriksel Çifte Tabaka'nın difuze olmuş kısmı ile arasındaki sınırdaki elektrik potansiyeline "Zeta Potansiyeli",  $\zeta$ , denir ve 0 ve 100 mV arasında bir değere sahiptir. Dolgu malzemesinin yüzeyinden uzaklaştıkça yük yoğunluğu azaldığından elektrik potansiyeli düşmeye devam eder, zeta potansiyeli'nin 0.37 katı olduğu yer Elektriksel Çifte Tabaka'nın kalınlığını belirler ve bu kalınlık  $\delta$  ile gösterilir.

Kapiler kolona bir elektrik alanı uygulandığında Goüy Tabakası'ndaki mobilize iyonlar (Stern Tabakasında absorbe edilmemiş iyonlar) katoda doğru harekete geçerler ve kayma başlar. Böylece elektroozmotik akış meydana gelir, çünkü hareket eden bu tabakayla birlikte mobil fazın merkezi de hareket eder. Bu tabakadaki yük dağılımı homojen olduğundan tabaka içerisinde kayma gözlenmez ve tabaka tek bir bütün halinde hareket eder. Bunun sonucunda tıpa tipi (plug flow) akış ortaya çıkar (Şekil 2.2). HPLC'de hidrolik basıncın yarattığı parabolik akışın neden olduğu bant genişlemesi, düşük ayırma gücü gibi dezavantajlardan böylece kurtulunmuş olur. Ve daha keskin pikler elde edilir (Şekil 2.3). Böylece kromatografik bir kolonun ayırma gücünü gösteren teorik tabaka sayısında muazzam bir artış olur. HPLC'de 50.000' e kadar çıkan teorik tabaka sayısı CEC'te 500.000'e kadar çıkmaktadır.



**Şekil 2.2.** HPLC ve CEC'te akış profillerinin karşılaştırılması. (A) HPLC, (B) CEC. (Starkey, J.A. PhD Tezi, 2007)



**Şekil 2.3.** HPLC ve CEC ile elde edilen piklerin karşılaştırılması. (A) HPLC, (B) CEC.

## 2.2. CEC İçin Kolon eşitleri

Literatürdeki CEC kolonları genel olarak:

- (i) Açık-tübüleri,
- (ii) Partikül dolgulu,
- (iii) Monolitik

kolonlar olmak üzere 3'e ayrılır.

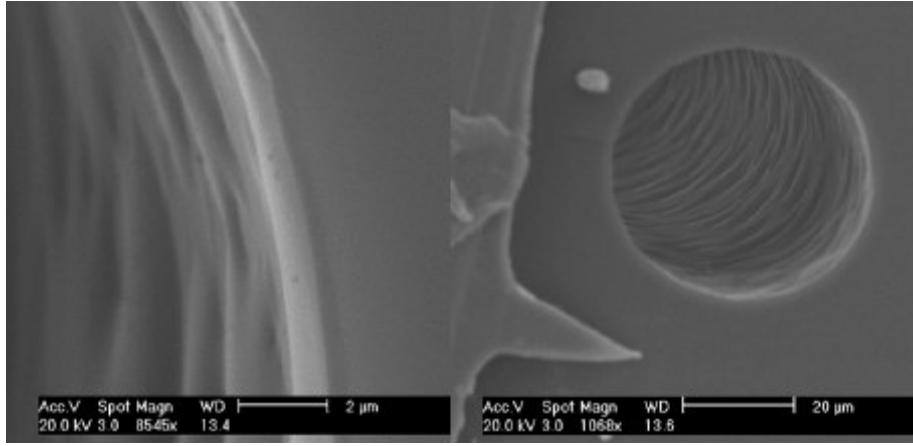
### 2.2.1. Açık-tübüleri kolonlar (Open-tubular)

Açık-tübüleri kolonlar üzerinde yüklü ve ayırma grupları içeren sabit bir fazla kaplanmış kolon duvarına sahip kolonlardır. CEC için yapılmış açık-tübüleri kolonların iç çapları genellikle 25 µm den daha azdır. Bu değer dolgulu kolonlardan daha düşüktür. Bu tarz bir silika kolonun yüzey alanı gözenekli dolgu materyallerinkinden daha azdır. Bu yüzden örnek kapasiteleri bu kolonlarda çok daha düşüktür. Örnek kapasitesinin düşük olması ise eser miktardaki analitlerin analizini güçleştirmektedir.

Yüzey alanını artırmak için 3 farklı yöntem önerilmektedir.

1. Kolon yüzeyinin gözenekli bir malzeme ile kaplanması,
2. Kimyasal olarak bağlanmış moleküler mono-tabaka yerine kolon duvarının polimerik bir sabit fazla kaplanması,
3. Kolon yüzeyinin dağlanması.

Şekil 2.4'te fenilalanin fonksiyonlu poli(glisidil metakrilat) (poli(GMA)) kaplı bir açık-tübüleri kolon örneklenmektedir.



**Şekil 2.4.** Fenilalanin fonksiyonlu poli(glisidil metakrilat) (poli(GMA)) kaplı bir açık-tübüler kolonun SEM görüntüsü. (Xu, L. et al., 2008)

### 2.2.2. Partikül dolgulu kolonlar

Partikül dolgulu kolonlar, içerisine kolon dolgu materyalinin yüksek basınç yardımı ile ve iki frit arasına sıkıştırılmış olduğu kolonlardır. Bu kolonların hazırlanması 3 kısımdan oluşur:

1. Kolon dolgu malzemesinin seçimi ve sentezi,
2. Kolonun doldurulması,
3. Fritlerin fabrikasyonu.

CEC için dolgu malzemesi seçimindeki önemli kurallardan biri EOF' u sağlayacak olan yüklü veya iyonlaşabilir gruplara ve analitlerin alıkonmasını sağlayacak gruplara sahip malzemelerin seçilmesidir. Silika bazlı ters-faz dolgu malzemeleri CEC'de en çok kullanılan partikül dolgu malzeme türüdür. Silika yüzeye bağlı karbon zincirleri analitler için seçiciliği ve alıkonmayı sağlarken, artan silanol grupları 2.3 ten büyük pH'larda EOF'un oluşmasını sağlar. Silika bazlı dolgu malzemeleri kullanılan CEC uygulamalarında en uygun pH aralığı 5-10 dur. Çünkü bu aralık dışındaki pH'larda silanol gruplarını iyonlaşabilme yetenekleri düşük olduğundan yeterli EOF sağlanamaz.

Sabit fazın yapısına ek olarak partikül büyüklüğü ve gözenek yapısı kromatografik uygulamalarda büyük öneme sahiptir. CEC'de kolon geri basıncı olmadığından

yüksek verimlilik elde edebilmek için çok küçük çaplı partiküller kullanılabilir. Partikül çapı Elektriksel Çifte Tabaka'nın kalınlığı ile çakışmadığı sürece azaltılabilir. Çünkü bu çakışma EOF'un önemli ölçüde düşmesine yol açar. Partikül çapı 20δ den büyük olduğu sürece bu çakışma gerçekleşmez ve EOF da herhangi bir azalma gözlenmez.

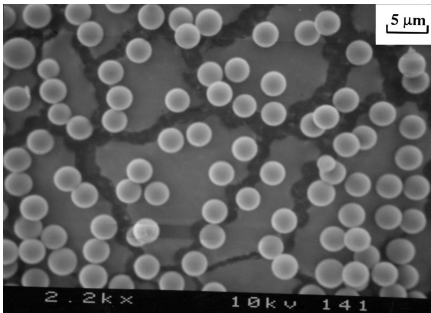
Homojen ve sıkı kolonları hızlı bir şekilde elde etmek için 4 farklı metot vardır. Bunlar:

1. Çözücü ile bulamaç şeklinde doldurma (Solvent Slurry Packing)
2. Süper kritik CO<sub>2</sub> ile bulamaç şeklinde doldurma (Supercritical CO<sub>2</sub> Slurry Packing)
3. Elektrokinetik doldurma (Electrokinetic Packing)
4. Merkezci kuvvet yardımı ile doldurma (Centripetal Packing).

Fritlerin yapımı en önemli basamaklardan biridir. Fritler (giriş ve çıkış fritleri) dolgu malzemesinin kolon içerisinde tutulmasını sağlar. 4 farklı frit oluşturma metodu vardır. Bunlar:

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

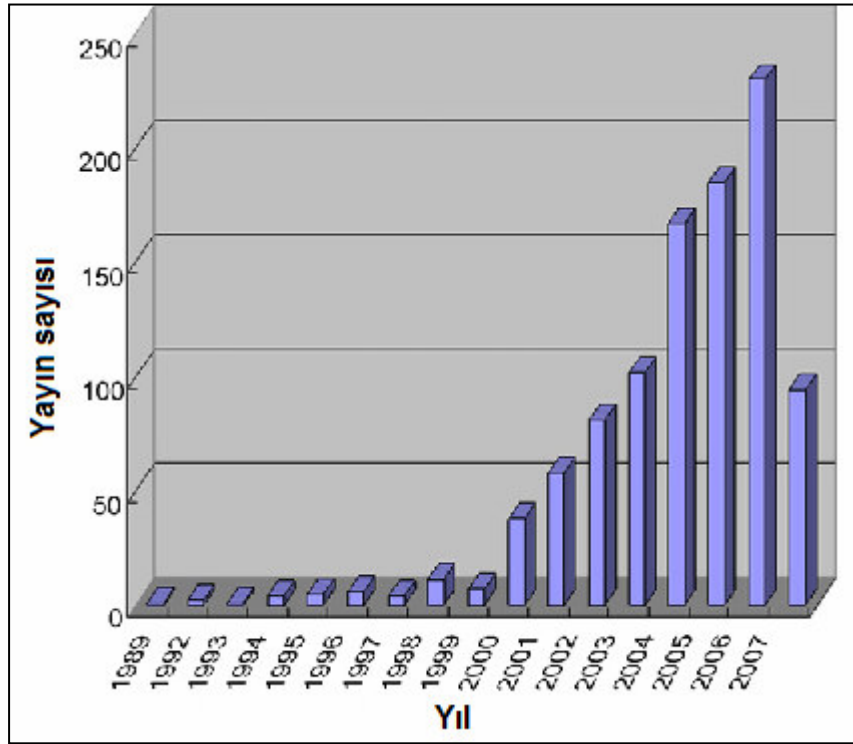
Bunlardan en çok kullanılan yöntem dolgu malzemesinin sinterlenmesidir. Şekil 2.5'te poli(GMA-co-DVB) partiküllerin SEM görüntüsü yer almaktadır. Bu partiküller sentezlendikten sonra kapiler kolon içerisine doldurulmaktadır.



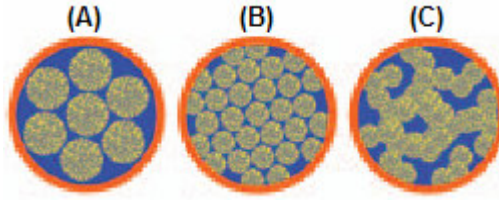
**Şekil 2.5.** poli(GMA-co-DVB) partikül dolgu malzemesi. (Zhang, S. et al., 2002)

### 2.2.3. Monolitik kolonlar

Günümüzde gözenekli malzemeler olarak bilinen monolitler hakkında fazlasıyla araştırma vardır. Şekil 2.6'da 1988 ve 2007 yılları arasında gerçekleştirilmiş çalışmaların sayısı bir bar grafiğinde gösterilmektedir. Monolitler genelde ayırma biliminde kullanılmaktadır ve tek bir gözenekli partikül olarak düşünülebilirler. Neredeyse 100 yıldır kullanılan partikül dolgu kolonlara alternatif olarak ortaya çıkmışlardır. Partikül dolgu kolonlar 100 yıllık bir geçmişe ve gelişmiş bir teknolojiye sahip olmalarına rağmen hala kusursuz değildirler.



Şekil 2.6. CEC yayın sayısındaki gelişim. (Wu, R. et al., 2007)



**Şekil 2.7.** Partikül dolgu ve monolitik kolonların temsili resimleri. (A) Büyük çaplı partiküllerle doldurulmuş kolon, (B) Küçük çaplı partiküllerle doldurulmuş kolon, (C) Monolitik kolon.

Monodispers partiküllerden oluşmuş ve çok sıkı doldurulmuş bir kolon da bile yaklaşık % 30 luk bir partiküller arası boşluk vardır. Bu oran çok yüksektir ve kolonun büyük bir kısmının ayırımında kullanılmadığını göstermektedir (Şekil 2.7).

Fakat tek problem bu değildir. Mobil faz standart gözeneklilikte bir dolgu malzemesi içinden geçirilmeye başlandığında, akışkan, direncin minimum olduğu partiküller arası boşluktan akmaya başlar. Gözenekler arasındaki akışkan ise durgun kalır. Eğer bir örnek, akış halindeki mobil faz içerisine enjekte edilirse, örnek içerisindeki moleküller de gözenekler içerisine taşınırlar. Difüzyon, boşluklardan akan çözelti ve gözeneklerdeki durgun akışkan arasındaki konsantrasyon gradienti sayesinde olur. Böylece bu moleküllerin gözenekler içerisine transferi gerçekleşir. Konsantrasyon sinyali partikül üzerinden geçip gittiğinde ise gözenekler içerisindeki moleküller gözenekleri çevreleyen sıvı içerisine geri difüzlendirilir. Sonunda durgun faz gözenekler içerisindeki eski halini alır. Bu da kütle transferinin kısıtlanmasına neden olur.

Gazlar, küçük organik moleküller ve iyonlar hızlı difüzlenebilen moleküllerdir. Fakat proteinler, nükleik asitler veya sentetik polimerler gibi büyük moleküllerin transferi daha güç gerçekleşmektedir, çünkü bu moleküllerin difüzyon katsayıları küçük moleküllere oranla çok daha düşüktür. Bu, yüksek-hızlı kromatografi gibi proseslerde bütün hızın kütle transferi hızı tarafından kısıtlanmasına yol açar.

Gözenekli partiküllerde kütle transferini hızlandırmanın mantıklı yolu partiküllerin çapının küçültülmesi ve difüzyon yollarının kısaltılmasıdır. Fakat bu da geri-basıncın artmasına ve geçirgenlikte düşmeye neden olacak olan partiküller arası

boşlukların azalmasına yol açar. Monolitik dolgu malzemesi ise bu gözenekli partiküllerin bir araya gelmesiyle oluşmuş sürekli bir faza benzer. Böylece yalnızca difüzyon kütle aktarımının gerçekleştiği kanallar ve gözenek derinlikleri optimize edilmiş olur. Dolayısıyla kolon geçirgenliği ve kütle transferi maksimuma ulaşır. Bu sayede hidrolik akışa en düşük dirençle sahip yüksek verimli ayırım gerçekleştirilebilir.

### **2.2.3.1. Monolitik kolonların tarihsel gelişimi**

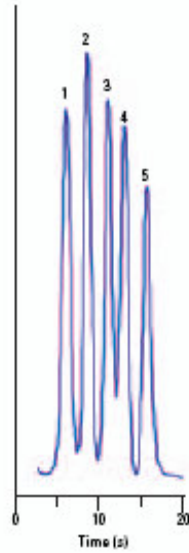
1950'lerde Nobel ödüllü Robert Synge monolitlere benzeyen ilk yapıları önermiştir (Synge, R.L. et al., 1954). Fakat o zamanlarda üretilen yumuşak malzemelerin hidrostatik basınç altında çöktüğünü fark etmiştir. Bundan 15 yıl sonra Kubin ve arkadaşları 2-hidroksietil metakrilat hidrojellerden oluşan çok düşük geçirgenlikte bir monolit üretmişlerdir (Kubin, M. et al., 1967). Buna karşılık açık gözenekli poliüretan köpüklerden oluşan monolitler daha başarılı olmuşlardır ve bu monolitlerle GC'de ve LC'de başarılı ayırmalar gerçekleştirilmiştir. Yine de bu erken teknolojilerden hiçbiri uzun soluklu olmamıştır ve monolitler için modern çağ daha sonra başlamıştır.

1980'lerin ortalarında, Belenkii ve arkadaşları gradient modda protein çalışmak için çeşitli kimyasal özellikte ve geometride kolonlar üretmişlerdir (Belenkii, B.G. et al., 1988). Fazla uzun olmayan bir kolonun iyi kromatografik ayırım için gerekli olduğunu görmüşlerdir. Dolayısıyla kısa ayırım ortamları denebilecek bir konseptin ilk tohumlarını atmışlardır. Partiküllerden oluşmuş bir dolgu malzemesi elde etmek düzensiz dolgu yoğunluğundan ve fazla kanallaşmadan dolayı çok zor olmuştur. Böylece yeni bir tür dolgu malzemesi "monolit" doğmuştur. Orijinal, yüksek çaprazlanma derecelerine sahip monolitler ilk olarak monovinil ve divinil metakrilat monomerlerden, serbest radikal başlatıcıdan ve gözenek yapıcı sistemden oluşan bir karışımı tüp şeklinde veya düz bir tabaka üzerine dökerek polimerleştirme ile elde edilmiştir. Elde edilen gözenekli monolitik polimer daha sonra tüpün içini delerek veya tabakadan sıyrarak ince diskler halinde alınmış ve bir kartuş içerisine koyularak kromatografik ayırmalarda kullanılmıştır.

İleriki çalışmalar, kolon formatında monolitler elde etmek için yapılmış ve monomer çeşidi stiren, divinilbenzen ve bunların türevlerine genişletilmiştir. Daha önceki disklerden farklı olarak bu monolitler herhangi bir sıyırma ya da delme işlemine gerek görmeyecek şekilde kolon içerisinde polimerleştirilmiştir (Svec, F. et al., 1992). Yavaş olan termal-başlatıcılı polimerizasyonu dikey bir kolon içerisinde yapılması, başlangıçta oluşan çapraz bağlı çekirdekçiğin çökmesine ve polimerizasyon çözeltisinin katı fazın üstünde ve etrafında kalmasını sağlamış, bu da monolit ve kolon arasında oluşacak boşluklara neden olacak büzüşmeyi engellemiştir. Bu da monolitin kromatografik performansı için zazarlı olacak bir etkiyi ortandan kaldırmıştır.

Aynı tarihlerde Hjerten ve arkadaşları N,N'-metilen bisakrilamid ve akrilik asiti amonyum sülfat tuzu varlığında polimerleştirerek şişmiş, çapraz bağlı, jel yapılı bir monolit elde etmişlerdir (Hjerten, S. et al., 1989). Tanaka ve arkadaşları ise inorganik yapılı yeni bir monolit elde etmişlerdir: silika monolitler (Minakuchi, H. et al., 1996). Organik polimerlere göre silika monolitler kolon içerisinde sentezlenemiyordu çünkü silika malzemeler polimerizasyon sırasında fazlasıyla büzüşmekteydi. Örneğin 6 mm lik bir dökümden 4.6 mm çaplı monolit elde edilmekteydi. Bu yüzden öncelikle silika monolit bir kalıp içerisinde elde edilmekte, daha sonra bu kalıptan alınarak C<sub>18</sub> zincirleri ile ters-faz kromatografisi için modifiye edilmekteydi.

Monolitik kolonlarla ilk çalışmalar hızlı kromatografik ayrımları ve düşük geri basınçları sağlamıştır. Monolitlerin bu özellikleri sayesinde iyi işler çıkarılmıştır. Örneğin Şekil 2.8, 20 saniyeden daha kısa bir süre içerisinde 5 farklı proteinin ayrımını göstermektedir. Organik polimerik yapılı monolitler büyük analitlerin (protein, nükleik asit, sentetik polimerlergibi) ayrımında daha iyiyken, silika bazlı monolitler küçük analitlerin ayrımında daha iyi performans göstermişlerdir. Böylece bu iki teknoloji birbirini tamamlayıcı olmuştur.



**Şekil 2.8.** Poli(Stiren-co-Divinilbenzen) kolon ile protein ayrımı. (Xie, S. et al., 1999)

### 2.2.3.2. Monolitik kolonların hidrodinamik özellikleri

Tüm mobil fazın kolonu dolduran malzeme içerisinde bütünüyle geçmesi gerekmektedir. Bu yüzden dolgu malzemesinin gözeneklerine bağlı olan geçirgenliği büyük önem kazanmaktadır. Nanometre büyüklüğünde gözeneklere sahip monolitik bir kolon büyük ihtimalle yüksek basınç altında parçalanacaktır. Bu yüzden uygun akışı sağlayabilecek büyüklükte gözeneklere ihtiyaç duyulmaktadır. Polimerizasyon koşullarının optimizasyonu ile birbiri ile bağlantılı, düşük mikrometre ölçülerinde gözeneklere sahip bir malzeme elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece monolitler yüksek akış hızlarına maruz kaldığında bile düşük geri basınç sağlanabilmektedir. Silika bazlı bir monolitin 11 µm çaplı partiküllerle dolu bir kolonla eş geri basınca sahip olduğu gözlenmiştir. Fakat kromatografik performans açısından bakıldığında bu silika bazlı kolonun 3 µm çaplı partiküller ile doldurulmuş bir kolonla aynı performansa sahip olduğu görülmüştür.

Monolitlerin dikkate değer başka bir özelliği ise % 80 lere kadar çıkabilen gözeneklilikleridir. Başka bir deyişle kolonun yalnızca % 20 si dolu olmaktadır. Bu değer ise partikül doldurulmuş bir kolonda % 60 kadardır. Monolitlerde mobil faz büyük çaplı gözeneklerden akmakta, bu da geri basıncı önemli ölçüde düşürmektedir. Bu yüzden partikül dolgululu kolonlarda olan küçük gözeneklerde

gerçekleşen difüzyonla kütle aktarımı, monolitlerdeki büyük gözeneklerde konveksiyonla olmaktadır. Böylece kütle aktarım hızı muazzam bir şekilde artmaktadır. Özet olarak monolitlerde analitler difüzyonla değil akışın sebep olduğu konveksiyonla transfer edilir. Liapis ve arkadaşları monolitlerin dinamik davranışını, ölçeklendirilmesini ve dizaynlarını konu alan bir matematiksel model geliştirmişlerdir (Liapis, A.I. et al. 1999).

### **2.2.3.3. Monolitik kolonlar ile kapiler elektrokromatografi**

Hızlı ayırmalardaki başarılarına ve ticari uygunluklarına rağmen, 4-10 mm iç çaplara sahip monolitik kolonlar selefleri olan partikül doldurulmuş kolonların gölgesinde kalmışlardır. 1990'ların ortalarında ortaya çıkan kapiler elektrokromatografi geleneksel sıvı kromatografisine oranla sahip olduğu yüksek verimlilik ve pik kapasiteleri sayesinde minyatirüze ayırma tekniği olarak tekrar ortaya çıkmıştır. Fakat HPLC ve CE'den CEC'e geçen araştırmacılar partikül doldurulmuş olan kolonlar için gerek frit yapma gerekse de kolon doldurma işleminin çok zor olduğunu görmüşlerdir. Böylece daha önceki çalışmalardan ilhamlanarak frit gerektirmeyen monolitler üzerine yoğunlaşmaya başlamışlardır. Sonuç olarak eşsiz özellikleri ve hazırlanışlarındaki basitlik sayesinde monolitler CEC'te çok büyük ilgi çekmiştir.

Monolitik CEC kolonlarının hazırlanışı orijinal monolitik kolonlarla benzer olmasına karşın özdeş değildir. Paslanmaz çelik kolonlar içerisinde polimerleştirmeye karşıt olarak, kapiler kolonun yüzeyi, [3-(trimetoksisilil)propil] metakrilat ile tepkiyen yüzeydeki silanol grupları sayesinde monolitin duvara yapışması için gereken gruplar oluşturabilir. Böylece monolit kovalent olarak duvara bağlanmış olur. Küçük çaplı kapiler format aynı zamanda silika bazlı monolitlerin yapımına da olanak sağlar.

Kapiler kolonlar sayesinde metre başına düşen teorik tabaka sayısı 100.000'lerle ölçülür. Başlangıçta, örnek genellikle benzen türevleri gibi basit organik bileşiklerden oluşan bir karışımdır. Bu çalışmalar HPLC nin taklit edilmesinden başka bir şey olmadığından CEC yavaş yavaş soluklaşmıştır.

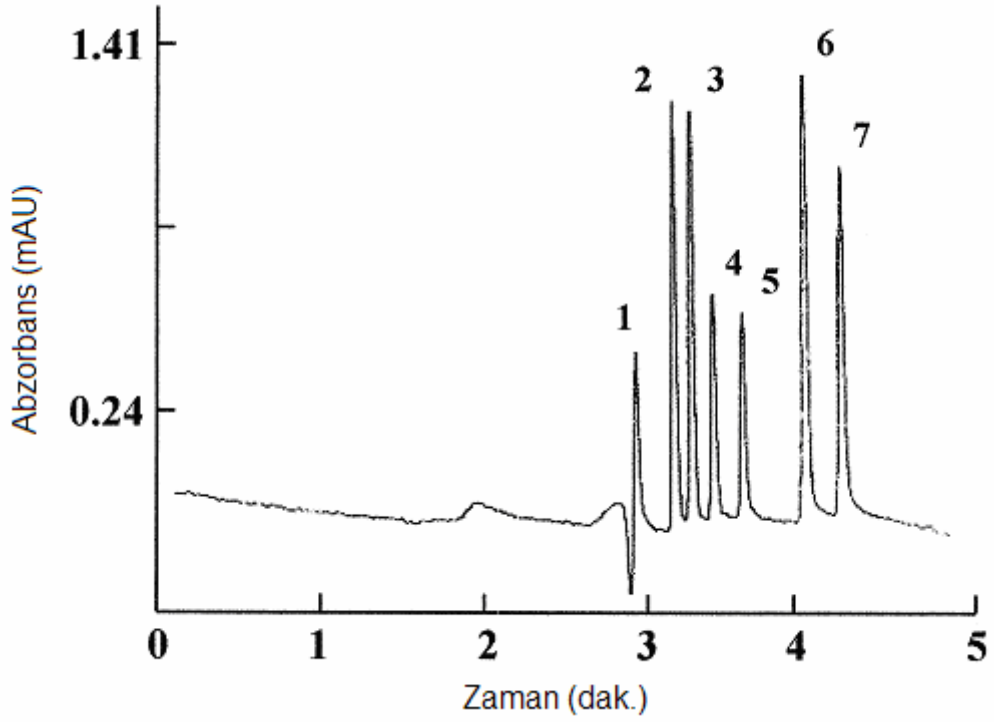
Daha sonra yapılan protein ve peptit ayrımları ile CEC tekrar ortaya çıkmaya başlamıştır. Fakat bu moleküllerin iyonlaşabilmesinden dolayı bazı güçlükler çekilmiştir. Nötr moleküller sadece elektroozmotik akış ile hareket edebilmesine karşın protein ve peptitler gibi yüklü moleküllerde elektroforetik mobilite de işin içine girmektedir. Bu moleküllerin özelliklerine veya mobil fazın pH'ına göre, elektroforetik mobilite elektroozmotik akışla aynı veya ters yönlü olabilmektedir. Başka bir etkileşim ise pozitif yüklü moleküllerin yüzeydeki negatif yüklü sabit faz yüzeyiyle etkileşime girmesidir. Bu durumda kalıcı adsorpsiyon bile gözlenebilmektedir.

El Rassi ve arkadaşları, yeterli EOF'u sağlayan ve polar olmayan poli(pentaeritrol diakrilat monosteerat) bazlı herhangi bir elektrostatik etkileşimin olmadığı CEC kolonları geliştirmişlerdir (Rassi, Z.E. et al., 2005). Kolonun bu yeteneği mobil faz elektrolitinden yeterli sayıda iyonu polimer yüzeyine adsorplama yeteneğine atfedilmiştir. Adsorplanan iyonlar nötr monolite EOF için ve kütle transferi için gerekli olan zeta potansiyelini sağlamıştır. Yine de sabit yükler, pH 7 de hızlı ve verimli protein ve peptit ayrımını sağlamıştır.

## **2.3. Polimerik Monolitik Kolon Türleri**

### **2.3.1. Akrilamid bazlı monolitler**

Palm ve Novotny akrilamid bazlı matrislere hidrofobik ligandlar takmıştır ve bu kolonların tekrarlanabilirliğini gösteren datalar elde etmiştir (Palm, A. et al., 1997). Tuz çözeltisi ve N-metilformamid kullanarak akrilamid, metilen bisakrilamid, akrilik asit ve C<sub>4</sub>,C<sub>6</sub>,C<sub>12</sub> alkil akrilat içeren kolonlar sentezlemişlerdir. Bu kolonları ters-faz kromatografisinde kullanmışlar ve fenilketonlar için 300.000-400.000 m<sup>-1</sup> civarında teorik tabaka sayıları elde etmişlerdir. Şekil 2.9'da Palm ve arkadaşlarının sentezlediği poli(akrilamid)-poli(etilen glikol) kolonla gerçekleştirilen alkil fenon türevleri ayrımı için örnek bir kromatogram görülmektedir.



**Şekil 2.9.** Alkil fenonların izokrotik koşullarda ayrılması. Kolon: Akrilik asitle derivatize edilmiş poli(akrilamid)-poli(etilen glikol). Etkin kolon uzunluğu: 20.5 cm, Enjeksiyon: 0.5  $\mu$ l 1 s, UV 260 nm, Uygulanan voltaj: 22.5 kV, Mobil faz: %20 ACN-%80 10 mM Tris, 15 mM borik asit tamponu, pH 8.2, Pik sırası: vitamin B (1), anilin (2), asetofenon (3), propiofenon (4), bütirofenon (5) dihidroksiasetofenon (6) dihidroksipropiofenon (7). (Palm, A. et al., 1997)

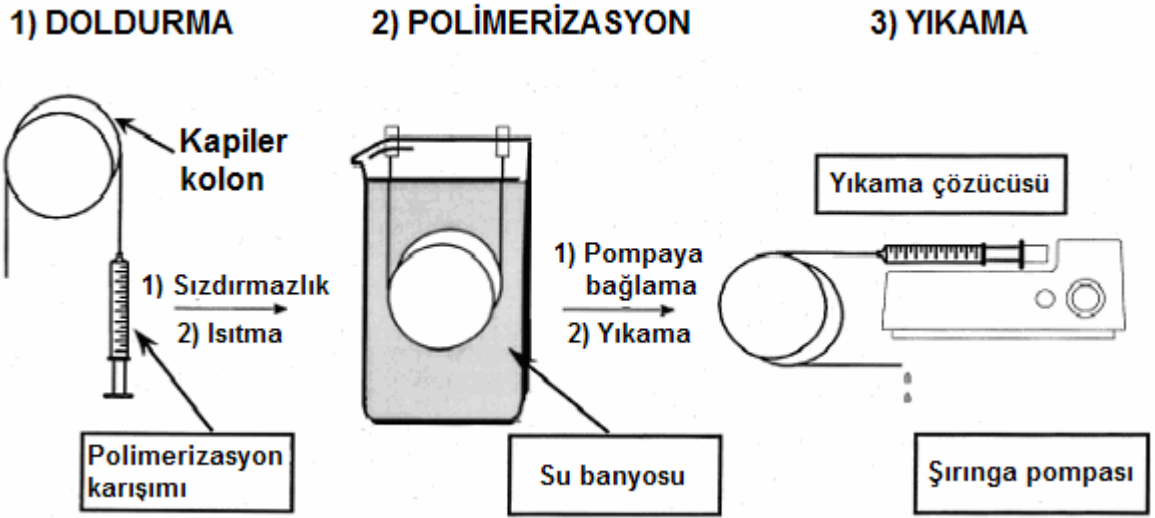
### 2.3.2. Poli(stiren) bazlı monolitler

Gusev ve arkadaşları klorometilstireni, divinilbenzeni metanol, etanol, propanol, toluen ve formamid gibi çözücülerin varlığında polimerleştirerek çeşitli poli(stiren) bazlı kolonlar elde etmişlerdir (Gusev, I. et al., 1999). Reaktif klorometil grupları N,N-dimetiloktilamin ile etkileştirilerek kolona quaternar amonyom işlevselliği kazandırılmıştır. Böylece kolon pozitif yüklü yüzey oluşturmuş, bazik ve asidik yapıları peptitlerin ayrımı sağlanmıştır. Kolon pozitif yüklü olduğundan analitlerin göçü elektroforetik mobiliteleri ile sağlanmıştır.

### 2.3.3. Metakrilat ester bazlı monolitler

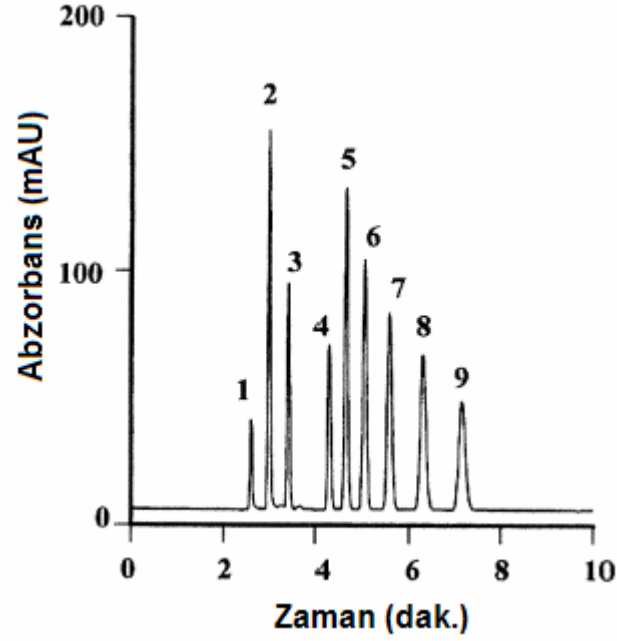
Akrilamid bazlı monolitlere oranla metakrilat ester bazlı monolitler daha fazla gelişme olanağı ve kromatografik uygulamalar için daha fazla optimizasyon

olanağı bulmuşlardır. Bu monolitlerin yapımı çok kolaydır. Silanizasyon işlemine tabi tutulmuş boş bir kolon polimerizasyon karışımı ile doldurulur ve dış bir ısıtma aracı ile ısıtılarak polimerizasyon gerçekleştirilir. Tipik ve yaygın bir CEC kolonu çapraz bağlayıcı olarak % 40 etilen dimetakrilat, % 59.7 bütil metakrilat ve % 0.3 2-akrilamido-2-metil-1-propansülfonik asit içerir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra dönüşmeyen monomerler ve gözenek yapıcı sistemindeki çözücüler bir şırınga pompası veya elektroozmotik akış ile atılırlar (Şekil 2.10). Bu basit metotun bazı avantajları vardır. Örneğin boş kolon herhangi bir silanizasyon işlemine tabi tutulmadan da kullanılabilir. Ancak monolit adhezi özelliğinin artırılması için silanizasyon işlemi kullanılabilir. Birçok kimyasal kullanmak mümkündür. Örneğin: serbest radikal başlatıcılar olan AIBN ve BPO oda koşullarında haftalarca saklanabilir. Gözenek yapıcı sisteminin bileşimi burada önem kazanmaktadır. İdeal olarak bu sistem: (i) hidrofilik AMPS (ii) hidrofobik bütil metakrilat ve etilen dimetakrilat gibi farklı polaritelere sahip monomerleri çözmeli ve homojen bir karışım elde edilmelidir.



**Şekil 2.10.** Kapiler kolon hazırlama prosedürü. (Svec, F. et al., 2000)

n-pranol ve 1,4-bütandiol gözenek yapıcı sistemi kullanılarak sentezlenen bir poli(bütil metakrilat-co-etilen dimetakriklat) kolonda pH 7 de benzen türevleri kısa bir sürede ayrılabilmiştir (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** Alkilbenzen türevlerinin ayrımı. Mobil faz: % 80 ACN-% 20 tampon, pH 7, UV. 215 nm, Uygulanan voltaj: 25 kV, Enjeksiyon: 5 kV 3s, Efektif kolon uzunluğu: 25 cm, Pik sırası: tiyoüre (1), benzil alkol (2), benzaldehid (3), benzen (4), toluen (5), etilbenzen (6), propilbenzen (7), bütilbenzen (8), amilbenzen (9). (Peters, E.C. et al., 1998)

#### 2.4. Polimerik Monolitlerin Sentez Yöntemleri

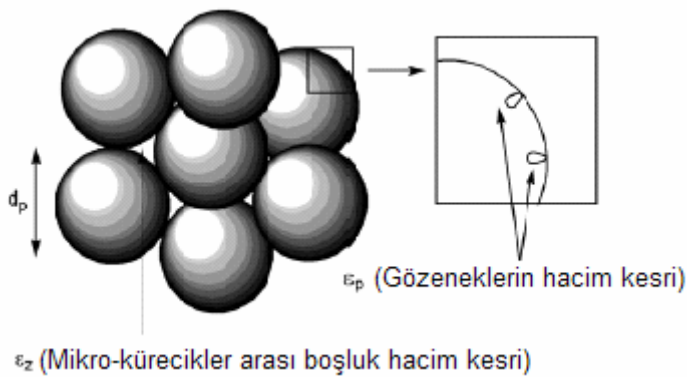
- Sıcaklık ile,
- UV,  $\gamma$ -ışınla ile,
- Elektron-ışını (EB) ile,
- Polikondenzasyon (policondensation) ile,
- Poliadiyon (poliaddition) ile,
- Superagaroz monolitler,
- Yarı canlı polimerizasyon teknikleri ile elde edilmiş monolitler

olmak üzere bir çok sentez yöntemi kullanılarak monolitler elde edilebilmektedir. Fakat bu yöntemlerden en çok kullanılanı sıcaklık ile yapılan yani termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonudur.

## 2.5. Termal Başlatıcılı Serbest Radikal Polimerizasyonu İle Üretilmiş Monolitler

### 2.5.1. Genel hususlar

1992 yılında Svec ve Frechet daha sonra “monolitler” olarak adlandırılacak olan “devamlı çubuklar” üzerine ilk yayınlarını bastılar (Svec, F. et al., 1992). Çalışmalarında glisidil metakrilat ve etilenglikol dimetakrilat sırasıyla monomer ve çapraz bağlayıcı; sikloheksanol ve dodekanol makro ve mikro-gözenek yapıcı olarak kullanmışlardır. AIBN ise polimerizasyon başlatıcısı olarak kullanılmıştır. Glisidil metakrilata ait epoksi grupları polimerizasyon sonrası fonksiyonlaştırma için kullanılmıştır. Bu epoksi grupları *vic*-diollere çevrilmiş ve bu dioller daha sonra dietilamin ile etkileştirilmiştir. Bu malzemelerle yapılan ilk ayırma işlemleri yeterli verimlilikte ve hızda gerçekleşmemiştir (miyoglobın, ovalbümin, sitokrom C ve lizozim için 35 dakika), fakat uygulanabilirliğinin olduğunu göstermiştir. Maalesef süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen gözenekli partiküller gibi bir yapı (sürekli gözeneklilik) monolitik materyallerde elde edilememiştir. Sonuçta oluşacak gözenek yapısının tahmini teoriye göre değil de daha çok deneyime dayanmaktadır. Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilmiş partiküller ile monolitlerin gözenek yapısındaki farklılık sadece ara yüzey gerilimi ile ilgili değildir. Monolit sentezi ile ilgili anlamlı bakış açıları oluşturmak ve bunları kavrayabilmek için birkaç parametre üzerinde tartışmak gereklidir. Şekil 2.12 monolit kompozisyonu hakkında bir fikir vermektedir.



**Şekil 2.12.** Bir monolit şematik çizimi ve  $d_p$ ,  $\epsilon_z$ ,  $\epsilon_p$  nin fiziksel anlamı. (Buchmeiser, M.R., 2007)

Monolitik yapı belli bir ortalama çapa ( $d_p$ ) sahip, birbirine bağlı mikro-küreciklerden oluşur. Bu mikro-kürecikler monolit sentezi sırasında büyüyen çekirdekçiklerin kimyasal olarak birbirine bağlanması sonucunda oluşur. Çok sayıda ve küçük çekirdekçik ile daha dar gözenekler ve bu gözenekler arasında daha küçük gözenek hacimleri oluşur. Toplam gözeneklilik, boşluk hacim kesri ( $\epsilon_z$ ) ve gözenek hacim kesri ( $\epsilon_p$ ) nin toplamıdır ( $\epsilon_t = \epsilon_z + \epsilon_p$ ).

$d_p$ ,  $\epsilon_z$ ,  $\epsilon_p$ ,  $\sigma$  (özgül yüzey alanı),  $\rho_{app}$  (görünen yoğunluk) değerleri üzerindeki etkin parametreler; polimerizasyon sıcaklığı ( $T_p$ ), başlatıcı miktarı, monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kimyasal yapıları (ör: polariteleri) ve gözenek yapıcıların polariteleridir. Sürekli ve gözenekli bir yapı elde edebilmek için polimerizasyon karışımı en az; bir tip çapraz bağlayıcı, iki tip gözenek yapıcıya (mikro-, makro-gözenek yapıcı) sahip olmalıdır. Fazladan bir tip monomerin eklenmesi gözenek yapısının kontrolünde yararlı olur. Kullanılacak gözenek yapıcıların doğası monomerin ve çapraz bağlayıcının kimyasal yapısına (ör: polarite) kuvvetle bağlıdır.

### 2.5.2. Polimerizasyon sıcaklığı

Polimerizasyon kinetiği üzerindeki en önemli parametre muhtemelen polimerizasyon sıcaklığıdır. AIBN nin  $70^{\circ}\text{C}$  de stiren içindeki bozunma yarı-ömrü 5.7 saat iken bu değer  $110^{\circ}\text{C}$  de 3.2 dakikadır. Hızlı bir başlatıcı dekompozisyonu daha fazla polimerik zincirin oluşması, dolayısıyla daha fazla faz ayırım prosesi nedeni ile daha fazla büyüyen çekirdekçik oluşması demektir. Bu faz ayırım prosesi, gözenek yapıcının doğası ve/veya polimerizasyon karışımındaki çapraz bağlayıcın miktarı ile tetikleniyor olabilir. “İyi” polimer çözücüleri mikro-gözenek yapıcı, “zayıf” polimer çözücüleri ise makro-gözenek yapıcı olarak davranırlar.

### 2.5.3. Gözenek yapıcı sistem

Faz ayırımı, gözenek yapıcı kompozisyonuna bağlı olarak, polimerizasyonun erken ya da daha geç basamaklarında tetiklenebilir. Bu bağlamda çapraz bağlayıcının ve makro-gözenek yapıcının yokluğu camsı, şeffaf yapıların oluşmasına neden olur.

Prensipte gözenek yapıcının seçimi monor(ler) in ve çapraz bağlayıcı(lar) ın polaritelerine bağlıdır. Apolar bütil metakrilat/etilen glikol dimetakrilat bazlı monolitler genelde sikloheksanol (mikro-gözenek yapıcı) ve dodekanol (makro-gözenek yapıcı) ile hazırlanırlar (Lee, D. et al., 2004). Fakat başka karışımlar; örneğin dimetil sülfoksit/dodekanol (veya su), n-propanol/1,4-bütandiol, metanol/THF da kullanılmıştır (Ishizu, K., et al. 2003). Alkol miktarının artması daha büyük gözenek oluşmasını sağlar. Akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid den türetilmiş monolitler dimetil sülfoksit (mikro-gözenek yapıcı) ve 2-heptanol (makro-gözenek yapıcı) ile hazırlanabilmektedir (Xie, S. et al., 2000). Ek olarak çeşitli poli(etilen glikol)ler kalıp olarak kullanılarak ortalama gözenek çapı artırılabilir. Apolar stiren-divinilbenzen (DVB) bazlı monolitler, dekanol (makro-gözenek yapıcı) ve (damıtılmış) THF (mikro-gözenek yapıcı); dodekanol (makro-gözenek yapıcı) ve toluen (mikro- gözenek yapıcı) veya saf dodekanol (makro-gözenek yapıcı) karışımlarının kullanılması ile elde edilebilirler (Legido-Quigley, C. et al., 2004). Bu organik gözenek yapıcılara alternatif olarak, etilen glikol dimetakrilat ve trimetilolpropan trimetakrilat türevli sistemlerde kullanılan süperkritik CO<sub>2</sub> gösterilebilir (Cooper, A.I. et al., 2000). Bu yöntemde faz ayrımının yalnızca monomer konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülürse saf makro-gözenekli ve makro-mezo-gözenekli yapıların eldesi sağlanabilir. Ayrıca bu yöntemle üretilen monolitlerin özgül yüzey alanlarının uygulanan CO<sub>2</sub> basıncına bağlı olduğu da gözlenmiştir.

#### **2.5.4. Yapının oluşumu**

Monolitlerin sentezinde görülen polimerizasyon prosesi 'Dispersiyon Polimerizasyonu' olarak geçmektedir. Bu polimerizasyon prosesinde, çöktürücü görevi gören gözenek yapıcı varlığında polimerizasyon başladığında oluşan polimer karışımdan ayrılır ve karışımda çözünmeyen çekirdekçikleri oluştururlar. Bu çapraz bağlanma prosesinin ve polimerin gözenek yapıcı karışımında çözünürlüğünün olmamasının bir sonucudur. Polimerizasyon prosesinin son safhalarında bile dönüşmemiş monomerlerin polimer zincirlerine afinitesi gözenek yapıcıya olan afinitesinden daha yüksektir ve polimeri çözücü ajan olarak görev yaparlar. Neticede polimerizasyon süreci boyunca çekirdekçikler monomer ve çapraz bağlayıcı ile şişer ve proses süresince karışımdan büyüyen çekirdekçiklere

sürekli bir geri dönme gözlemlenir. Yüksek monomer konsantrasyonundan dolayı polimerizasyon çekirdekçikler içerisinde karışımda olduğundan çok daha hızlı ilerler. Karışım içerisindeki belli bir büyüklüğe kadar olan dallanmış veya çapraz bağlanmış polimer zincirleri çekirdekçik tarafından daha da büyümek üzere tekrar alı konurlar. Görece daha erken safhalarda çekirdekçikler yüzeylerindeki reaktif gruplar sayesinde birleşirler (kopolimerizasyon). Bütün polimerizasyon prosesi sonunda küçük agregatlar kimyasal olarak birbirine bağlı mikro-küreciklerden oluşan sürekli formda, birbirine bağlı bir faz oluşturmak için yeterli büyüklüğe sahip olurlar. Sonuçta geniş çaplı mikro-küreciklerden oluşan ve büyük boşluk hacmine sahip bir monolitik sistem oluşur. Bu boşluk hacim kesri ve makro-gözeneklerin hacmi aşağı yukarı gözenek yapıcının hacim kesrine eşittir, fakat monomer dönüşümü %100 den çok küçük olduğunda bariz sapmalar gözlenir.

Gözenek oluşum prosesi uzayan zincirlerin gözenek yapıcı karışımında çözünürlüğüne bağlı olduğundan benzer monomerlerin gözenek oluşumunda aynı etkiyi göstermesi şaşırtıcı değildir. Çözünürlüğün ve faz ayrımının gözenek oluşumu üzerindeki etkisi tahmin edilebilmektedir ancak gözeneklilik ve gözenek boyu dağılımı için kesin bir teori ortaya konulamamaktadır ve hala rastgele olduğu düşünülmektedir.

#### **2.5.5. Gözeneklilik özelliklerinin kontrolü**

Serbest radikal polimerizasyonu ile elde edilmiş monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin kontrol edilmesini sağlayan en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Genelde polimerizasyon sıcaklığının artması ile gözenekler küçülür. Bu hem stiren/divinilbenzen hem de metakrilat bazlı monolitler için geçerlidir. Bunun nedeni polimerizasyon sıcaklığının artması ile büyüyen polimerik zincirlerin artması, sonuçta çözünmeyen çekirdekçiklerin oluşmasıdır. Çekirdekçik sayısındaki artış, çekirdekçik boyutlarının daha küçük olmasını ve dolayısı ile bu çekirdekçiklerden oluşan mikro-küreciklerdeki gözenek çaplarının daha düşük olmasını sağlar. Sıcaklığa ek olarak gözenek yapıcı kompozisyonu gözeneklilik kontrolünde büyük rol oynar. Makro-gözenek yapıcının miktarının fazla olması ortalama gözenek çapının artmasını sağlar. Bu ise sıcaklığın artırılması ile dengelenebilir. Son olarak monomerin çapraz bağlayıcıya oranı bir parametre olarak söylenebilir. Çapraz

bağlayıcı miktarının artırılması ile polimerizasyonun erken safhalarındaki çapraz bağlanma artacaktır. Bu, faz ayrımının erken safhalarda görünmesi, küçük çekirdekçiklerin fazla oluşması, oluşan çekirdekçiklerin monomerle ve/veya çözücü ile şişme özelliğinin azalması demektir. Sonuçta bu küçük çekirdekçikler birleşerek küçük gözenekli mikro-kürecikleri oluştururlar. Başka bir deyişle çok sayıda çekirdekçikten oluşan fazlasıyla agregate olmuş mikro-kürecikler oluşur. Bu agregasyon yüksek mikro-gözenekli, dolayısıyla 800 m<sup>2</sup>/g a kadar oluşan yüksek yüzey alanına sahip yapıların oluşmasını sağlar.

Monolitik malzeme sentezi için kullanılan yaklaşımlardan biri de “High Internal Phase Emulsion” (HIPE) polimerizasyon tekniğidir (Krajnc, P. et al., 2005). Bu sistem Krajnc ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. N,N'-metilenbisakrilamid, akrilik asit ve su bazlı, toluenin yağ fazı olarak kullanıldığı su-içinde-yağ sistemi ile “High Internal Phase Emulsion” polimerizasyonunu yöntem olarak kullanarak yüksek gözenekli monolit sentezlemişlerdir. Başlatıcının tipine bağlı olarak gözenek çapı 700 ve 1100 nm arasında değişen bir malzeme elde etmişlerdir.

### **2.5.6. Fonksiyonel grupların bağlanması**

Tamamen hidrokarbon veya akrilat bazlı monolitler mükemmel ayırma ortamları olmalarına rağmen, fonksiyonel grupların kullanılması spesifik uygulamalarda büyük önem taşır (ayırma, heterojen katalizleme). Genelde fonksiyonel grupların bağlanması için 2 farklı prosedür kullanılır: i) fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonu ii) polimerizasyon sonrası fonksiyonel grupların bağlanması.

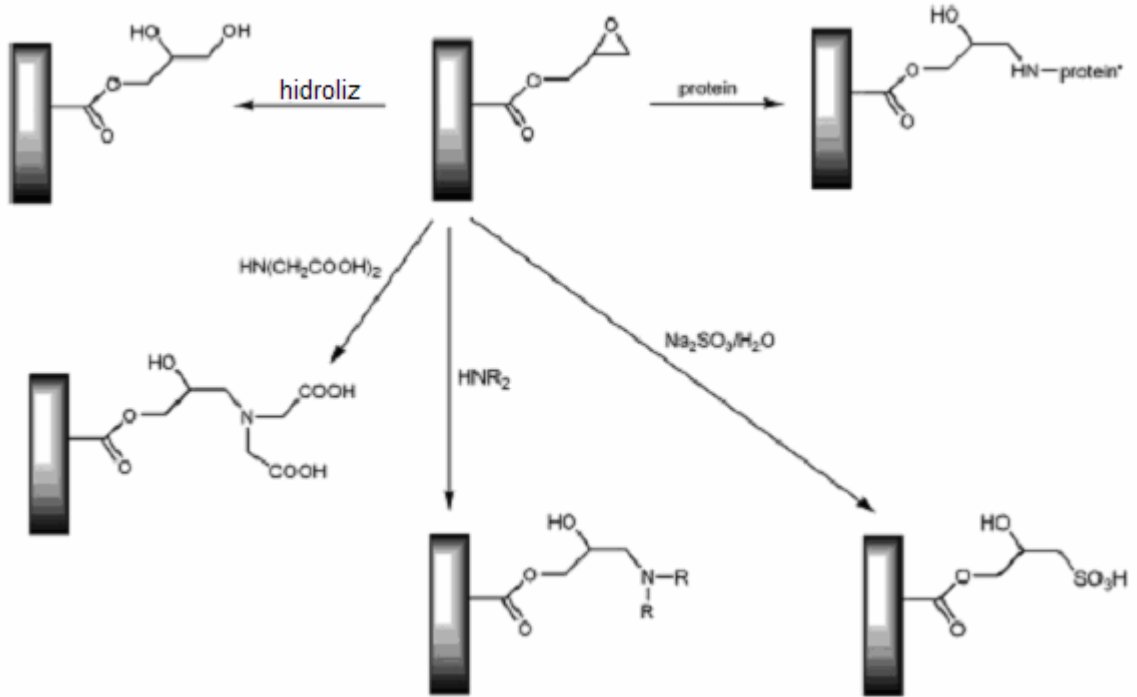
#### **2.5.6.1. Fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonu**

Fonksiyonel monolitlerin yapımının en basit yöntemi fonksiyonel monomerlerin monolit sentezi sırasında kopolimerleştirilmesidir. Bu bağlamda metakrilik asit, AMPS, vinilsülfonik asit, zwitteriyonik sülfobetainler, 2-vinyl-4,4-dimetilazlakton, kiral quinidine bazlı monomerler, dimetilaminoetil metakrilat veya C-18 silika kolonlarının taklidi için oktilmetakrilat kullanılmıştır. Zwitteriyonik fazın oluşturulabilmesi için asidik ve bazik metakrilik monomerlerin kullanılması mümkündür.

Basitliğine rağmen bu yöntem birçok dezavantaj barındırır. İlki; polaritedeki değişimden dolayı bütün monolit sentezinin istenilen gözeneklilikte yapının elde edilmesi için farklı monomerlere göre yeniden düzenlenmesidir. İkinci olarak fonksiyonel monomerin büyük bir kısmının gözeneksiz mikro-kürecikler içerisinde kalması gösterilebilir. Bu istenmeyen şişmelere, genellikle gradient ayırmalarda, neden olur ve zor sentezlenen ve pahalı monomerler için ekonomik olmaz. Ucuz ve kolayca istenilen sofistike bir gruba dönüştürülebilen fonksiyonel monomerlerin kullanımı alternatif olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Fakat gradient modda gerekli olan geri-basıncın değiştirilmesi için mobil fazın değiştirilmesi problemi olduğu gibi kalmaktadır.

### 2.5.6.2. Polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması

Polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması için kullanılan en yaygın monomer, çeşitli fonksiyonlaştırma tepkimelerine olanak sağladığından dolayı glisidil metakrilattır (GMA) (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** Glisidil metakrilat bazlı monolitlere polimerizasyon sonrası fonksiyonel grup bağlanması. (Buchmeiser, M. R., 2007)

Monolit sentezi tamamlandıktan sonra bu monomer hidroliz olarak diol grupları sağlar veya ikincil aminlerle (dietilamin) tepkimeye sokularak aminohidroksil gruplarını oluştururlar. Böylece yüzeyi modifiye edilmiş monolitler oligotimidilik asitlerin iyon-değişim kromatografisinde kullanılabilir. Eğer monolit iminodiasetik asit ile etkileştirilirse immobilize metal afinite kromatografisinde kullanılabilir. Glisidil grupları  $\epsilon$ -amino işlevselliği ile proteinlerin immobilizasyonu için kullanılabilir. Stiren bazlı monolitlerde 4-klorometilstiren polimerizasyon sonrası fonksiyonel grupların bağlanmasında en çok tercih edilen monomerdir. Bu monomer stiren ile kopolimerizasyon parametreleri birbirine yakın olduğundan kopolimerleştirilebilir. Aminlerle etkileştirme sonucunda amin grubu ya da tersiyer aminlerle etkileşmesi durumunda amonyum grubu işlevselliği kazandırılabilir. Yüksek hidrofobikliğe sahip yüzeyler 1,2-etilen diimin ve  $\gamma$ -glukuronolakton ile etkileştirilmesi ile elde edilebilir. Yüzeyin alkilenmesi için ayrıca Friedel-Crafts alkilleme tepkimeleri kullanılabilir.

Kopolimerizasyona alternatif olarak aşılama (grafting) da kullanılabilir. Burada ana monolitin tek bir (optimize edilmiş) monomer/çapraz bağlayıcı/gözenek yapıcı sistem kullanarak hazırlanması avantaj olarak karşımıza çıkar. Aşılama prosedürü sırasında ana monolitin polaritesinde herhangi bir değişim meydana gelmez, bu da ayırma prosesi için büyük bir avantajdır. Bütil metakrilat/Etilen dimetakrilat bazlı monolitlerin foto-aşılması (photo-grafting) ile ilgili çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Örneğin bir çalışmada 2-vinyl-4,4-dimetilazlakton aşılması ile tripsin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Peterson, D.S. et al., 2003). Başka bir çalışmada ise poli(bütil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) monolit üzerine önce iyonlaşabilen ve EOF oluşmasını sağlayan bir monomer olan AMPS foto-aşılansmış, daha sonra bu tabakanın üzerine ise hidrofobik bir monomer olan bütilakrilat foto-aşılansmıştır. Sonuçta monolitin iyonik tabakası ile iyonik analitlerin etkileşimini engelleyen ve ultra-hızlı ayırım sağlayan bir koruyucu tabaka oluşturulmuştur.

## 2.6. Monolit Özelliklerinin Ayırma Üzerindeki Etkisi

### 2.6.1. Gözenek boyutu ve verimlilik

CEC'de elektroozmotik akış hızı

$$u_{eo} = \varepsilon_0 \varepsilon \zeta E / \eta \quad (2.1)$$

eşitliği ile verilir. Burada  $\varepsilon_0$  vakumun permitivitesi,  $\varepsilon$  mobil fazın dielektrik sabiti,  $\zeta$  elektriksel çifte tabakanın zeta potansiyeli,  $\eta$  mobil fazın kolon dolgu malzemesi duvarı üzerindeki viskozitesidir, E ise elektrik alanı kuvvetidir. ( $E = V/L$ , V: Uygulanan voltaj, L: Kolon boyu).

Eşitlik 1'de partikül veya gözenek ile ilgili herhangi bir parametre olmadığından elektroozmotik akış hızı ile herhangi bir bağlantı bulunmamaktadır.

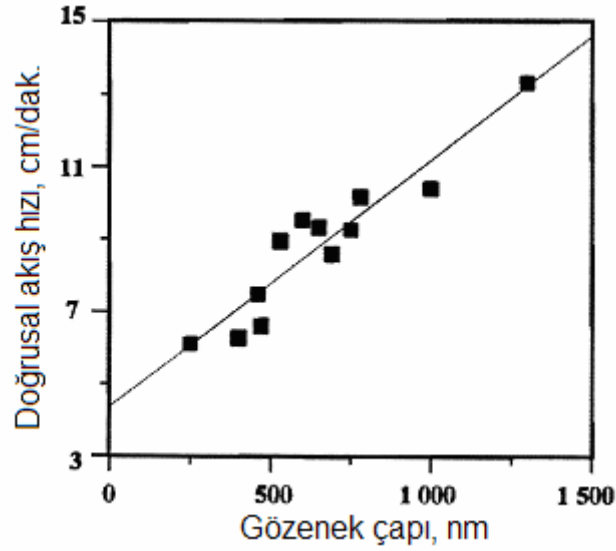
Ancak partikül dolgulu kolonlarda verimliliğin partikül çapı ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Monolitlerde ise partikül çapı olmadığından, monolitik materyal içerisindeki, akışın olduğu ve polimerizasyon parametrelerinin optimizasyonu ile değiştirilebilen gözenek boyutunun kromatografik verimliliği üzerinde etken olduğu düşünülmektedir. Kabul edilebilir verimliliğe sahip kapiler kolonlar ile ilgili birçok parametre tanımlanmıştır fakat bu etkinin kompleksliğinden dolayı henüz keşfedilmemiş kalmaktadır.

### 2.6.2. Monolitik kolon boyunca mobil faz akışı

Eşitlik 1'e göre elektroozmotik akış hızı partikül boyundan ve partiküller arası boşluk büyüklüğünden bağımsızdır. Fakat CEC için bu yaklaşım yanıltıcıdır. CEC'te akışa karşı dirence küçük gözenekli ya da gözeneksiz silika monolitlerde rastlanmamıştır. Partikül boyutundaki bir azalış yüzey alanının artmasını, dolayısıyla yüklü gruplarının sayısının artmasını sağlamaktadır. Elektroozmotik akış hızı yüklü grupların sayısı ile doğru orantılı olduğundan, partikül çapındaki azalmanın neden olduğu akışa karşı direnç kompanse edilmiş olur. Buna rağmen

partikül dolgulu kolonlarda dolgunsuz kolonlara göre EOF'de % 60 lık bir azalmanın olduğu gözlenmektedir.

Metakrilat ester bazlı monolitlerde gözenek çapı ve yüklü grupların sayısının kontrolünün kolay olması akışın olduğu kanalların büyüklüğünün akış hızına etkisini izlemeyi kolaylaştırmaktadır. Şekil 2.14 gözenek çapının akış hızı ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir.

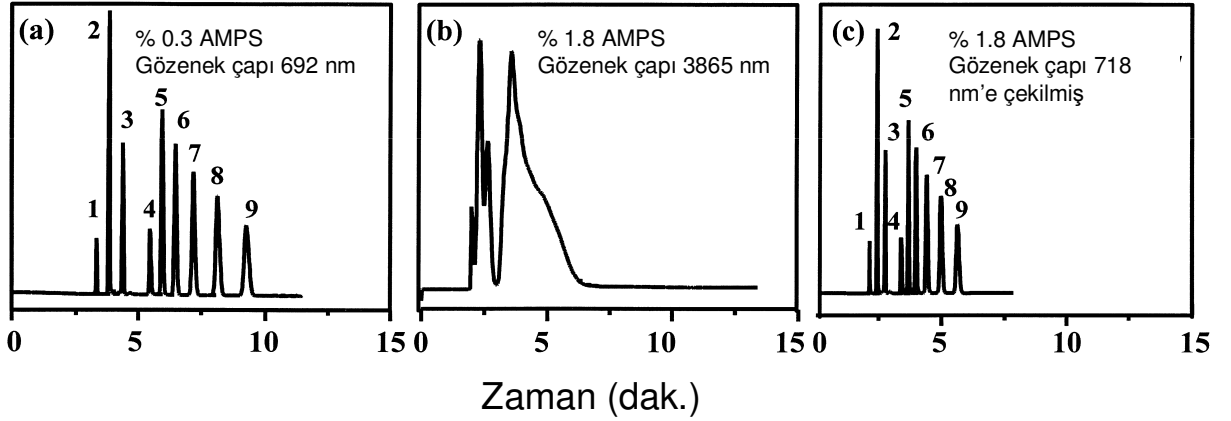


**Şekil 2.14.** Gözenek çapı ve doğrusal akış hızı arasındaki ilişki. (Svec, F. et al., 2000)

### 2.6.3. Yüzey kimyasının kontrolü (yüklü gruplar)

Elektroozmotik akış hızı yüzey yük yoğunluğu ile doğru orantılı olan zeta potansiyeli ile doğru orantılıdır. Silika bazlı monolitlere göre polimerik monolitlerde daha kolay olan yüzey yük yoğunluğunun kontrolü sayesinde akış hızının da kontrolü sağlanmış olur. Yüzeydeki yük yoğunluğu iyonlaşabilen monomerin yoğunluğunun değiştirilmesi ile ayarlanabilir. Bunu test etmek için % 0.3-1.8 aralığında AMPS kullanılarak yapılan analizlerin sonucu Şekil 2.15'te gösterilmektedir (Svec, F. et al., 2000). İlk iki kromatogram yük yoğunluğunun değiştirilmesi ile elde edilmiştir. Beklendiği gibi akış hızı artan yük yoğunluğu ile artmıştır. Bunu kolonda tutunmayan tiyoürenin alıkonma zamanlarını karşılaştırarak görebiliriz. Ayrıca AMPS miktarındaki artış gözenek boyutunun

artmasına dolayısıyla analitlerin kolonla etkileşiminin azalmasına ve ayırım gerçekleşmeden kolondan çıkmalarına neden olmaktadır. Gözenek boyutunun ilk kromatogramın elde edildiği gözenek boyutuna çekilmesi ile hem tatmin edici ayırımın hem de AMPS miktarının artması ile gelen kısa analiz süresinin (yüksek akış hızı) elde edilmesini sağlamıştır.



**Şekil 2.15.** AMPS derişiminin ayırım üzerindeki etkisi. (Svec, F. et al., 2000)

#### 2.6.4. Alıkonma ve seçicilik (polarite)

Şimdiye kadar rapor edilen çoğu CEC ayırımı ters-faz modunda elde edilmiştir. Sabit fazın hidrofobitesini ayırımdaki seçiciliği sağlar ve mobil fazın kompozisyonu veya sabit faz yüzeyinin hidrofobitesini ile oynayarak analitlerin alıkonma süreleri değiştirilebilir. Mobil fazın kompozisyonu ile oynamak diğerine göre daha kolaydır. Çoğu CEC uygulamalarında düşük viskoziteye ve yüksek dielektrik sabitine sahip olduğundan dolayı Asetonitril kullanılmaktadır. Çok az sayıda araştırmada sabit fazın yüzey kimyasıyla oynanmıştır. Palm ve Novotny çeşitli alkil zincirleri uzunluğuna sahip kolonlar sentezlemişlerdir (Palm, A. et al., 1997). Fakat bütül, heksil ve dodesil metakrilat grupları içeren bu kolonlar karşılaştırmalı olarak kullanılmamıştır. Bu yüzden yüzey kimyasının seçiciliğe etkisi incelenememiştir.

#### 2.7. CEC'te Kullanılan Kolon Türlerinin Karşılaştırılması

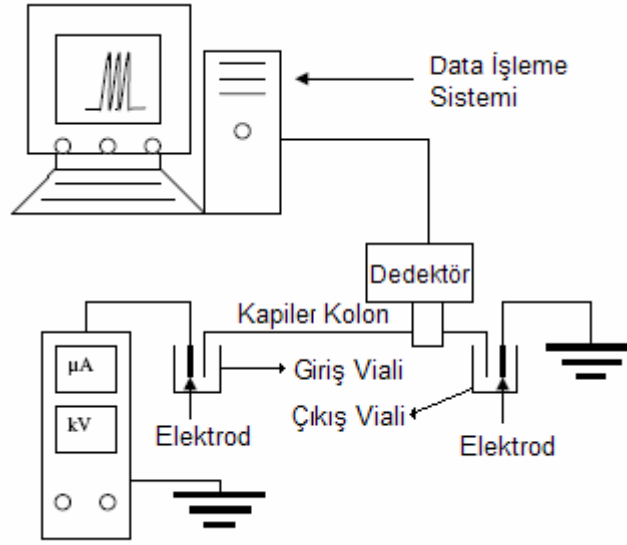
Açık-tübüler kolonlarda fritlere ihtiyaç duyulmadığından dolayı kabarcık oluşumu ile karşılaşmaz. Kolon uzunluğu istenilen uzunlukta seçilebilmektedir. Küçük çaplı kapiler kolonlar kullanılarak mükemmel kütle duyarlılığına ulaşılabilir. Bu

kolonlarda ısının kolondan uzaklaşması daha kolay olduğundan daha yüksek gerilimler uygulanabilir, bu yüzden dolgulu kolonlara oranla daha yüksek EOF değerlerine ulaşılabilir. Kolon üzerinde UV gözetlemesi daha güçtür çünkü optik yol kolon çapı küçük olduğundan kısadır. Ayrıca bu kolonlarda yüzey alanının düşük olmasından dolayı örnek kapasitesi dolgulu kolonlardan daha azdır.

Partikül dolgulu kolonlar yüksek yüzey alanı sayesinde yüksek örnek kapasitesine sahiptir. Hem yüklü hem de ayırım için gereken spesifik gruplar içerirler, bu da seçiciliğin artmasını sağlar. Büyük gözenekli, düşük çaplı partikül dolgulu kolonlarda ayırım verimi yüksekken, küçük gözenekli, büyük çaplı kolonlarda daha düşüktür. Sıkı ve homojen bir şekilde doldurulmuş kolon elde etmek önemlidir, aksi takdirde yüksek gerilimler uygulandığında yüklü partiküller bir araya gelerek diğer bölgelerde boşlukların oluşmasına yol açarlar. Fritlerin zorunluluğu kolon uzunluğunu ayarlama ve kabarcık oluşumunu önlemede zorluk çıkarmaktadır. Ayrıca bu fritler kolayca kontamine olabilirler veya tıkanmaya yol açabilirler, ayrıca tekrarlanabilirlikleri de çok düşüktür.

Monolitik kolonların tek bir basamakta yapılabilmeleri büyük bir avantajdır. Bu kolonlarda fritlerin yokluğu akış direncini artırmakta ve kabarcık oluşumunu önlemektedir. Çok çeşitli kimyasal özellikte kolon sentezlenebilmektedir. EOF büyük bir monomer aralığı için neredeyse sabittir. Yüklü grupları yoğunlaştırarak ve büyük gözenekli malzemeler sentezleyerek yüksek EOF değerlerine ulaşılabilir. Monolitik kolonlar 0-14 pH aralığında kimyasal ve mekanik olarak kararlıdır. 500.000 m<sup>-1</sup> e kadar teorik tabaka sayılarına ulaşılabilir. Dezavantaj olarak yumuşak monolitik malzemelerin bazı çözücülerde şişmesi veya çoğu monolitin termal radikal polimerizasyonu ile elde edilmesinden dolayı tekrarlanabilirliğinde düşüklük söylenebilir. Fakat bu da UV ile polimerizasyonun kullanılması ile ortadan kaldırılabilir. Monolit içerisinde küçük çaplı gözeneklerin oluşumu verimliliği ve pik simetrisini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca monolitlerde büyük gözeneklerden dolayı yüzey alanı düşüktür, bu yüzden de örnek kapasitesi partikül dolgulu kolonlara göre daha düşüktür.

## 2.8. CEC Sistemi



**Şekil 2.16.** CEC Sistemi.

Bir CEC sisteminde genel olarak 6 kısım bulunur. (1) Kapiler kolon, (2) Güç kaynağı, (3) Detektör, (4) Örnek ve mobil faz vialleri, (5) Pompa, (6) Data işlemcisi (Şekil 2.16). Kapiler kolonlar 50-200  $\mu\text{m}$  iç çapa sahip silika malzemeden yapılmışlardır. Bu kolonların içi cam, dışı ise poliimid bir tabaka ile çevrilidir ve bu tabaka kolonun mekanik dayanıklılığını sağlar. Bölüm 2.2.'de anlatılan kolon dolgu malzemeleri ile doldurulan bu kolonlar kromatografik bir ayırma ortamı sağlarlar. Elektroozmotik akışı sağlayan elektrik alanı ise güç kaynağı tarafından 0-30 kV aralığında gerilim uygulanarak sağlanır. Bu güç kaynağı giriş vialine ve giriş platin elektroduna doğrudan bağlıdır ve gerilim buraya uygulanır. Çıkış vialisi ise topraklama sistemine bağlıdır. Bazı uygulamalarda kabarcık oluşumunun önlenmesi için gerilime ek olarak her iki vialde de basınç uygulanabilir. Bu sistemlerdeki pompalar ise en fazla 12 bara çıkmaktadır, yüksek basınçlara çıkabilen pompalar kullanılmamaktadır. Detektörün kapiler kolonun içerisini görebilmesi için kapiler kolonun etrafındaki poliimid tabaka mikro-torch yardımı ile sıyrılır ve genellikle 2 mm uzunluğunda bir gözetleme penceresi açılır. Kolon üzerinde gözetleme için en çok UV-Vis veya floresan detektör kullanılır. Kolon sonrası gözetleme ise kütle spektrometresi veya nükleer manyetik rezonans spektrometresi detektörü ile yapılır. Modern CEC sistemlerinde "Auto-sampler"

bulunmaktadır. Bu sistemlerde örnek vialine kısa sürelerde gerilim uygulanması ile örneğin kolon içerisine girmesi sağlanır. Genellikle 5 kV'tan daha az gerilimler 1-5 saniye aralığında uygulanır. Ayrıca basınçla da örnek kolona enjekte edilebilir. Ancak dar kapilerden örneğin basınçla yollanması yüksek geri basınçtan dolayı daha zordur. Bu yüzden genelde "Elektrokinetik enjeksiyon" denen örnek vialine gerilim uygulama yöntemi kullanılır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında Kapiler Elektrokromatografi için yeni polimer bazlı monolitik kolonlar sentezlenmiş ve kolonların kromatografik performansları değerlendirilmiştir. Bu amaçla öncelikle, literatürde sıkça kullanılan bir monomer seçilmiştir. Daha sonra ise literatürde bulunmayan, daha önce denenmemiş hidrofilik veya hidrofobik özellikte monomerler seçilmiştir. Dolayısıyla tezi üç kısma ayırmak mümkündür.

Birinci kısımda bütül metakrilat (BMA) bazlı monolitik kolonların sentezlenmiştir. Bunun nedeni BMA bazlı monolitlerin CEC sisteminde kromatografik ayırma için yaygın olarak kullanılmasıdır. Literatürde BMA bazlı monolitlerin sentezi için termal yolla veya UV ile başlatılan serbest radikal polimerizasyonuna dayalı birkaç sentez yöntemi bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler patentli olup, uygulanabilecek formda tanımlanmış değildir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, BMA bazlı monolit sentezi için yeni bir gözenek yapıcı sistemi önerilmiştir. Yaygın olarak kullanılan 1,4-bütandiol/n-propanol gözenek yapıcı sistemi yerine farklı bir gözenek yapıcı sistemi, DMF/Etilen glikol/Tampon kullanılmıştır. Sentezlenen bu kolonun kromatografik performansı değerlendirilmiş ve literatürdeki kolonlarla karşılaştırması yapılmıştır.

İkinci kısımda ise daha önce denenmemiş hidrofobik özelliğe sahip bir monomer seçilmiştir. İlk kez flor grubu içeren hidrofobik bir monomer (2,2,2-trifloroetil metakrilat, TFEM) kullanılarak monolitik kolonlar sentezlenmiştir. F grubunun varlığı, organik bileşiklerin polaritesinde bir değişim meydana getirmektedir. F grubu içeren polimer bazlı bir monolitin, akrilik ve stiren bazlı klasik monolitlere göre farklı bir polariteye sahip olacağı açıktır. Bu kolonun sentez aşamasından sonra kromatografik performansı incelenmiş ve literatürdeki kolonlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu kısımda yaygın olarak kullanılan, kapiler tüplerin monolit sentezine uygun forma getirilmesi işlemi yerine farklı bir yöntem önerilmiştir. Kolay bağlanma (Click chemistry) temeline dayanan bu modifikasyon yönteminde propargil akrilat (PA) monomerinin de kullanımıyla kolon hidrofobitesinde değişim sağlanmıştır.

Üçüncü kısımda ise ilk kez polietilen glikol (PEG) bazlı hidrofilik bir monomer kullanılarak, kapiler monolitik kolonların sentezi gerçekleştirilmiştir. Polietilen glikol zincirinin varlığı, monolit polaritesinde bir artış meydana getirmektedir. Böylece polar formdaki monolitlerin sentezi ve kromatografik performanslarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kısımda kullanılan monomerin adı poli(etilen glikol)fenileter akrilat'tır.

### 3.1. Materyal

Monomer olarak kullanılan bütil metakrilat (BMA), 2,2,2-trifloroetilmetakrilat (TFEM), poli(etilen glikol)fenileter akrilat (PEGPEA), propargil akrilat (PA) (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.), 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM), : 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit (AMPS) ve çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDM) (Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.) alındığı şekliyle kullanılmıştır. Gözenek yapıcı çözümleri olarak, dimetil formamid, etilen glikol, izoamilalkol, 1,4-bütandiol, n-propanol kullanılmıştır. n-propanol E. Merck AG, Almanya'dan, diğer çözümler de Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den temin edilmiştir. Monolit sentezinde başlatıcı olarak 2,2-azobisisobutironitril kullanılmıştır. Monolitlerin sentez sonrası yıkanması amacıyla mobil faz olarak mutlak metanol veya mutlak (Riedel de Haen, Almanya) kullanılmıştır. Kromatografik çalışmalarda yine aynı firmadan temin edilen HPLC grade asetoneitril (ACN) kullanılmıştır. Mobil faz için kullanılan fosfat tamponu Sodyum dihidrojen fosfat (Merck A.G. Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Kromatografik çalışmalarda distile-deiyonize su kullanılmıştır. Kromatografik ayırmada kullanılan tiyoüre, benzen, etilbenzen, propilbenzen, bütilbenzen, fenol, katekol, 3-nitrofenol, 3,5-dinitrofenol, 4-aminobenzoik asit, p-toluik asit, 4-iyodobenzoik asit, 2-nitroanilin, 3-nitroanilin, 2,4-dinitroanilin, 3,5-dinitroanilin Aldrich. Chem. Co. WI, A.B.D.'den ve toluen ise Riedel de Haen, Almanya'dan temin edilmiştir.

## 3.2. Kapiler Tüplerin Monolit Sentezine Uygun Forma Getirilmesi

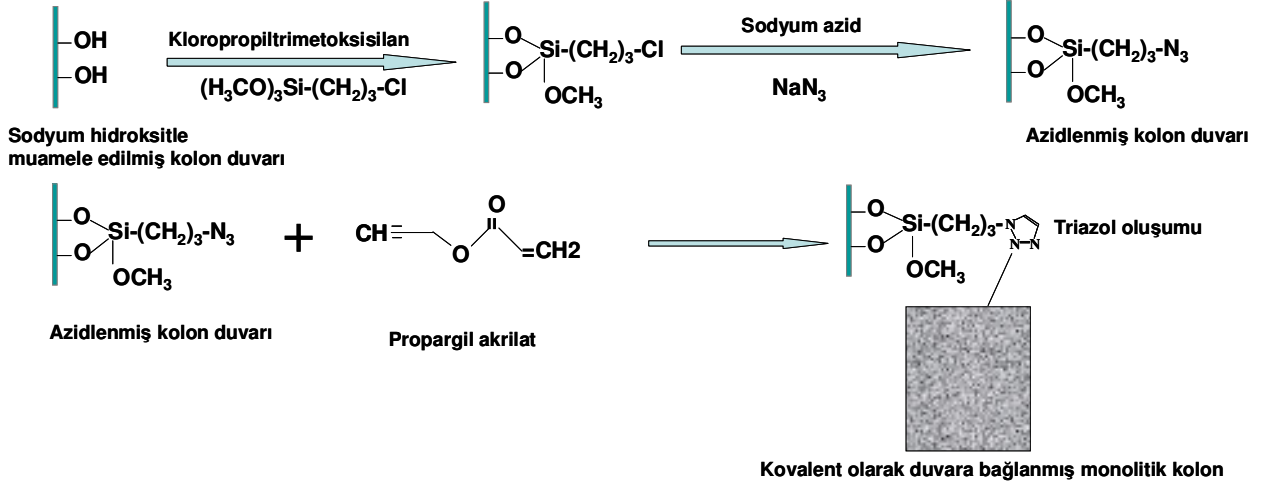
### 3.2.1. Standart kapiler kolon duvar modifikasyon prosedürü

Silika tüp, iç yüzeyinde hidroksil gruplarının oluşması amacıyla 0.2 M NaOH çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu işlem CEC sisteminde giriş vialine 2 bar basınç uygulanarak 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Takiben silika kapiler kolon distile su ve metanol ile aynı yöntemle 30'ar dakika süre ile yıkanmış ve içerisinden 1 saat süreyle azot gazı geçirilerek kurutulmuştur. Kurutulmuş tüp 3-trimetoksisililpropil metakrilat'ın (TMSPM) metanol ile hazırlanan % 50 (hacimce) çözeltisi ile yine aynı yöntem kullanılarak 15 dakika süreyle yıkanmıştır. İşlemin son basamağında basınç uygulaması durdurularak, kapiler tüpün TMSPM çözeltisi ile dolu durumda kalması sağlanmıştır. Kapiler tüpün her iki ucu GC septum ile kapatılarak, 35°C'daki su banyosuna yerleştirilmiş ve 24 saat süreyle burada bekletilmiştir. Böylece TMSPM'nin 3-trimetoksisilil grupları ile kapilerin hidroksil grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu silika yüzeyinde kimyasal bağlı ve polimerleşebilir "metakrilat" gruplarının yerleştirilmesi sağlanmıştır.

### 3.2.2. "Kolay bağlanma" (Click Chemistry) bazlı kapiler kolon duvar modifikasyon prosedürü

'Kolay bağlanma' yı baz alan yeni bir kapiler kolon duvar modifikasyonu ise poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolit sentezinde kullanılmıştır (Bölüm 4.2.2). Bu işlemde kolon standart prosedürde olduğu gibi 1 saat süreyle 0.2 M NaOH çözeltisi ve 30'ar dakika distile su ve metanol ile yıkanmış, daha sonra klasik yöntemden farklı olarak 3-trimetoksisililpropil metakrilat'ın (TMSPM) metanol ile hazırlanan % 50 (hacimce) çözeltisi yerine kloropropiltrimetoksilan'ın toluen ile hazırlanan % 50 (hacimce) çözeltisi ile 15 dakika yıkanıp, her iki ucu GC septumlarıyla kapatılmış ve 35°C'de su banyosunda 1 gün bekletilmiştir. Böylece Şekil 3.1'de görüldüğü gibi kolon duvar yüzeyi klorlanmaktadır. Ertesi gün kolon DMF ile 30 dakika yıkanmış ardından 2 ml DMF/1.3 ml distile su/0.4 g NaN<sub>3</sub>/5 mg tetrabutylamonyum iyodür çözeltisi ile 15 dakika süreyle yıkanmış ve kolonun her iki ucu tekrar GC septumları ile kapatılmış ve 80°C su banyosunda 1 gün bekletilmiştir. Böylece kolonun duvarındaki klor grupları NaN<sub>3</sub> bileşiğinden gelen

$N_3$  grupları ile yer değiştirmektedir. Polimerizasyon çözeltisindeki propargil akrilat monomerinin sahip olduğu alkin grupları  $N_3$  gruplarıyla birleşerek triazol halkası oluşturmakta ve monolitin kolon duvarına yapışması sağlanmaktadır. Bu işlemin mekanizması Şekil 3.1’de gösterilmektedir.

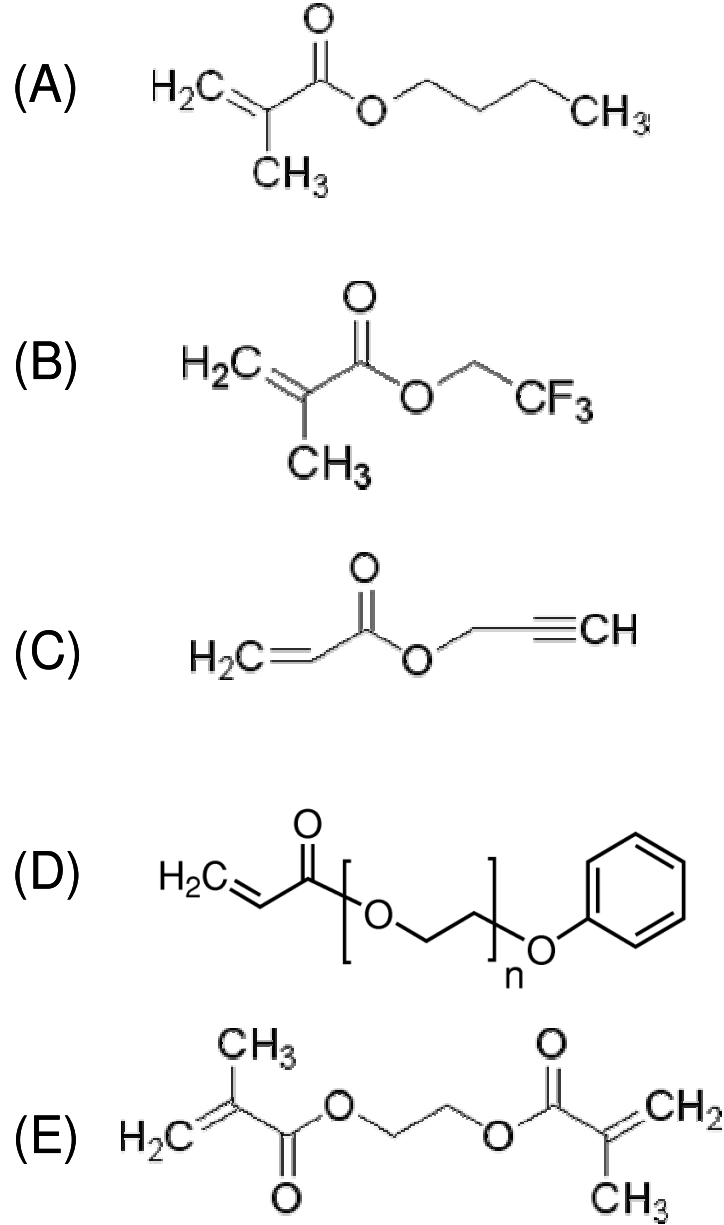


**Şekil 3.1.** Poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolitin kapiler kolon duvarına “Kolay bağanma” bazlı yapışma prosedürü

### 3.3. Monolit Sentezi

Monomer, çapraz bağlayıcı, gözenek yapıcı bileşenler ve başlatıcıyı içeren döküm çözeltisi, CEC sisteminin “giriş vialine”ne konmuş ve, 100  $\mu$ m iç çap ve 40 cm uzunluğa sahip kapiler tüp, dikey konumlandırılarak, giriş vialine 10 mbar basınç uygulanmıştır. Sıvı kapiler tüp içerisinde hedeflenen yüksekliğe ulaştığında (kapiler tüpün hedeflenen 30 cm’lik kısmı dolduğunda) basınç uygulama işlemi durdurularak, kolon CEC sisteminden ayrılmış ve her iki ucu GC septumları ile kapatılarak, monolit oluşumu için polimerizasyon işlemine alınmıştır. Polimerizasyon sıcaklık kontrollü bir su banyosu içerisinde 50°C sıcaklıkta, 24 saat süre ile yapılmıştır. Sentez sonrasında monolitten gözenek yapıcı karışımının uzaklaştırılması için hızı ayarlanabilir bir şırınga pompa kullanılarak mutlak etanol ile monolit 6 saat süreyle yıkanmıştır. Takiben kolon 80/20 oranında Asetonitril/5 mM fosfat tamponu içeren pH 7 değerine sahip mobil faz ile 2 saat süreyle yıkanmıştır. Gözetleme penceresinin oluşturulması için kapiler kolon uygun noktasından 2 mm’lik açıklığa sahip bir alüminyum maskeye yerleştirilmiş ve

açıkta kalan kısmı bir mikro-torch ile yaklaşık 5 saniye yakılmıştır. Bu işlemden sonra aynı mobil faz ile polimer küllerinin kolondan atılması amacı ile yıkama işlemine 1 saat süreyle devam edilmiştir. Yıkama işlemi tamamlanmış olan kolon CEC sistemine yerleştirildikten sonra 2 bar basınç uygulanarak 3 saat daha sonra 10 kV voltaj varlığında 1 saat süreyle, kromatografik deneylerde kullanılacak mobil faz ile yıkanmıştır. Kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları Şekil 3.2'de ve farklı yapıda monolitlerin elde edilmesi için uygulanan deney koşulları Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4'te verilmektedir.



**Şekil 3.2.** Kullanılan monomerlerin yapıları. (A) BMA, (B) TFEM, (C) PA, (D) PEGPEA, (E) Çapraz bağlayıcı: EDM

**Çizelge 3.1.** BMA bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları

| BMA (mL) | EDM (mL) | DMF (mL) | EG (mL) | FT (mL) | AIBN (mg) | AMPS (mg) |
|----------|----------|----------|---------|---------|-----------|-----------|
| 0.75     | 0.25     | 1.80     | 0.90    | 0.35    | 10.0      | 4.0       |
| 0.75     | 0.25     | 1.90     | 0.80    | 0.35    | 10.0      | 4.0       |
| 0.75     | 0.25     | 2.00     | 0.70    | 0.35    | 10.0      | 4.0       |
| 0.75     | 0.25     | 2.10     | 0.60    | 0.35    | 10.0      | 4.0       |
| 0.75     | 0.25     | 2.20     | 0.50    | 0.35    | 10.0      | 4.0       |

BMA: Bütil metakrilat, EDM: Etilen dimetakrilat, DMF: Dimetilformamid, EG: Etilen glikol, FT: 5 mM, pH 7 fosfat tamponu, AIBN: 2,2'-azobisisobutironitril, AMPS: 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit.

**Çizelge 3.2.** TFEM bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları

| TFEM (mL) | EDM (mL) | IAA (mL) | BD (mL) | AMPS (mg) | AIBN (mg) |
|-----------|----------|----------|---------|-----------|-----------|
| 0.25      | 0.07     | 0.33     | 0.27    | 1.0       | 3.0       |
| 0.25      | 0.07     | 0.40     | 0.20    | 1.0       | 3.0       |
| 0.25      | 0.07     | 0.45     | 0.15    | 1.0       | 3.0       |
| 0.25      | 0.07     | 0.50     | 0.10    | 1.0       | 3.0       |
| 0.25      | 0.07     | 0.55     | 0.05    | 1.0       | 3.0       |

TFEM: 2,2,2-Trifloroetil metakrilat, EDM: Etilen dimetakrilat, IAA: İzoamil alkol, BD: 1,4-bütandiol, AIBN: 2,2'-azobisisobutironitril, AMPS: 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit.

**Çizelge 3.3.** TFEM-co-PA bazlı monolit sentezi için uygulanan deney koşulları

| TFEM (mL) | PA (mL) | EDM (mL) | IAA (mL) | BD (mL) | AMPS (mg) | AIBN (mg) |
|-----------|---------|----------|----------|---------|-----------|-----------|
| 0.20      | 0.05    | 0.07     | 0.50     | 0.10    | 1.0       | 3.0       |

TFEM: 2,2,2-Trifloroetil metakrilat, EDM: Etilen dimetakrilat, PA: Propargil akrilat, IAA: İzoamil alkol, BD: 1,4-bütandiol, AIBN: 2,2'-azobisisobutironitril, AMPS: 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit.

**Çizelge 3.4.** PEG bazlı monolitler için uygulanan deney koşulları

| PEGPEA (mL) | EDM (mL) | AMPS (mg) | Pr-OH (mL) | BD (mL) | FT (mL) | AIBN (mg) |
|-------------|----------|-----------|------------|---------|---------|-----------|
| 0.75        | 0.25     | 4.00      | 1.90       | 0.80    | 0.35    | 10.0      |
| 0.75        | 0.25     | 4.00      | 2.00       | 0.70    | 0.35    | 10.0      |
| 0.75        | 0.25     | 4.00      | 2.10       | 0.60    | 0.35    | 10.0      |
| 0.75        | 0.25     | 2.00      | 2.00       | 0.70    | 0.35    | 10.0      |
| 0.75        | 0.25     | 4.00      | 2.00       | 0.70    | 0.35    | 10.0      |
| 0.75        | 0.25     | 8.00      | 2.00       | 0.70    | 0.35    | 10.0      |

PEGPEA: Poli(etilen glikol)fenileter akrilat, EDM: Etilen dimetakrilat, AMPS: 2-akrilamido,2-metilpropan sülfonik asit, Pr-OH: n-propanol, BD: 1,4-bütandiol, FT: 5 mM pH 7 fosfat tamponu, AIBN: 2,2'-azobisisobutironitril.

### **3.4. Monolit Karakterizasyonu**

#### **3.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope, SEM)**

Monolitlerin taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (JEOL, JEM 1200EX, Japonya) ile morfolojik tanımlaması yapılmıştır. Bu amaçla sentezlenen kapiler kolonların dolu uçlarından 1'er cm kesilerek önce 150 A kalınlığında altın ile kaplanmış, daha sonra 2500X ve 5000X büyütme yapılmak üzere SEM cihazı içerisine dik konumda yerleştirilmiştir. Bu fotoğrafların değerlendirilmesi ile gözenek yapıcı sisteminin ve AMPS derişiminin değişiminin gözeneklerin oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

#### **3.4.2. Yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri**

Yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri için Brunauer-Emmet-Teller (BET) (Quantachrom, Nova 2200E, İngiltere) ve Civa Porozimetre cihazı (Mercury Intrusion Porosimeter) (Quantachrome, U.S.A.) kullanılmıştır. BET cihazı ile monolitin mikro-gözenek özellikleri incelenmiş, Civa Porozimetre cihazı ile de makro-gözenek özellikleri incelenmiştir. BET analizleri bütün monolitler için yapılmıştır, ancak Civa Porozimetre analizleri yalnızca TFEM bazlı kolonlar için yapılabilmektedir. Bu analizlerin yapılabilmesi için kapiler kolon içerisine doldurulacak olan polimerizasyon çözeltisi ayrıca 1.5 ve 2.5 mm çaplı kapiler tüpler içerisine de dökülmüştür. Cam tüp içerisinde oluşan monolit, bu tüpün kırılması ile alınmıştır. Manyetik karıştırıcılar yardımı ile mutlak etanol içerisinde 6 saat süreyle yıkanan monolit önce oda sıcaklığında vakum altında 1 gün süre ile kurutulduktan sonra toz halinde BET sisteminin hücresine konmuş, burada ise 80<sup>0</sup>C'de vakum altında 3 saat süre ile kurutulmuş, ardından da analize geçilmiştir.

#### **3.4.3. Hidrofilisite tayini (Su temas açısı)**

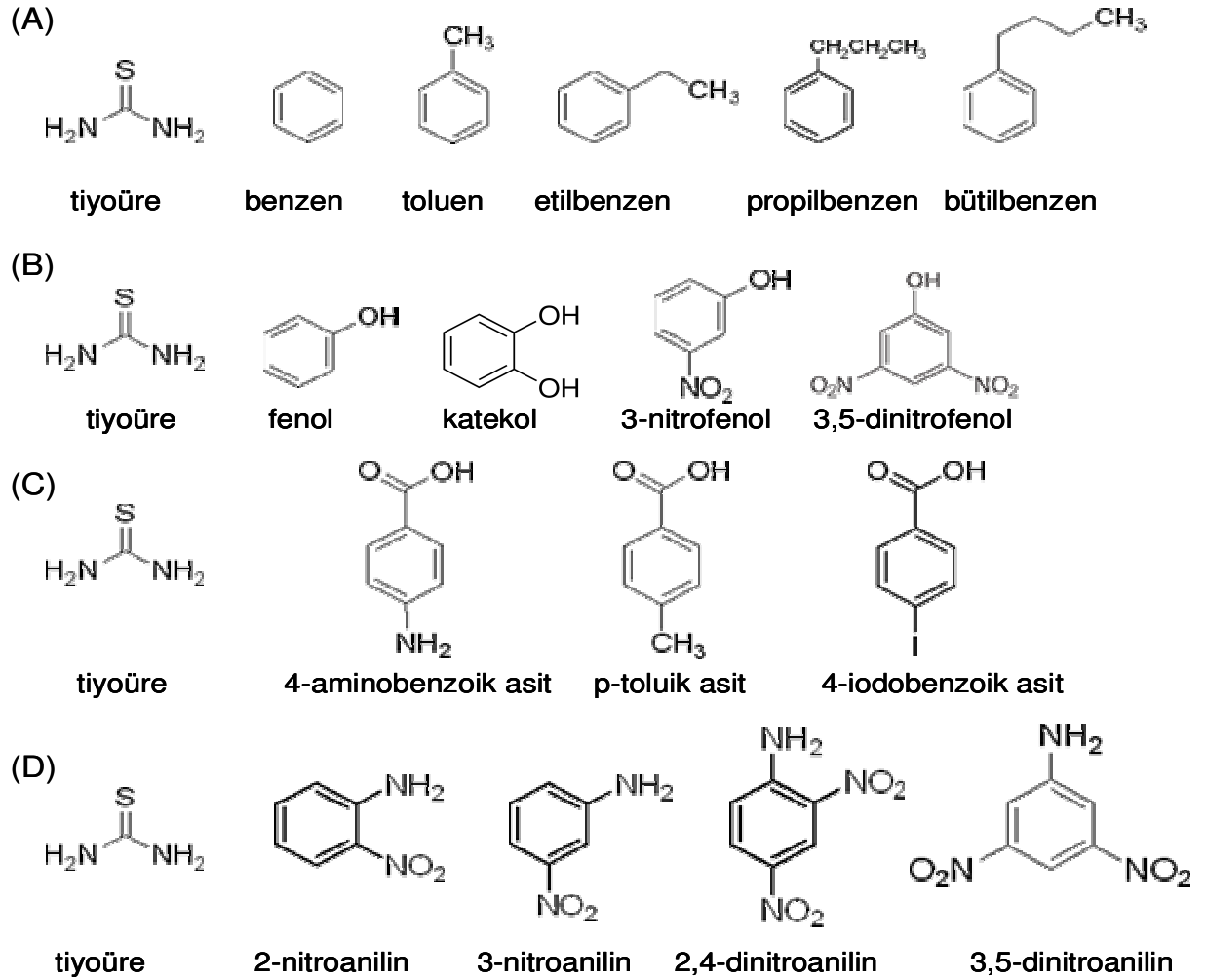
Monolitik kolonların hidrofilisite tayini Sapsız Damlacık Metodu (Sessile Drop Method) ile Drop Shape Analyzer (DSA) 100 (KRÜSS, Almanya) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bunun için cam deney tüplerinde hazırlanan monolitik

malzeme toz haline getirilmiş ve dairesel pelletler oluşturulmuştur. Daha sonra bu pelletlerin su temas açısı değerleri ölçülmüştür. Deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

### **3.5. Monolitik Kolonların Kromatografik Performanslarının İncelenmesi**

Kolonların kromatografik performanslarının incelenmesi için PRINCE CEC 760 sistemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırmada kullanılan analitler ise ağırlıkça % 0.1 lik çözeltiler halinde (kullanılacak mobil faz ile) 1 mL hazırlanmış ve her birinden 100'er µL alınarak karışım çözeltileri elde edilmiştir. Kullanılan analit grupları Şekil 3.3 deki gibidir. Her grupta elektroozmotik akış (electroosmotic flow, EOF) belirteci olarak tiyoüre kullanılmıştır. Tiyoüre kolonlarda alıkonmayan analit olarak geçmektedir ve elektroozmotik mobilitenin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi amacı ile farklı ACN/Tampon oranlarında mobil fazlar kullanılmıştır. Analiz sırasında farklı kromatogramlar elde edilmiştir. Bu kromatogramlardan kolon performansının göstergeleri olan kromatografik parametrelerin tayini yapılmıştır. Bu parametrelerden bölüm 3.1.6 da bahsedilmektedir.



**Şekil 3.3.** Kromatografik ayırmada kullanılan analit grupları. (A) Alkilbenzen türevleri, (B) Fenol türevleri, (C) Benzoik asit türevleri, (D) Anilin türevleri.

### 3.6. Kromatografik Parametrelerin Tayini

Elde edilen kromatogramlardan kolon performansını belirleyici parametreler hesaplanmıştır. Her analizde sisteme enjekte edilen örnek karışımındaki tüm bileşenler için alıkonma süresi, taban genişliği ve pik yarı yüksekliğindeki taban genişliği ölçülerek bu veriler kolon performansını belirleyici parametreler olan, elektroozmotik mobilite, alıkonma faktörü, pik çözünürlüğü, teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliğinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Aşağıda bu büyüklüklerin tanımı ve hesaplama yöntemleri verilmektedir.

### 3.6.1. Elektrozmotik mobilite ( $\mu_{eof}$ )

Kolonun mobil faz geçirgenliğinin bir göstergesi olan elektrozmotik mobilite ( $\mu_{eof}$ ) aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$\mu_{EOF} = L_e L_t / V \cdot t_R \quad (3.1)$$

Burada  $\mu_{EOF}$  ( $m^2/V.s$ ) elektrozmotik mobilite,  $L_e$  (m) kolon etkin uzunluğu,  $L_t$  (m) kolon toplam uzunluğu,  $V$  uygulanan gerilim (Volt) ve  $t_R$  tiyoüre için alıkonma süresidir.

### 3.6.2. Alıkonma faktörü (Retention factor) (k)

Alıkonma faktörü (k) kolon içerisinde yer alan monolit ile mobil faz içindeki analitin arasındaki etkileşimi dolayısıyla ters faz kromatografisinde kolonun polaritesini ifade etmektedir. Akış hızı, kolon boyutu, partikül çap ve gözenekliliğinden bağımsız, boyutsuz bir parametredir. Alıkonma faktörü aşağıdaki ifade yardımıyla hesaplanmaktadır.

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (3.2)$$

Bu ifadede  $t_R$ , herhangi bir bileşenin herhangi bir mobil faz ile bulunan alıkonma süresini  $t_0$  ise referans (tiyoüre) ile elde edilen alıkonma süresini göstermektedir.

### 3.6.3. Pik çözünürlüğü (Resolution) (R)

Pik çözünürlüğü ardışık iki pikin birbirinden ne kadar iyi ayrılabilirdiğini göstermektedir. Elde edilen kromatogramlarda belirli bir bileşen için pik çözünürlüğü,  $R(n+1/n)$ , denklem (3.3)'e göre hesaplanmıştır. Burada  $R(n+1/n)$ , seçilen pik (n+1) ile bir önceki pik (n) arasındaki çözünürlüğü ifade etmektedir.  $t_{n+1}$  ve  $t_n$  ise enjeksiyon noktasından itibaren, sırasıyla pik n+1 ve pik n için alıkonma sürelerini göstermektedir.  $W_{n+1}$  ve  $W_n$  ise sırasıyla pik n+1 ve pik n için taban genişliğini ifade etmektedir.

$$R(n+1/n) = 2(t_{n+1} - t_n) / (W_{n+1} + W_n) \quad (3.3)$$

### 3.6.4. Teorik tabaka sayısı (Theoretical plate number, N) ve Teorik tabaka yüksekliği (Theoretical plate height, h)

Teorik tabaka sayısı kolonun verimli ve hızlı çalışmasının önemli bir göstergesidir. Teorik tabaka yüksekliği ise yine kolon verimini gösteren başka bir göstergesidir. Bu nedenle tez kapsamında sentezlenen kolonların literatürdeki kolonlarla karşılaştırılabilmesi için bu değerler hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 \times (t / W_{1/2})^2 \quad (3.4)$$

Burada t; bileşiğin alıkonma süresini, W; bileşik pikinin taban genişliğini ve  $W_{1/2}$ ; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir. Bir kolonda teorik tabaka sayısı ne kadar yüksekse kolonun verimi o kadar yüksek demektir. Kolon boyu arttıkça teorik tabaka sayısında da artış gözlenir.

Teorik tabaka yüksekliği; h ile gösterilir. Kolonun ne kadar hızlı ve etkili çalıştığını gösterir. N ile ters orantılıdır. Bir kolonda N değeri ne kadar büyükse kolonun verimi o kadar yüksektir. Daha düşük teorik tabaka yüksekliği ve daha fazla teorik tabaka sayısı kısa sürede kromatografik sonuçların elde edilmesi demektir.

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

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

### 3.6.5. Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)

Kromatografik sistemlerde tekrarlanabilirlik önemli bir parametredir. Analiz koşullarından, kromatografik sistemden veya kolon dolgu materyalinin kendisinden kaynaklanabilecek nedenlerden ötürü analizlerde meydana gelebilecek tekrarlanabilirlik sorunları analize gölge düşürür. Tekrarlanabilirlik aynı gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik (run to run reproducibility) veya farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği (day to day reproducibility) olmak üzere iki farklı şekilde ifade edilmiştir. Tekrarlanabilirlik bağıl standart sapma

(relative standard deviation, RSD) ile ifade edilir ve her iki tür için de % 1.5'in altında olması istenir. RSD aşağıdaki ifade tarzında ile hesaplanmıştır.

$$RT_n = \sum N_i RT_i / \sum N_i \quad (3.6)$$

$$SD = \sqrt{\sum N_i (RT_i - RT_n)^2 / (\sum N_i - 1)} \quad (3.7)$$

$$\% RSD = SD / RT_n \quad (3.8)$$

Burada;

$RT_n$ ; farklı analizler için belirli bir analit ile elde edilen sayıca ortalama alıkonma süresi,  $SD$ ; standart sapma,  $RSD$ ; bağıl standart sapma,  $N_i$ ; analiz sayısını,  $RT_i$ ;  $i$  no'lu alıkonma süresini ifade etmektedir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen kolonların hidrofilitelerinin tayini için su temas açısı değerleri ölçülmüştür. Bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan kolonlar: poli(BMA-co-EDM) sentezi için % 74 DMF, poli(TFEM-co-EDM) sentezi için % 83 IAA derişimi ve poli(PEGPEA-co-EDM) sentezi için ise % 66 Pr-OH derişimi kullanılmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki poli(BMA-co-EDM), poli(TFEM-co-EDM) ve poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolitler hidrofobik özellikte olmakta ve ters-faz kromatografisi için kullanılabilir. Poli(PEGPEA-co-EDM) monolitler ise hidrofilik özelliktedir. (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Sentezlenen monolitler için su temas açısı değerleri

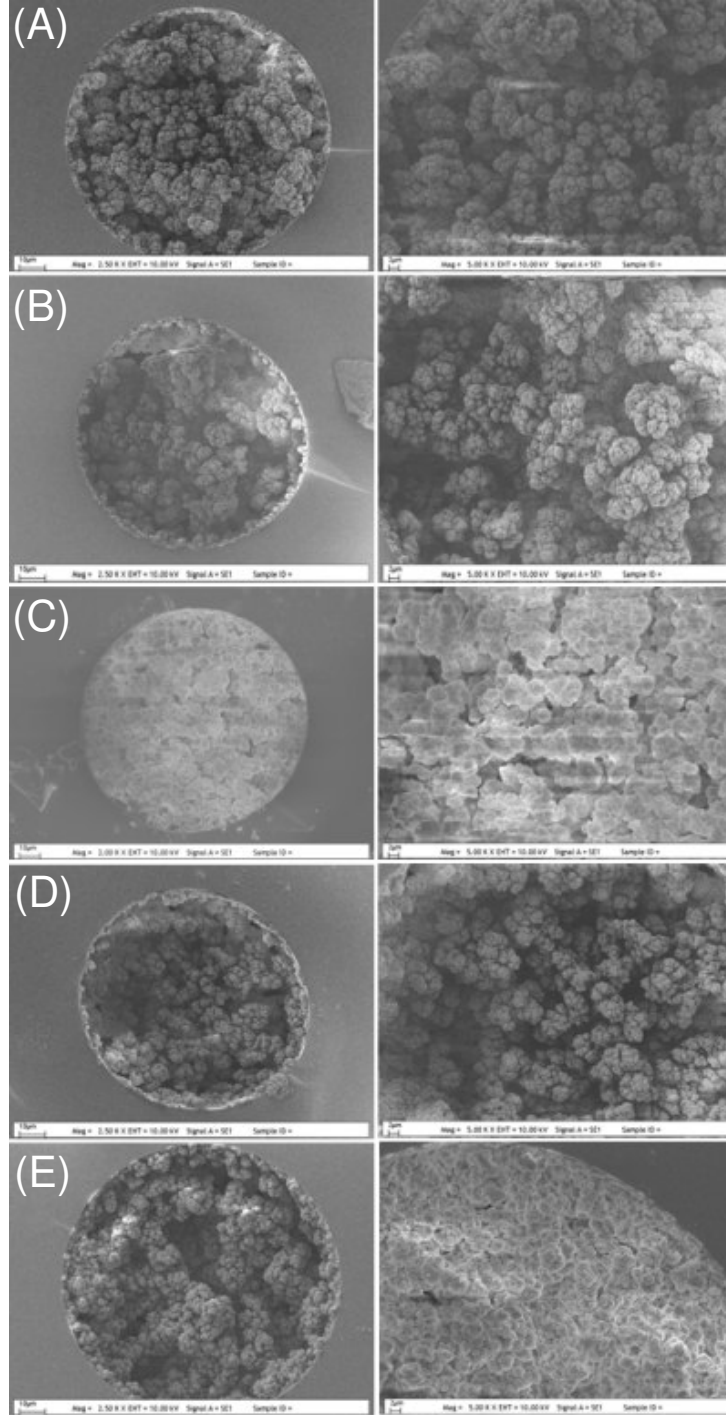
| Monolit                 | Su Temas Açısı (°)  |
|-------------------------|---------------------|
| Poli(BMA-co-EDM)        | 111.3               |
| Poli(TFEM-co-EDM)       | 116.0               |
| Poli(TFEM-co-PA-co-EDM) | 109.4               |
| Poli(PEGPEA-co-EDM)     | Tam su absorpsiyonu |

##### 4.1. Bütil metakrilat Bazlı Monolitler

Tez kapsamında öncelikle BMA bazlı monolitik kolonlar sentezlenmiştir. Bunun nedeni BMA bazlı monolitlerin CEC sisteminde kromatografik ayırma için yaygın olarak kullanılmasıdır. Literatürde BMA bazlı monolitlerin sentezi için termal yolla veya UV ile başlatılan serbest radikal polimerizasyonuna dayalı birkaç sentez yöntemi bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler patentli olup, uygulanabilecek formda tanımlanmış değildir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, BMA bazlı monolit sentezi için yeni bir gözenek yapıcı sistemi önerilmiş ve termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu tekniği ile kapiler monolitler elde edilmiştir.

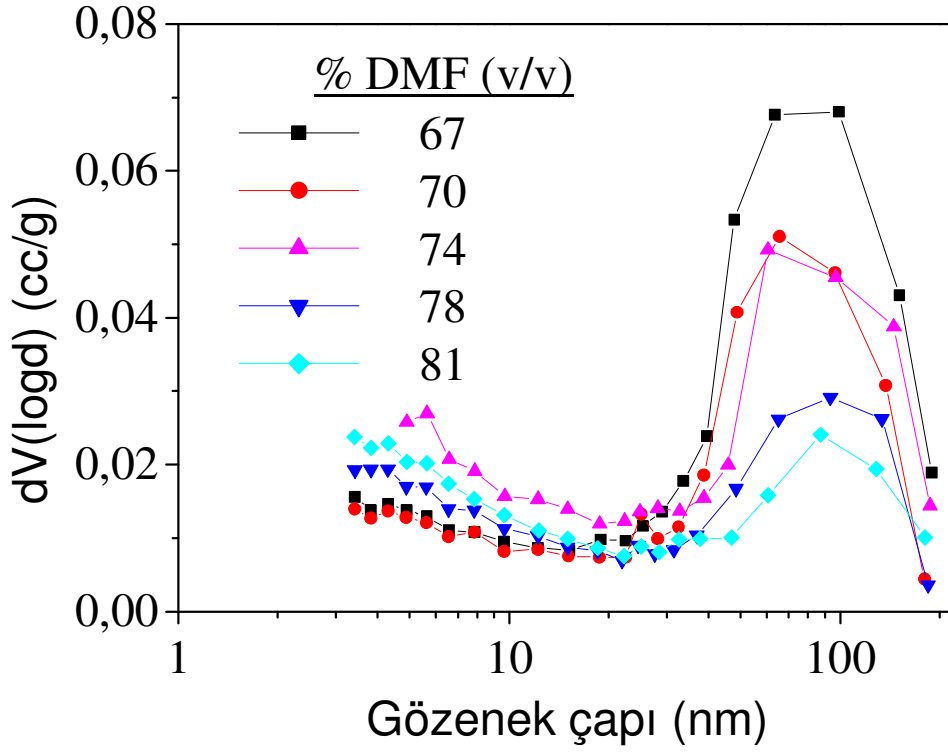
BMA monolitlerin kromatografik performanslarının değerlendirilmesi amacı ile alkilbenzen turevleri analit grubu olarak seğilmiştir. Bu monolitlerin morfolojik ozellikleri ve kromatografik performansları bu bolumde tartişilmiştir.

#### 4.1.1. Poli(BMA-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu



**şekil 4.1.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: Sol sütün: 2500X, Sağ sütün: 5000X, DMF oranları (% v/v): (A) 67, (B) 70, (C) 74, (D) 78, (E) 81

Buradan görüldüğü üzere seçilen bütün DMF derişimleri ile, gözenekli formda monolitler elde edilmiştir. SEM fotoğrafları, DMF derişiminin değişimi ile monolitik yapıda, bariz bir morfolojik değişimin oluşmadığını göstermektedir. Bir başka deyimle, DMF derişiminin değişimi ile agregat boyutunda bariz bir değişimin oluşmadığı net olarak gözlenmektedir. Ancak, artan DMF derişimi ile morfolojik kesitte yer alan krater formundaki makro-gözeneklerin sayısının arttığı görülmektedir. SEM fotoğrafları, DMF/EG sisteminin, BMA bazlı monolitler için yaygın olarak tercih edilen n-propanol/1,4-bütandiol sisteminden farklı davranan yeni bir gözenek yapıcı sistemi olduğunu net olarak göstermektedir. Literatürde BMA bazlı monolitler için n-propanol, mikro-gözenek yapıcı, 1,4-bütandiol ise makro-gözenek yapıcı olarak kullanılmaktadır. Bu sistem ile yapılan BMA bazlı monolit sentezlerinde, n-propanol derişiminin artışı ile agregat boyutunda bariz ve hızlı bir azalma meydana gelmektedir. Ancak yapılan çalışmalar, n-propanol/1,4-bütandiol oranının ancak çok dar bir aralıkta değiştirilmesi ile (n-propanol derişimi bazında hacimce % 58-62) uygun mobil faz geçirgenliğine sahip ve CEC sisteminde kromatografik ayırma yapmaya uygun BMA bazlı monolitlerin sentezlenebildiğini göstermiştir (Svec F., et al., 1992). n-propanol oranının % 61'in üzerine çıkması durumunda monolitin mobil faz geçirgenliği ortadan kalkmakta, % 58'in altında olması durumunda ise ortalama gözenek boyutu aşırı şekilde yükselerek, geçirgenlik aşırı şekilde artmakta ve monolitin, başarılı bir kromatografik ayırım için kullanımı mümkün olmamaktadır. Ancak tez kapsamında önerilen DMF/EG sistemi ile DMF derişimi hacimce % 67-81 aralığında değiştirilmesine rağmen uygun morfolojik özelliklere ve mobil faz geçirgenliğine sahip monolitlerin sentezi mümkün olabilmektedir.

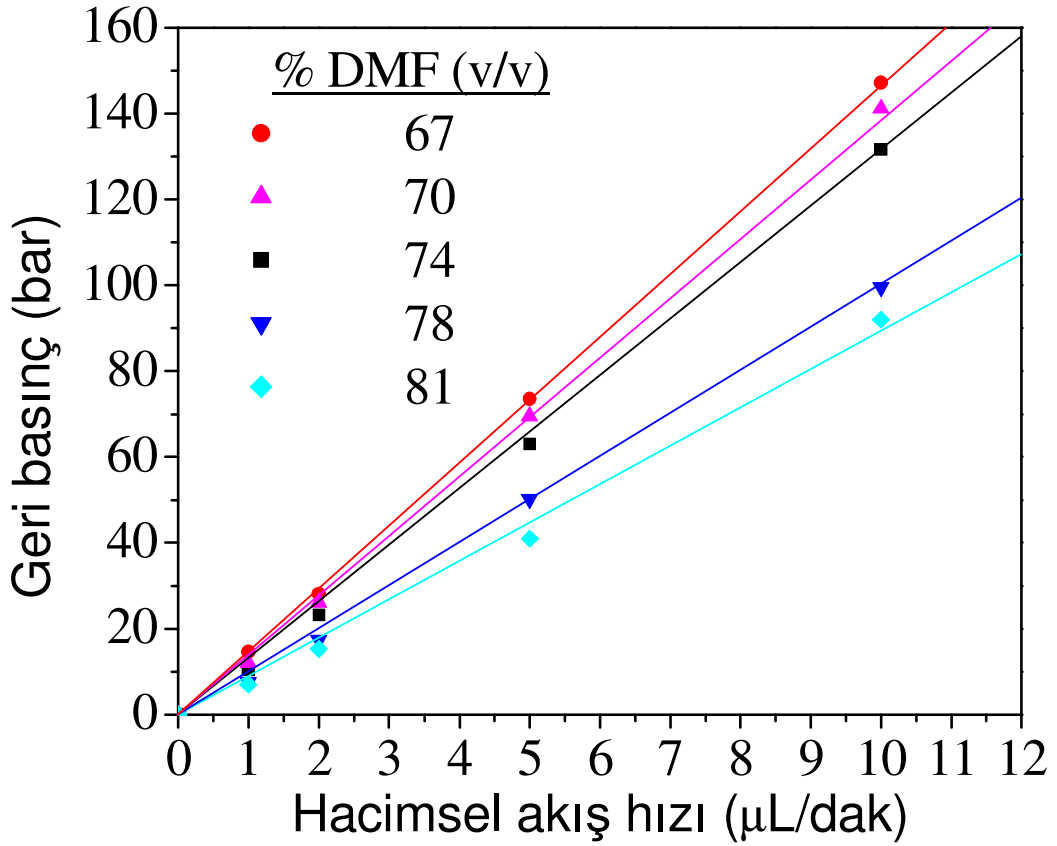


**Şekil 4.2.** Farklı DMF derişimleri ile hazırlanan BMA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.

**Çizelge 4.2.** Farklı DMF derişimleri ile hazırlanan BMA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.

| % DMF | Özgül yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) | Gözenek çapı (nm) |
|-------|---------------------------------------|-------------------|
| 67    | 11.14                                 | 19.00             |
| 70    | 8.50                                  | 18.29             |
| 74    | 15.71                                 | 12.15             |
| 78    | 10.98                                 | 10.98             |
| 81    | 11.91                                 | 9.41              |

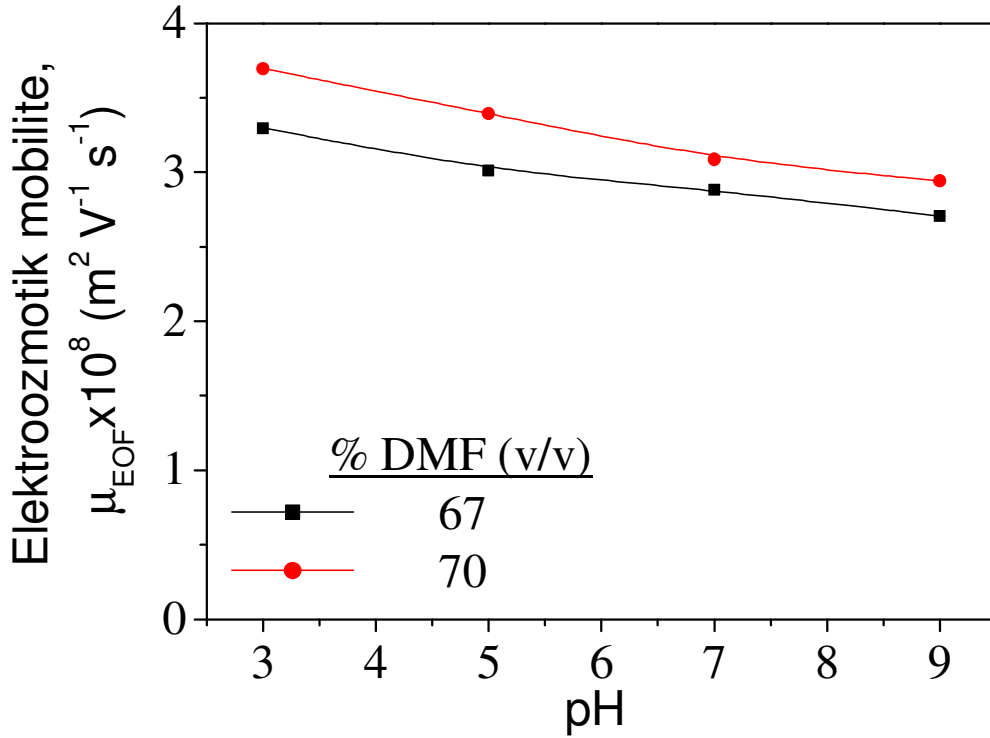
Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen poli(BMA-co-EDM) monolitlerin BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm sistemi ile elde edilen gözenek dağılım eğrileri ile Şekil 4.2’de verilmektedir. Bu veriler yardımıyla bulunan ortalama gözenek çapı ve özgül yüzey alanı değerlerinin DMF derişimi ile değişimi ise Çizelge 4.2’de verilmektedir. Şekil 4.2’den görüldüğü gibi artan DMF derişimi ile monolit içerisindeki mikro-gözenek hacmi azalmaktadır. Artan DMF derişimi ile ortalama mikro-gözenek çapı hafif bir azalma göstermekte özgül yüzey alanında ise önemli bir değişim olmamaktadır. Bu sonuçlar DMF derişiminin geniş bir aralıkta değiştirilmesi ile poli(BMA-co-EDM) monolitlerin gözeneklilik özelliklerinde önemli bir değişimin oluşmadığı savını desteklemektedir.



**Şekil 4.3.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.

Burada görüldüğü gibi 0-10 µL/dak akış hızı aralığında üretilen bütün monolitler için geri-basınç değeri, akış hızıyla lineer olarak değişmektedir. Artan DMF

derişimi ile sabit akış hızında geri basınç değeri azalmaktadır. Bu davranış SEM ile tespit edilen “krater formundaki makro-gözenek sıklığının artışı” bulgusu ile uyumludur. Bu bulgular (SEM görüntüleri, BET sonuçları ve geri-basınç eğrileri, Şekil 4.2, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3) DMF/EG gözenek yapıcı sisteminde, DMF’in makro-gözenek yapıcı, EG’nin ise mikro-gözenek yapıcı olarak davrandığını ortaya koymaktadır.



**Şekil 4.4.** % 67 ve % 70 DMF derişimine sahip BMA monolitlerin pH a karşı elektroozmotik mobilite değerleri.

Elektrokromatografik ayırma deneyleri öncesinde elektroozmotik mobilitenin mobil faz pH’ı ile derişimi analit olarak tiyoüre kullanımıyla incelenmiştir. Örnek olarak seçilen ve % 67 ve % 70 DMF derişimleri ile üretilen poli(BMA-co-EDM) monolitler için elektroozmotik mobilitenin pH ile derişimi Şekil 4.4’te verilmektedir. Elektroozmotik mobilitenin önemli bir derişiklik göstermemesi pH 3-9 aralığında elektrokromatografik ayırma yapılabileceğini göstermektedir. Elektroozmotik mobilite kolonun mobil faz geçirgenliğini gösteren en önemli parametredir. Elektroozmotik mobilitenin azalması mobil faz ve analitlerin kolon boyunca

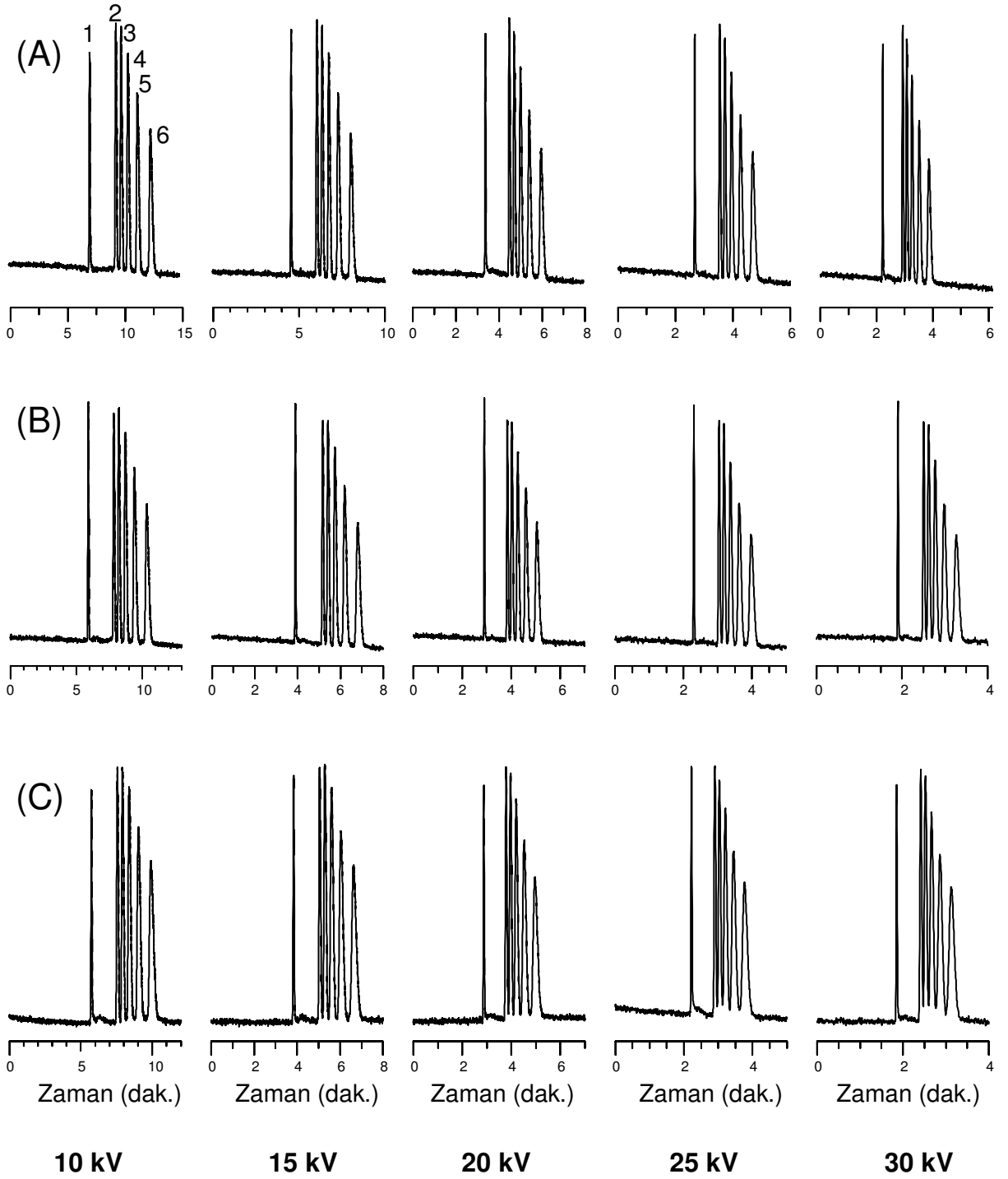
transferinin yavaşlaması anlamına gelmektedir. Geniş bir pH aralığında sabit kalması ile kolondaki elektrokromatografik kütle transfer hızının pH'tan etkilenmemesi anlamına gelmektedir.

#### **4.1.2. Poli(BMA-co-EDM) monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi**

Farklı DMF derişimleri ile hazırlanan BMA bazlı monolitlerin kromatografik davranışı, CEC sisteminde, ters faz modunda, alkilbenzen karışımının analit olarak kullanılmasıyla incelenmiştir. Bu amaçla 10-30 kV aralığında farklı voltaj değerinde her bir monolit ile alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar elde edilmiştir. Bu monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlar Şekil 4.5'te verilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri ise Çizelge 4.3'de verilmektedir.

Şekil 4.5'te % 67, % 70, % 81 DMF derişimleri ile hazırlanan poli(BMA-co-EDM) bazlı monolitler için 80/20 ACN/5 mM pH7 fosfat tamponu oranında ve farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlar verilerek DMF derişiminin alkilbenzen karışımı ile alınan kromatogramlar üzerindeki etkisi gösterilmiştir.

Literatürde poli(BMA-co-EDM) bazlı monolit sentezi için kullanılan 1,4-bütandiol/n-propanol gözenek yapıcı sisteminin oranının ayırım üzerindeki etkisi bilinmektedir. Burada aynı kromatografik koşullarda alınan bu kromatogramlarla, DMF/EG gözenek yapıcı sisteminde DMF derişiminin alkilbenzen ayırımı üzerindeki etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.



**Şekil 4.5.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. DMF derişimleri (% v/v): (A) 67, (B) 70, (C) 81, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 80/20, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyu: 20 cm, Kolon çapı: 100  $\mu$ m, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4. Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.3.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitler kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.

Voltaj: 10 kV

| % DMF | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 67    | 13.05  | 2.04   | 2.22   | 2.61   | 2.98   |
| 70    | 12.95  | 1.82   | 2.09   | 2.32   | 2.74   |
| 74    | 11.86  | 1.80   | 1.92   | 2.35   | 2.53   |
| 78    | 11.70  | 1.62   | 1.81   | 2.14   | 2.31   |
| 81    | 11.12  | 1.53   | 1.65   | 2.00   | 2.17   |

Voltaj: 15 kV

| % DMF | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 67    | 12.90  | 2.00   | 2.18   | 2.65   | 2.98   |
| 70    | 12.34  | 1.77   | 2.13   | 2.26   | 2.71   |
| 74    | 10.81  | 1.64   | 1.79   | 2.12   | 2.45   |
| 78    | 10.81  | 1.46   | 1.66   | 2.05   | 2.20   |
| 81    | 10.44  | 1.42   | 1.60   | 1.72   | 1.97   |

Voltaj: 20 kV

| % DMF | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 67    | 11.95  | 1.89   | 2.09   | 2.45   | 2.71   |
| 70    | 11.62  | 1.68   | 1.97   | 2.12   | 2.44   |
| 74    | 10.72  | 1.52   | 1.74   | 2.06   | 2.31   |
| 78    | 10.44  | 1.49   | 1.67   | 1.92   | 2.24   |
| 81    | 9.92   | 1.34   | 1.45   | 1.73   | 1.95   |

Voltaj: 25 kV

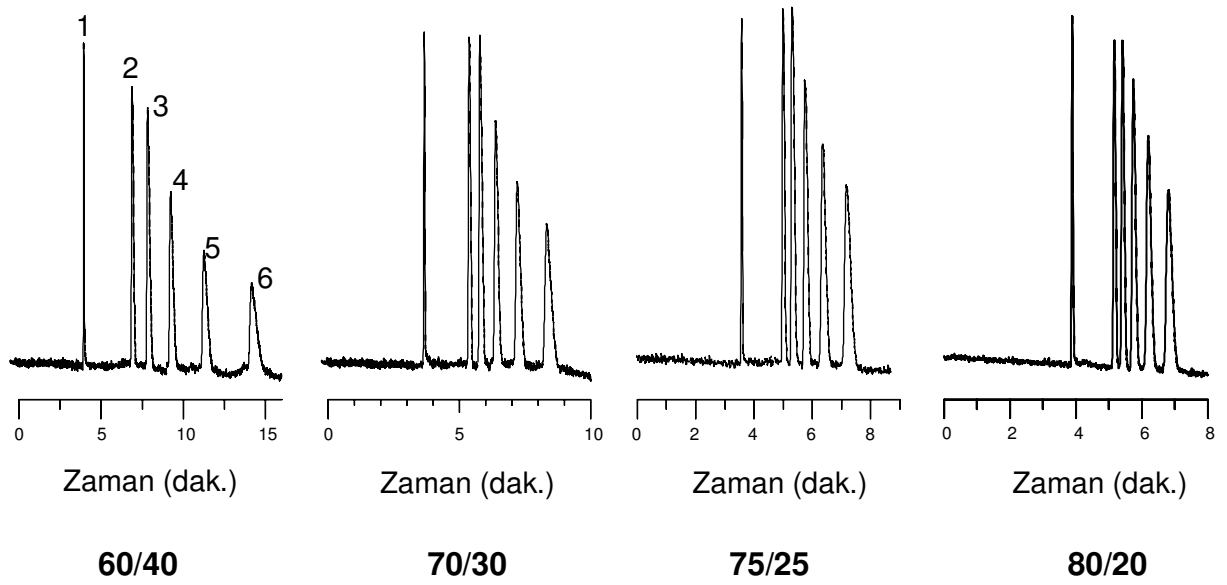
| % DMF | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 67    | 11.35  | 1.83   | 2.03   | 2.41   | 2.70   |
| 70    | 11.49  | 1.68   | 1.86   | 2.07   | 2.50   |
| 74    | 10.37  | 1.34   | 1.67   | 1.99   | 2.20   |
| 78    | 9.80   | 1.34   | 1.54   | 1.77   | 2.02   |
| 81    | 9.22   | 1.32   | 1.37   | 1.71   | 1.85   |

Volataj: 30 kV

| % DMF | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 67    | 9.64   | 1.47   | 1.58   | 2.08   | 2.13   |
| 70    | 11.18  | 1.59   | 1.77   | 2.06   | 2.39   |
| 74    | 9.14   | 1.32   | 1.47   | 1.83   | 2.17   |
| 78    | 9.37   | 1.21   | 1.52   | 1.76   | 2.01   |
| 81    | 8.53   | 1.20   | 1.37   | 1.65   | 1.84   |

ACN/5 mM pH 7 tamponu: 80/20, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4. Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen.

Buradan görüldüğü gibi, değiştirilen DMF derişimi aralığında düşük sayılabilecek derişimler olan % 67 ve % 70 DMF derişimleri ile sentezlenen monolitler kullanılarak bütün voltaj değerlerinde alkilbenzenlerin kromatografik ayrımının başarılı şekilde yapılabildiği görülmektedir. Çizelge 3'te bu monolitler için bütün voltaj değerlerinde elde edilen pik çözünürlüğü değerleri, başarılı bir kromatografik ayrımı gösteren değerlerdir. Ancak yüksek DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde, özellikle yüksek voltaj değerlerinde, ayırma gücünde belirgin bir azalmanın olduğu net olarak görülmektedir (Şekil 4.5). Genelde bütün monolitler için artan voltaj ile pik çözünürlüğünde bir azalma oluşmaktadır. Ancak yüksek DMF derişimleri (% 78 ve % 81) ile sentezlenen monolitlerde hem düşük voltaj değerlerinde elde edilen pik çözünürlükleri bağıl olarak daha düşük, hem de artan voltaj ile pik çözünürlüğündeki azalma daha belirgindir.

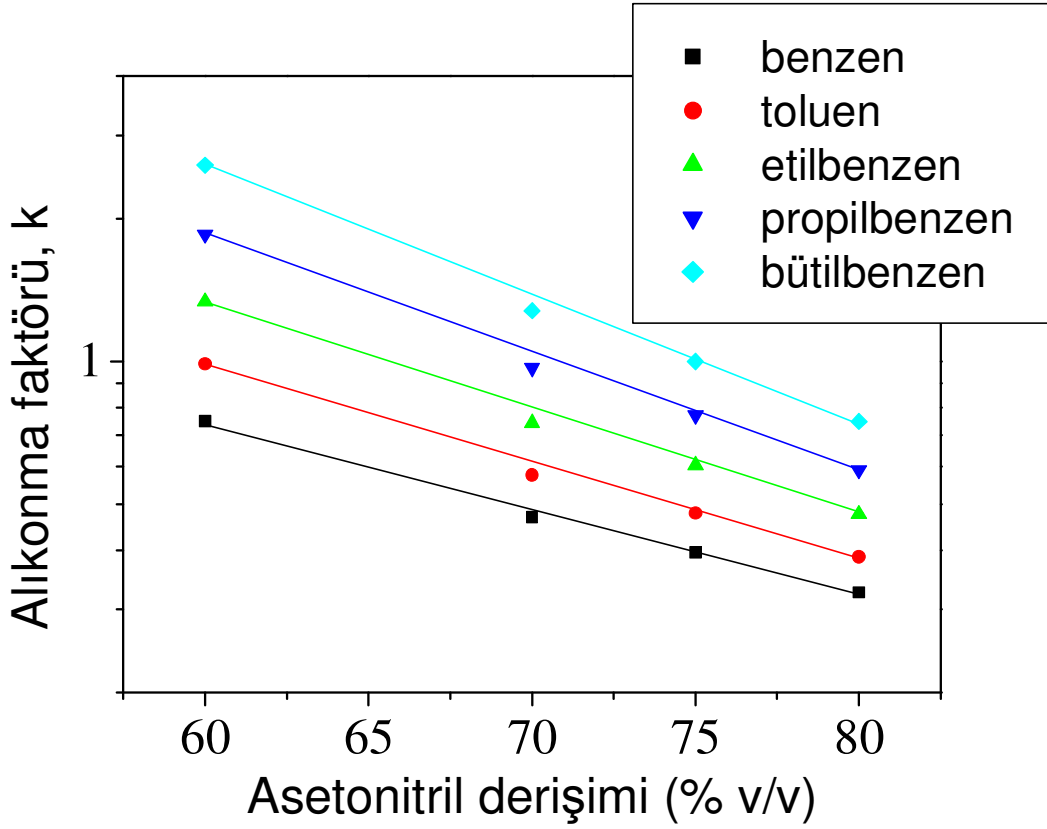


**Şekil 4.6.** % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolit kullanılarak farklı ACN/pH 7 tamponu oranları elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: değişken, Uygulanan voltaj: 15 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4.Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.4.** % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monoliti kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.

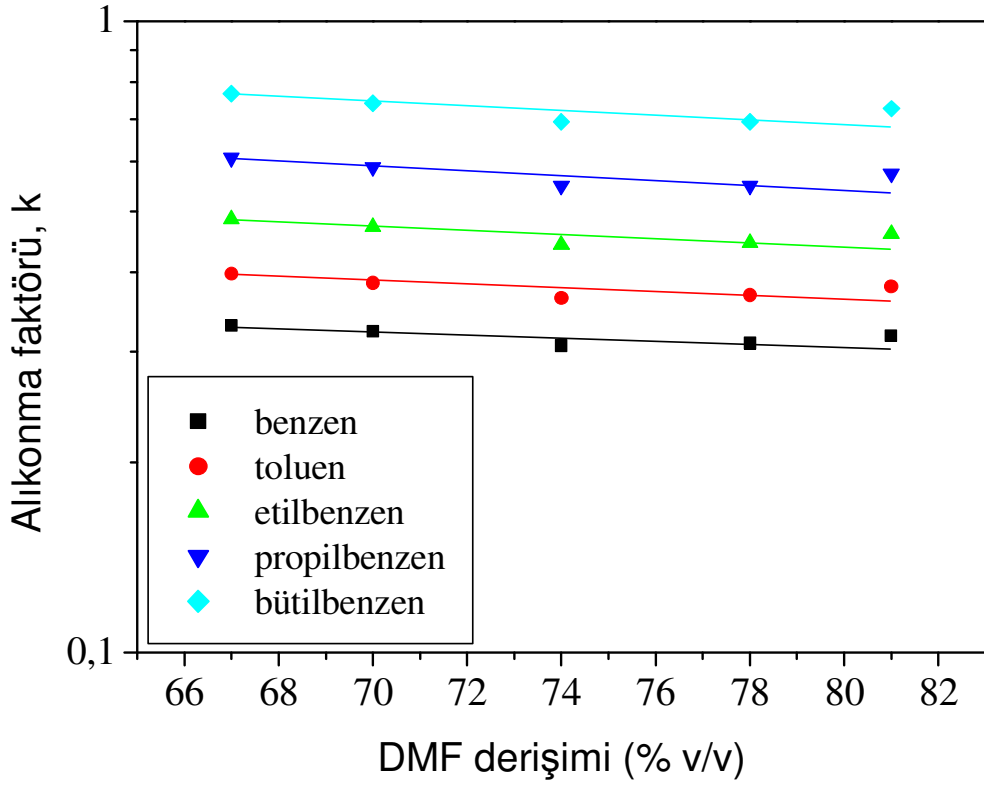
| ACN/Tampon | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60/40      | 13.64  | 2.01   | 3.66   | 4.87   | 6.57   |
| 70/30      | 12.95  | 1.84   | 2.35   | 2.57   | 4.63   |
| 75/25      | 12.01  | 1.75   | 2.11   | 2.34   | 3.75   |
| 80/20      | 11.62  | 1.68   | 1.97   | 2.12   | 2.44   |

Tampon: 5 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Benzen, 3. Toluen, 4.Etilbenzen, 5. Propilbenzen, 6. Bütilbenzen.



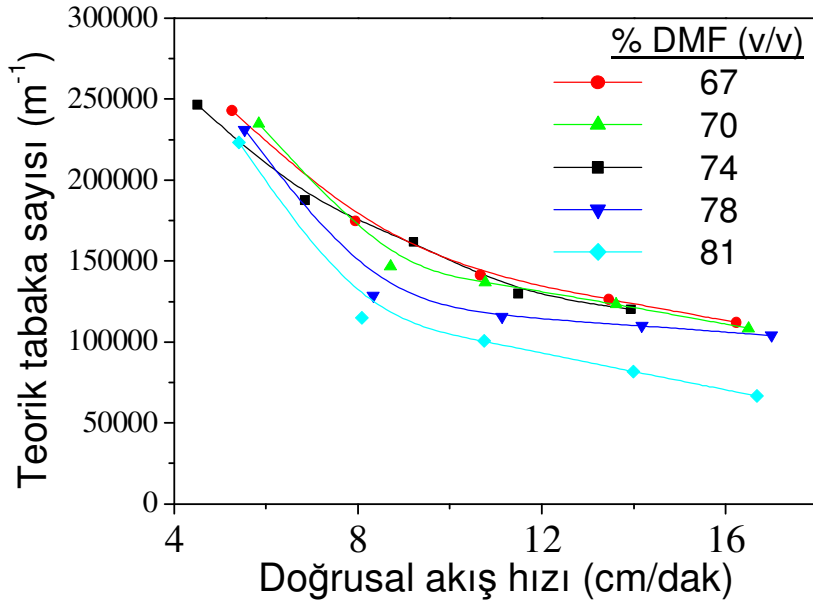
**Şekil 4.7.** % 70 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100  $\mu$ m

Sentezlenen monolitler için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimini tanımlamak amacıyla, % 70 DMF derişimi ile sentezlenen monolit kullanılarak, farklı ACN derişimleri içeren mobil fazlar ile alkilbenzenlerin kromatografik ayrımı çalışılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6'da verilmektedir. Elde edilen kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlük değerleri Çizelge 4.4'te ve bu kromatogramlardan hesaplanan alıkonma faktörü diyagramları ise Şekil 4.7'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi alıkonma faktörü ACN derişimi ile lineer olarak azalmaktadır. Bu davranış sentezlenen monolitlerin standart ters faz kolonu formatına uyduğunu göstermektedir.

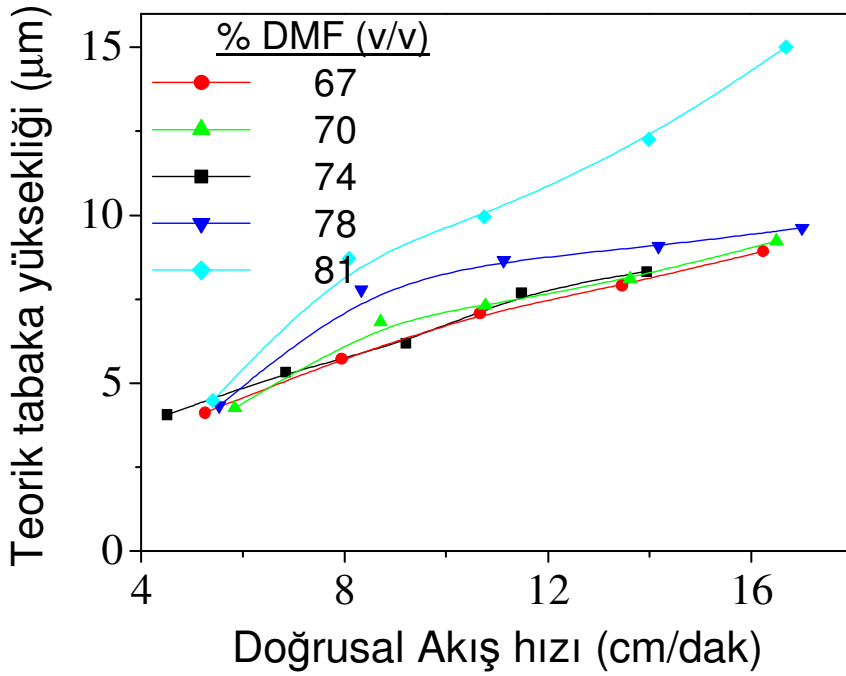


**Şekil 4.8.** Farklı DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolitlerde alıkonma faktörünün DMF derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 80/20, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı:100 µm

Farklı DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolitlerde alıkonma faktörünün DMF derişimi ile değişimi mobil faz olarak 80/20 ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu kullanılarak incelenmiştir. Alkilbenzenlerin kromatografik ayırımı için elde edilen alıkonma faktörü diyagramı Şekil 4.8'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi bütün DMF derişimleri ile hazırlanan monolitler ile alkilbenzenlerin elektrokromatografik ayırımı başarılı şekilde yapılabilmektedir.



**Şekil 4.9.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi (Van-Deemter grafiği). Analit: tiyoüre.



**Şekil 4.10.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi.

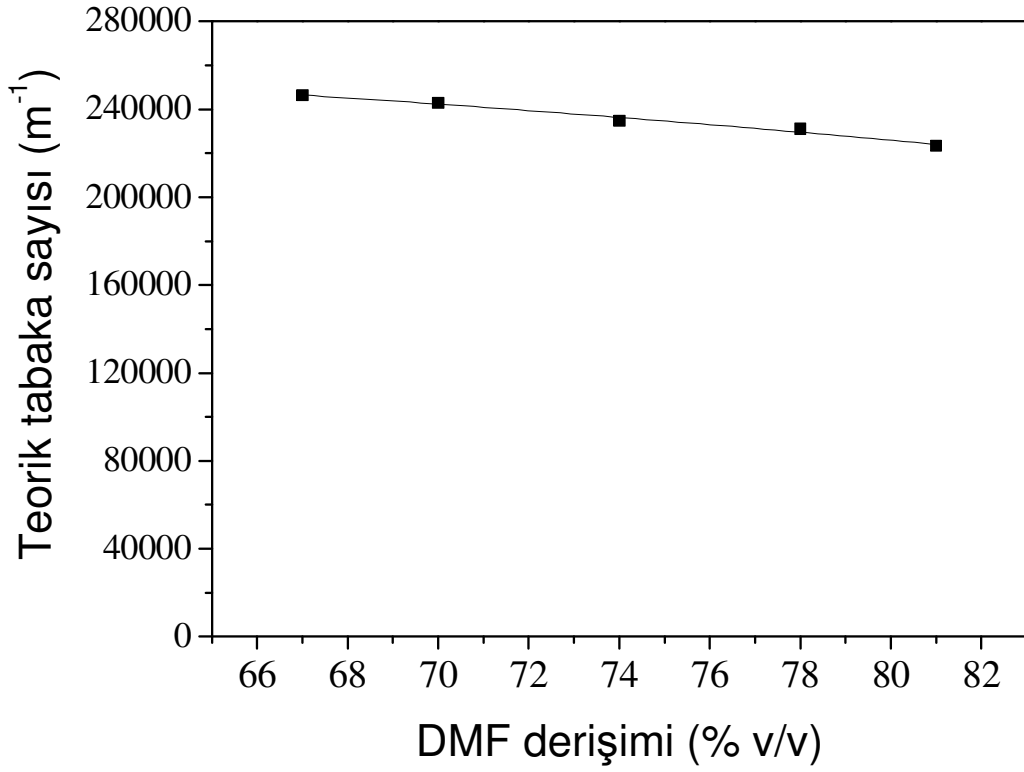
Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA bazlı monolitler için teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin akış hızı ile değişimi ise sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmektedir. Görüldüğü gibi, teorik tabaka sayısı artan akış hızı ile bir azalma göstermektedir. Ancak, yüksek DMF derişimleri ile sentezlenen monolitlerde bu azalmanın daha bariz olduğu dikkati çekmektedir. Düşük DMF derişimleri ile sentezlenen monolitler ile 200.000 tabaka/m ye ulaşan teorik tabaka sayıları veya 5 µm'ye kadar düşen tabaka yükseklikleri elde edilmiştir. Bu değerler ayırma verimi yönünden önerilen gözenek yapıcı sistem ile sentezlenen monolitlerin halen mevcut ticari monolitler ile yarışabilir olduğunu göstermektedir. Yüksek ayırma verimine sahip monolitlerin kullanımı ile, uygulanan voltaj değerinin 3 kat artırılması sonucu kromatografik analiz süresi 3 kat kısaltılabilmekte ve alkilbenzenlerin kromatografik ayrımı yaklaşık 4 dakikalık bir sürede tamamlanabilmektedir. Bu davranış üstün ayırma yeteneğine sahip kapiler monolitler için gözlenebilen tipik bir kromatografik özelliktir.

**Çizelge 4.5.** % 74 DMF derişimi ile sentezlenen BMA monolit için alkilbenzelerde kromatografik cevabın tekrarlanabilirliği.

| Bileşen      | Analizden analize<br>tekrarlanabilirlik<br>BSS (%) | Günden güne<br>tekrarlanabilirlik<br>BSS (%) |
|--------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Tiyoüre      | 0.73                                               | 0.92                                         |
| Benzen       | 0.67                                               | 0.93                                         |
| Toluen       | 0.68                                               | 1.15                                         |
| Etilbenzen   | 0.65                                               | 1.09                                         |
| Propilbenzen | 0.66                                               | 1.13                                         |
| Butilbenzen  | 1.02                                               | 1.25                                         |

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 80/20 v/v, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, DAD dedektör, 200 nm.

Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi hesaplanan tekrarlanabilirlik değerleri 2'den küçüktür. Bu da BMA monolitik kolonlar ile yapılan alkilbenzen türevleri analizlerinin tekrarlanabilirliğinin olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.11.** Farklı DMF derişimleri ile sentezlenen BMA monolitlerde teorik tabaka sayısının DMF derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre. Uygulanan voltaj: 10 kV

Şekil 4.11 teorik tabaka sayısının monolit sentezi için kullanılan DMF derişimi ile değişimini göstermektedir. Buradan görüldüğü gibi artan DMF derişimi ile teorik tabaka sayısında çok az bir azalma meydana gelmektedir. Bu durum geniş bir DMF derişim aralığı ile sentezlenen BMA bazlı monolitler ile yüksek verimle elektrokromatografik ayırım yapılabildiğini göstermektedir. Bu durum, nerilen DMF/EG gözenek yapıcı sistemin BMA monolitler sentezi için çok uygun olduğunu göstermektedir.

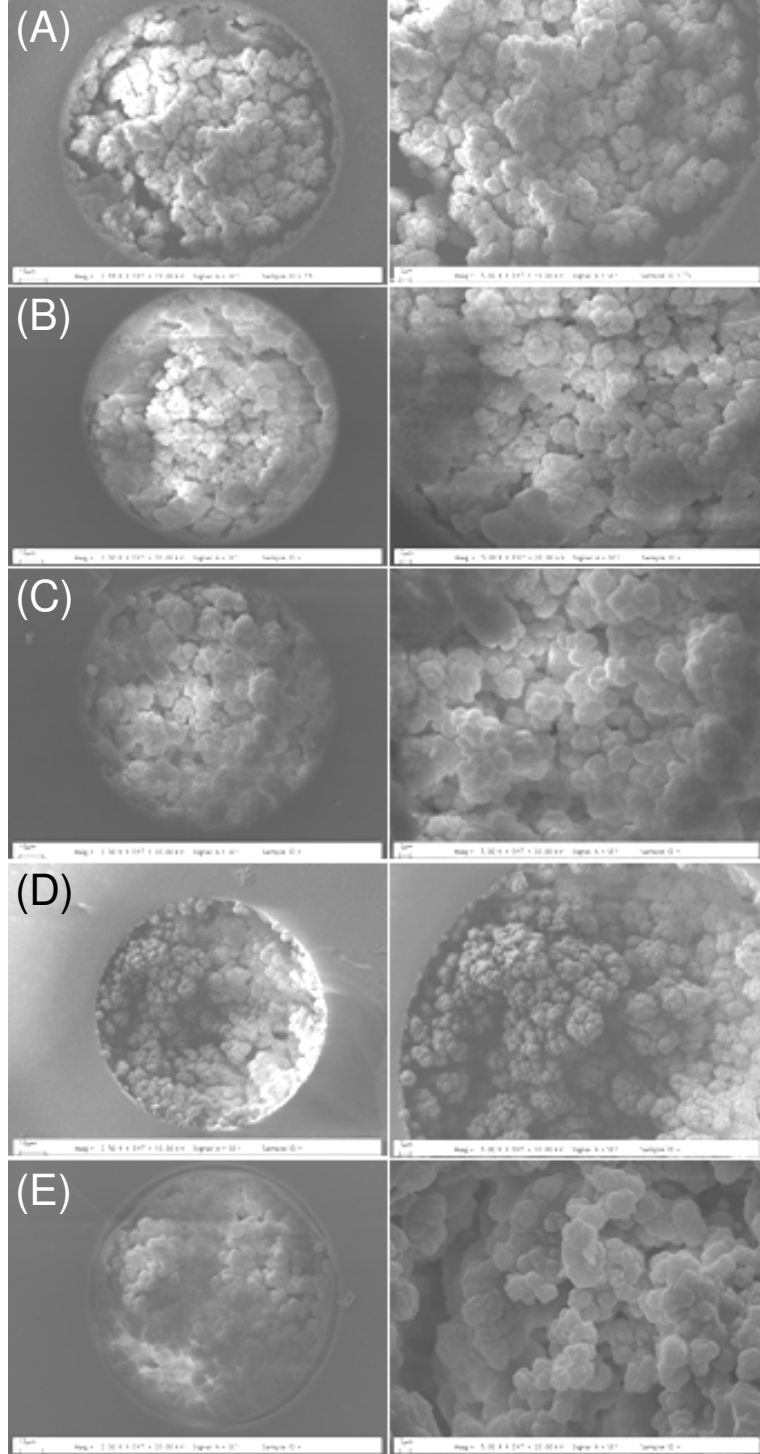
## **4.2. Trifloroetil metakrilat Bazlı Monolitler**

### **4.2.1. Poli(Trifloroetil metakrilat-co-Etilen dimetakrilat) monolitler**

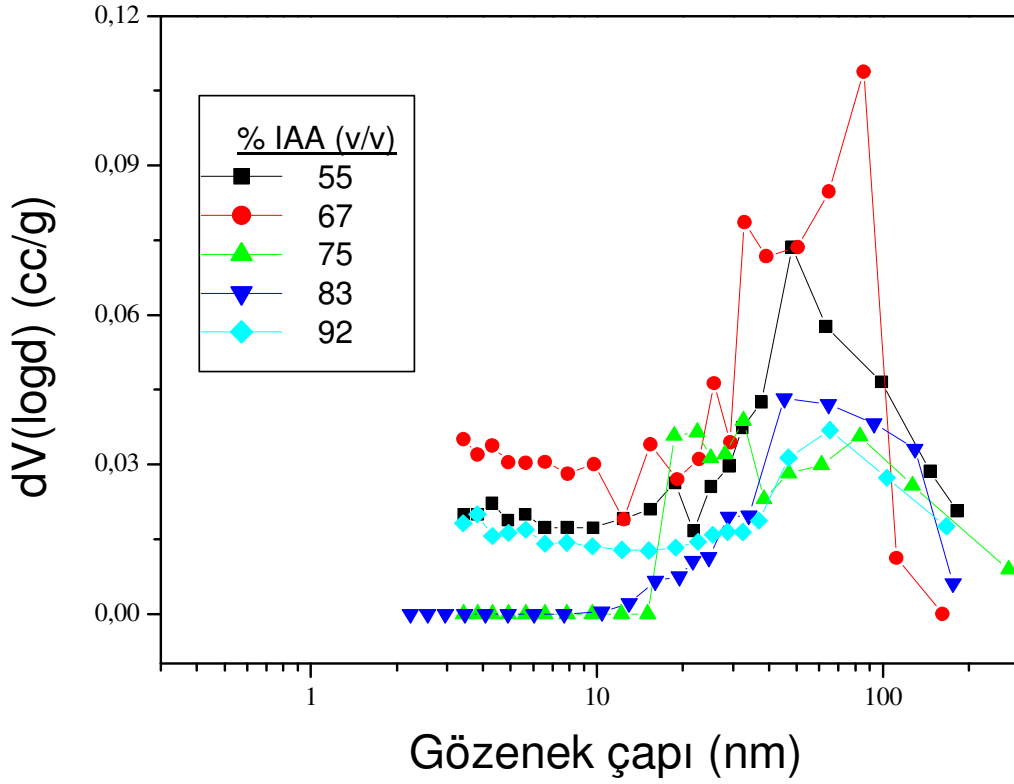
Literatürde ilk kez flor grubu içeren bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. F grubunun varlığı, organik bileşiklerin polaritesinde bir değişim meydana getirmektedir. F grubu içeren polimer bazlı bir monolitin, akrilik ve stiren bazlı klasik monolitlere göre farklı bir polariteye sahip olacağı açıktır. Bu nedenle tez kapsamında F içeren monomer kullanımı ile sentezlenen monolitlerin kromatografik davranışları incelenmiş ve akrilik ve stiren bazlı monolitlere göre avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur. Flor içeren monomer olarak, 2,2,2-trifloroetil metakrilat seçilmiştir.

TFEM monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi amacı ile farklı analitlerin kromatografik ayrımları denenmiştir. Alkilbenzen, fenol, anilin ve benzoik asit türevlerinin ayrılmaları hedeflenmiştir. TFEM monolitlerin morfolojik özellikleri ve kromatografik performansları bu bölümde tartışılmıştır.

#### 4.2.1.1. Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu



**Şekil 4.12.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: Sol sütün: 2500X, Sağ sütün: 5000X, IAA oranları (% v/v): (A) 55, (B) 67, (C) 75, (D) 83, (E) 92



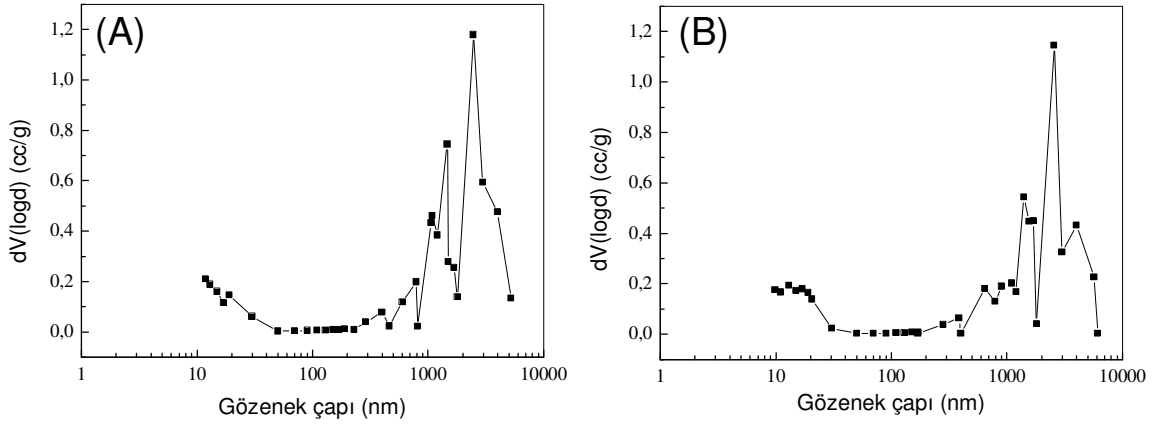
**Şekil 4.13.** Farklı IAA derişimleri ile hazırlanan TFEM monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.

**Çizelge 4.6.** Farklı IAA derişimleri ile hazırlanan TFEM monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.

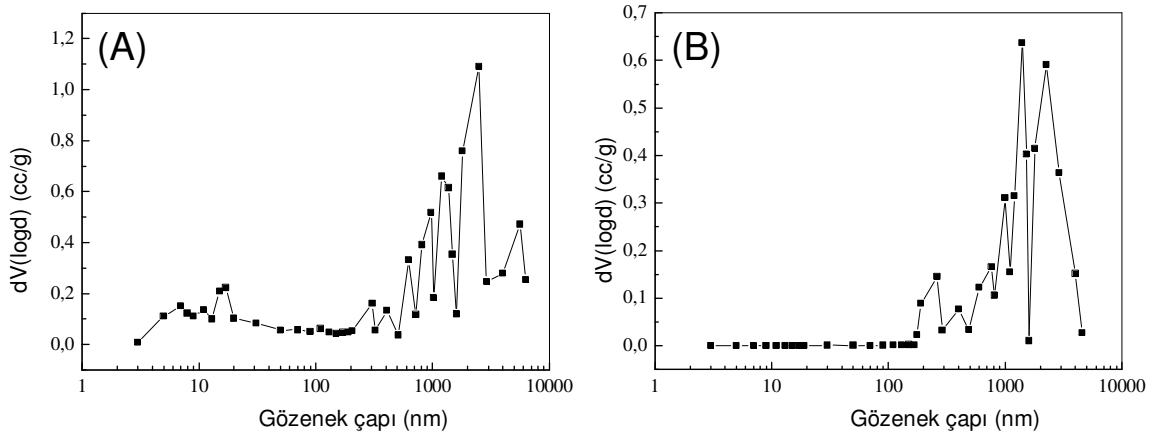
| % IAA (v/v) | Özgül yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) | Gözenek çapı (nm) |
|-------------|---------------------------------------|-------------------|
| 55          | 14.76                                 | 14.50             |
| 67          | 17.89                                 | 12.45             |
| 75          | 39.16                                 | 6.79              |
| 83          | 29.67                                 | 2.49              |
| 92          | 8.82                                  | 3.42              |

Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin sentezinde gözenek yapıcı sistem olarak izoamilalkol ve etilen glikol karışımı kullanılmıştır. Bu sistem ile farklı IAA derişimleri kullanılarak sentezlenen poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin örnek SEM fotoğrafları Şekil 4.12'de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi seçilen bütün IAA derişimleri ile, gözenekli formda monolitler elde edilmiştir. Bütün monolitik yapılar boyutu 1-3 µm aralığında değişen agregatlardan meydana gelmektedir. Bu agregatlar arasına boyları 0.2 – 2.0 µm aralığında değişen krater formunda makro-gözenekler yer almaktadır. SEM fotoğrafları, IAA derişimi ile monolitik yapıda, bariz bir morfolojik değişimin oluşmadığını göstermektedir. Ayrıca monolitin silika kapiler duvara iyi bir şekilde yapıştığı SEM fotoğraflarından görülmektedir.

Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin gözeneklilik özellikleri hem BET yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm sistemi, hem de civalı porozimetre kullanılarak tayin edilmiştir. Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen monolitler için BET yöntemi ile elde edilen gözenek dağılım eğrileri Şekil 4.13'de verilmektedir. Buradan görüleceği üzere bütün monolitik yapılardaki mikro-gözenekler 20-120 nm aralığında bulunmaktadır. Farklı IAA derişimleri ile hazırlanan poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin gözenek dağılım eğrilerinden hesaplanan özgül yüzey alanı ve ortalama gözenek çapı değerleri Çizelge 4.6'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi % 83 IAA derişimine kadar, artan IAA derişimi ile özgül yüzey alanı artmakta, ortalama mikro-gözenek çapı ise küçülmektedir. Ancak % 92 IAA derişimi ile düşük bir özgül yüzey alanı ve % 83 IAA derişimi ile üretilen monolite kıyasla yüksek bir mikro-gözenek çapı değeri elde edilmektedir.



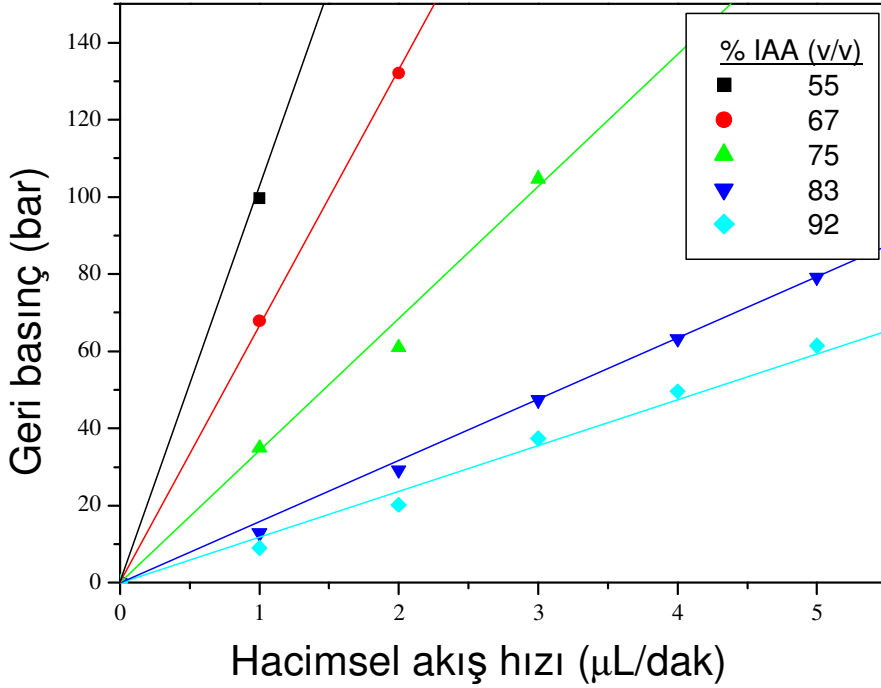
**Şekil 4.14.** % 83 IAA derişimi ile ve farklı çaplara sahip tüplerde sentezlenen TFEM monolit için Merkürü porozimetresi ile elde edilen gözeneklilik dağılımı grafikleri. (A) 1.5 mm kapiler tüp, (B) 2.5 mm kapiler tüp.



**Şekil 4.15.** % 55 IAA derişimi ile ve farklı çaplara sahip tüplerde sentezlenen TFEM monolit için Merkürü porozimetresi ile elde edilen gözeneklilik dağılımı grafikleri. (A) 1.5 mm kapiler tüp, (B) 2.5 mm kapiler tüp.

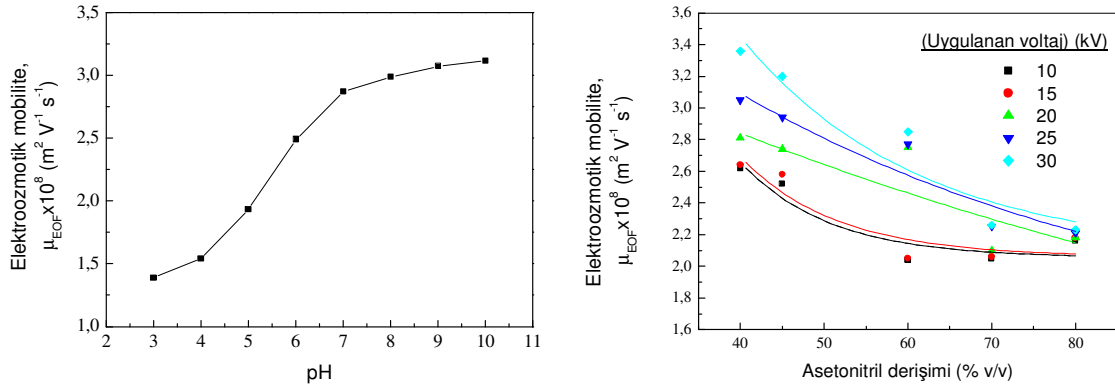
Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin makrogözenek yapısı ayrıca civa porozimetresi ile incelenmiştir. İki farklı IAA derişimi ile poli(TFEM-co-EDM) monolitler, farklı çap değerine sahip cam tüpler içerisinde sentezlenmiş böylece hem IAA derişiminin hem de monolit çapının makro-gözenek yapısı üzerine etkisi incelenmiştir. % 83 ve % 55 IAA derişimleri ile 1.5 ve 2.5 mm iç çap değerine sahip cam tüplerde sentezlenen monolitik yapıların civalı porozimetre ile elde edilen gözenek dağılım eğrileri sırasıyla Şekil 4.14 ve 4.15'te verilmektedir. Bu eğrilerde dikkati çeken en önemli özellik her iki IAA derişimi ile sentezlenen bütün monolitlerin multimodal bir

makro-gözenek yapısına sahip olmalarıdır. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi % 83 IAA derişimi ile sentezlenen poli(TFEM-co-EDM) monolit için 1.5 ve 2.5  $\mu\text{m}$  değerlerinde iki farklı gözenek boyutu değerinde gözenek dağılım eğrisinde pikler gözlenmiştir. Benzer bir yapı % 55 IAA derişimi ile hazırlanan poli(TFEM-co-EDM) monolit için de geçerlidir. Şekil 4.15’de görüldüğü gibi her iki kolon çapı için de 1.5 ve 2.3  $\mu\text{m}$ ’ de gözenek dağılım eğrisinde pikler elde edilmiştir.



**Şekil 4.16.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.

Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen monolitlerin geri basınç-akış hızı eğrileri ise Şekil 4.16’da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi 0-5  $\mu\text{L/dak}$  akış hızı aralığında üretilen bütün monolitler için geri-basınç değeri, akış hızıyla lineer olarak değişmektedir. Artan IAA derişimi ile sabit akış hızında geri basınç değeri azalmaktadır. Bu davranış SEM ile tespit edilen “krater formundaki makro-gözenek sıklığının artışı” bulgusu ile uyumludur. Bu bulgular (SEM görüntüleri, BET sonuçları ve geri-basınç eğrileri) IAA/BD gözenek yapıcı sisteminde, IAA’ün makro-gözenek yapıcı, BD’ün ise mikro-gözenek yapıcı olarak davrandığını ortaya koymaktadır.



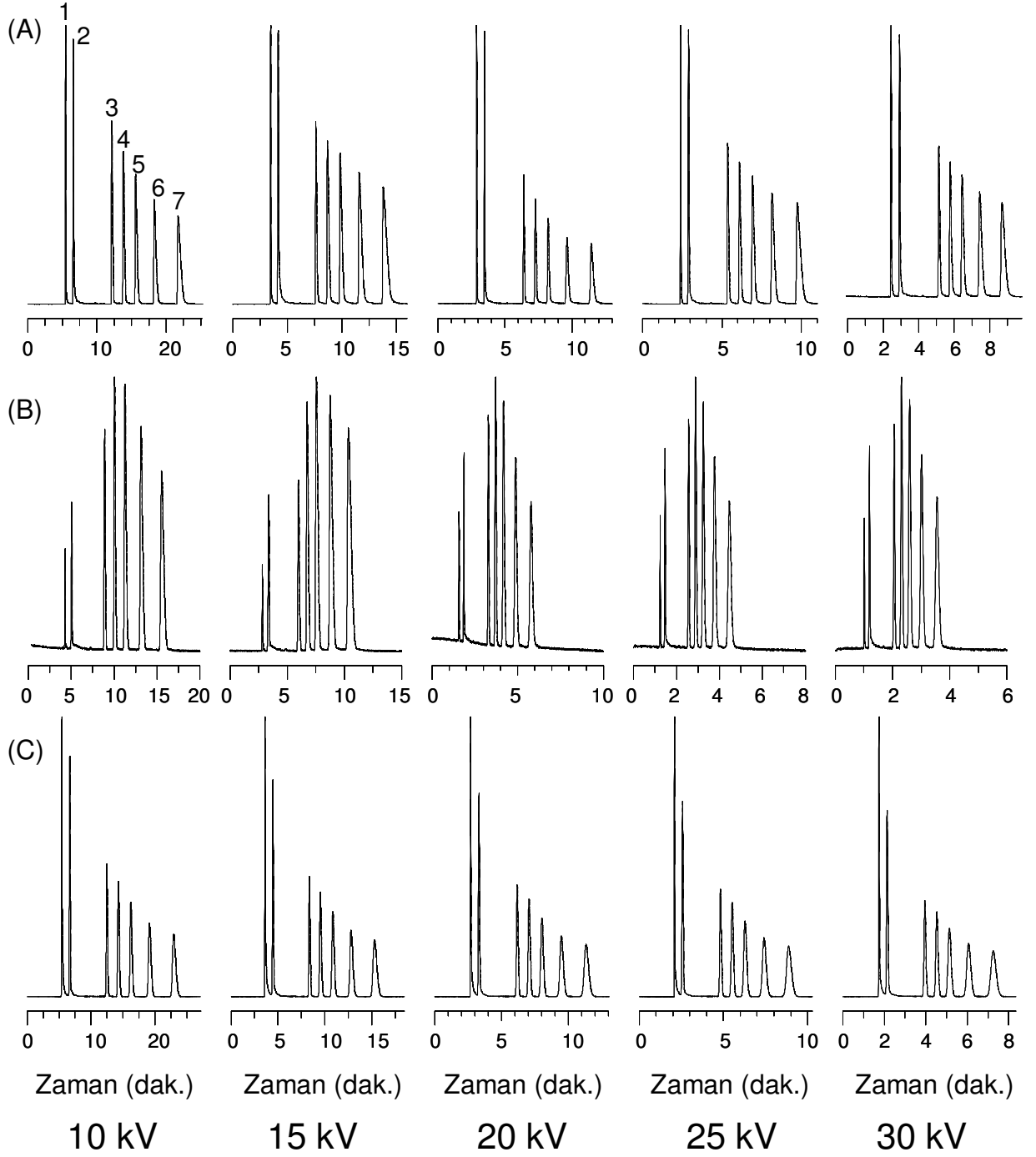
**Şekil 4.17.** % 83 IAA derişimine sahip TFEM monolitin (A) pH, (B) ACN derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.

Poli(TFEM-co-EDM) monolitin elektroozmotik davranışının tanımlanması amacıyla farklı pH ve ACN derişimine sahip mobil fazlar kullanılarak, % 83 IAA derişimi ile sentezlenen kapiler monolitik kolonun elektroozmotik mobilite değerleri hesaplanmıştır. Ölçümlerde kolon içinde tutulmayan analit olarak tiyöüre kullanılmıştır.

Kolon elektroozmotik mobilite değerinin mobil faz pH'ı ile değişimi Şekil 4.17'de verilmektedir. Buradan görüldüğü üzere, özellikle pH 4-7 aralığında elektroozmotik mobilite bariz bir artış göstermektedir. Kuvvetli iyonlaşan gruplar içeren klasik akrilik bazlı kolonlarda pH'ın elektroozmotik mobilite üzerine etkisi sınırlıdır. Bunun nedeni, monolitte bulunan sülfonik asidin güçlü asit formunda yani her pH değerinde kolayca iyonlaşabilen özelliğe sahip olmasıdır. Ancak, flor bazlı kolon için pH'ın elektroozmotik mobilite üzerindeki etkisinin çok bariz olduğu görülmektedir. Bu farklı davranışın flor grubu içeren monolite özgü olduğu düşünülmektedir.

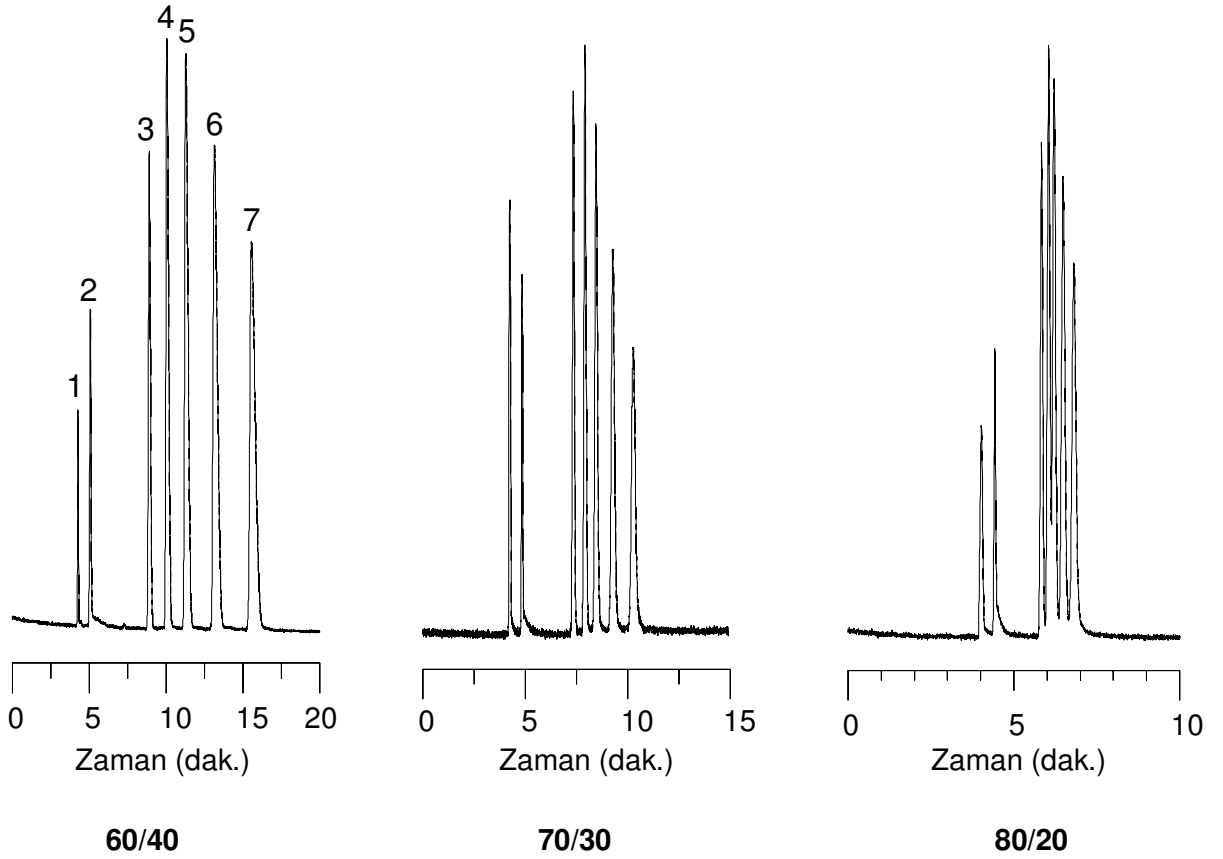
% 83 IAA derişimi ile sentezlenen monolit için elektroozmotik mobiliteye ACN derişiminin etkisi ise yine Şekil 4.17'de verilmektedir. Burada çalışılan bütün voltaj değerlerinde, artan ACN derişimi ile elektroozmotik mobilitenin azaldığı görülmektedir. Bu sonuç artan ACN derişimi ile monolitin iyonik gücündeki oluşan azalma ile açıklanabilir.

#### 4.2.1.2. Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi



**Şekil 4.18.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitler kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. IAA derişimleri (% v/v): (A) 67, (B) 83, (C) 92, ACN/5 mM pH 7 tamponu: 60/40, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Fenol 3. Benzen, 4. Toluen, 5. Etilbenzen, 6. Propilbenzen, 7. Bütilbenzen.

Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen poli(TFEM-co-EDM) monolitler kullanılarak alkilbenzen karışımının farklı voltaj değerlerinde elektrokromatogramları elde edilmiştir. Bu kromatogramlar Şekil 4.18'de verilmektedir. Kromatogramlardan görüldüğü gibi farklı IAA derişimlerinde hazırlanan poli(TFEM-co-EDM) monolitler ile uygulanan bütün voltaj değerlerinde tam bir kromatografik ayrımın gerçekleştiği gözlenmektedir. Ancak artan voltaj değeri ile analiz süresi ksalmasına karşın pik çözünürlüğünde bir düşme meydana gelmektedir. % 83 IAA derişimi ile hazırlanan poli(TFEM-co-EDM) monolitte 30 kV voltaj uygulanması ile kromatografik ayrım 4 dakika içerisinde tamamlanmaktadır. Bu durum kolonun literatürdeki diğer tür monolitler ile yarışır nitelikte olduğunu göstermektedir.



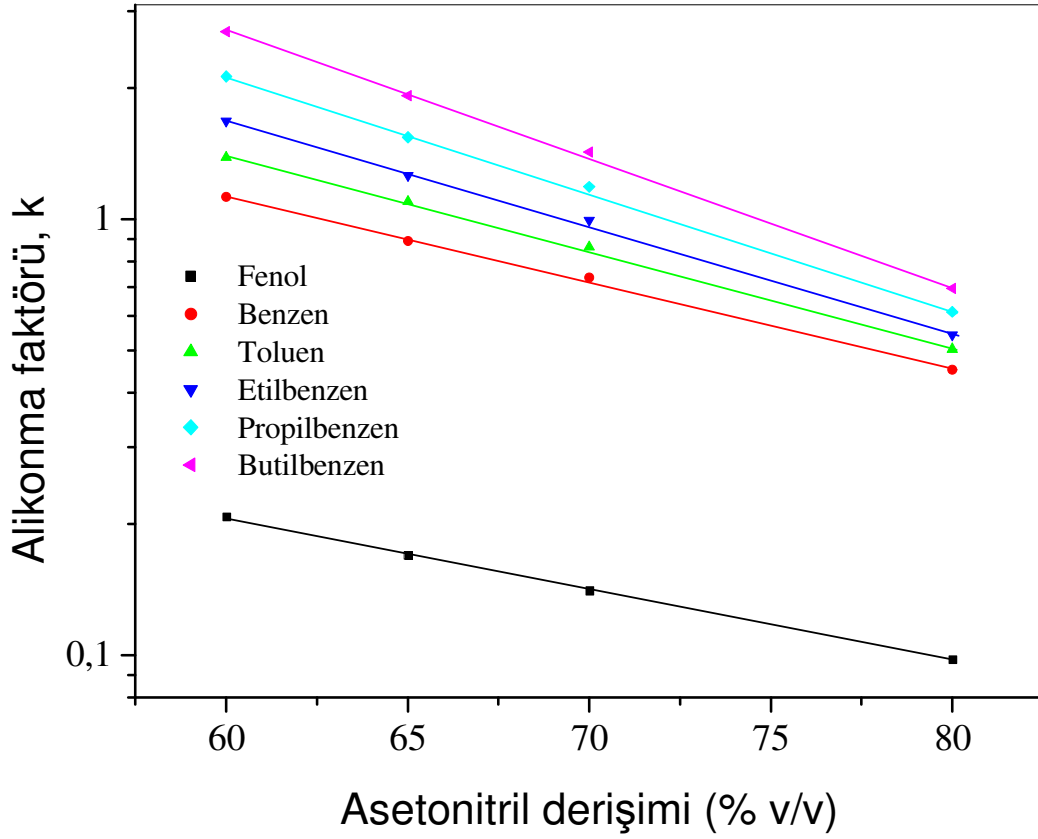
**Şekil 4.19.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolit kullanılarak farklı ACN/pH 7 tamponu oranları elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: değışken, Uygulanan voltaj: 10 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Fenol, 3. Benzen, 4. Toluen, 5. Etilbenzen, 6. Propilbenzen, 7. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.7.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monoliti kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayırımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.

| ACN/Tampon | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60/40      | 4.36   | 13.74  | 3.09   | 2.78   | 3.33   | 3.14   |
| 70/30      | 4.96   | 16.60  | 2.60   | 2.14   | 2.84   | 3.02   |
| 80/20      | 3.96   | 12.91  | 1.54   | 1.00   | 1.56   | 1.45   |

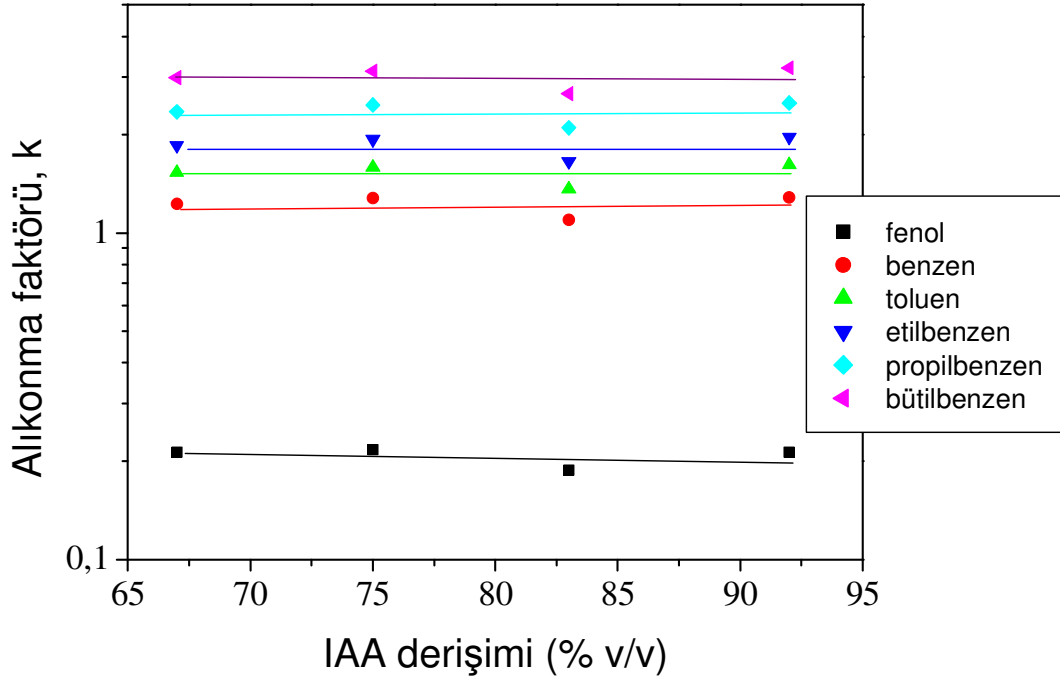
Tampon: 5 mM pH 7 fosfat tamponu, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 10 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Fenol, 3. Benzen, 4. Toluen, 5. Etilbenzen, 6. Propilbenzen, 7. Bütilbenzen.

% 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolit için farklı ACN/Tampon oranları ile alınan alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.19'da verilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri ise Çizelge 4.7'de sunulmaktadır. Gerek şekil 4.19, gerekse Çizelge 4.7'den görüldüğü gibi, % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolit kullanılarak düşük ACN/Tampon oranı değerlerinde (özellikle 60/40) daha iyi bir kromatografik ayırım elde edilmektedir. Bu davranış mevcut akrilik bazlı monolitlere göre, TFEM-co-EDM monolitinin önemli bir avantajını oluşturmaktadır. Mevcut monolitik kolonlar, 80/20 gibi yüksek solvent içeriğine sahip mobil faz varlığında iyi ayırma yeteneğine sahiptir. Oysa, buradan görüldüğü gibi florlu monolitik kolon kullanımıyla, mobil faz için gerekli solvent ihtiyacı % 20 azaltılmış olmaktadır. Bu özellik TFEM monolitinin "green kromatografi"ye daha yakın olduğunu düşündürmektedir.



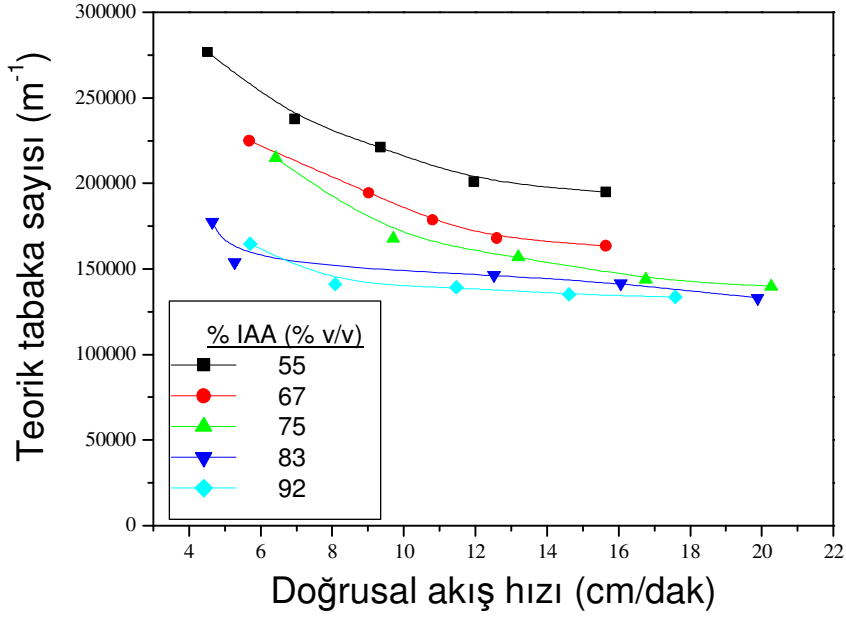
**Şekil 4.20.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 10 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm

Alkilbenzenler için alıkonma faktörünün mobil fazdaki ACN derişimi ile değişimi % 83 IAA derişimi ile sentezlenen poli(TFEM-co-EDM) monolit kullanılarak incelenmiştir. Alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.20’de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi her bir alkilbenzen homologuna ait alıkonma faktörü artan ACN derişimi ile azalmaktadır. Düşük ACN derişimlerinde alkilbenzen türevlerinin alıkonma faktörleri arasındaki fark daha belirgindir. Bu durum TFEM bazlı monolit kullanılarak düşük ACN derişimleri ile elektrokromatografik ayırmanın daha iyi yapılabileceğini doğrulamaktadır.

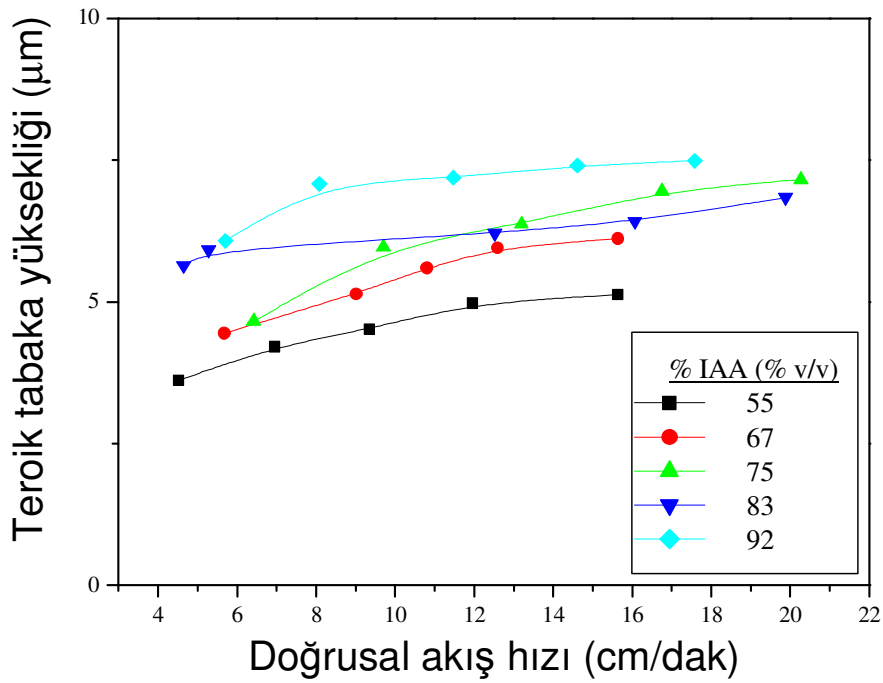


**Şekil 4.21.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 10 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100  $\mu$ m

Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen monolitler için alıkonma faktörünün IAA derişimi ile değişimi ise Şekil 4.21’de verilmektedir. Buradaki alıkonma faktörleri 60/40 ACN/Tampon içeren mobil faz ile elde edilmiştir. Şekli 4.21’den görüleceği üzere, monolit sentezinde kullanılan IAA derişimi oldukça geniş bir aralıkta alıkonma faktörü üzerinde etkili değildir. Bu durum çalışılan IAA derişim aralığında üretilen bütün monolitler ile başarılı bir elektrokromatografik ayırım yapılabileceğini ortaya koymaktadır.

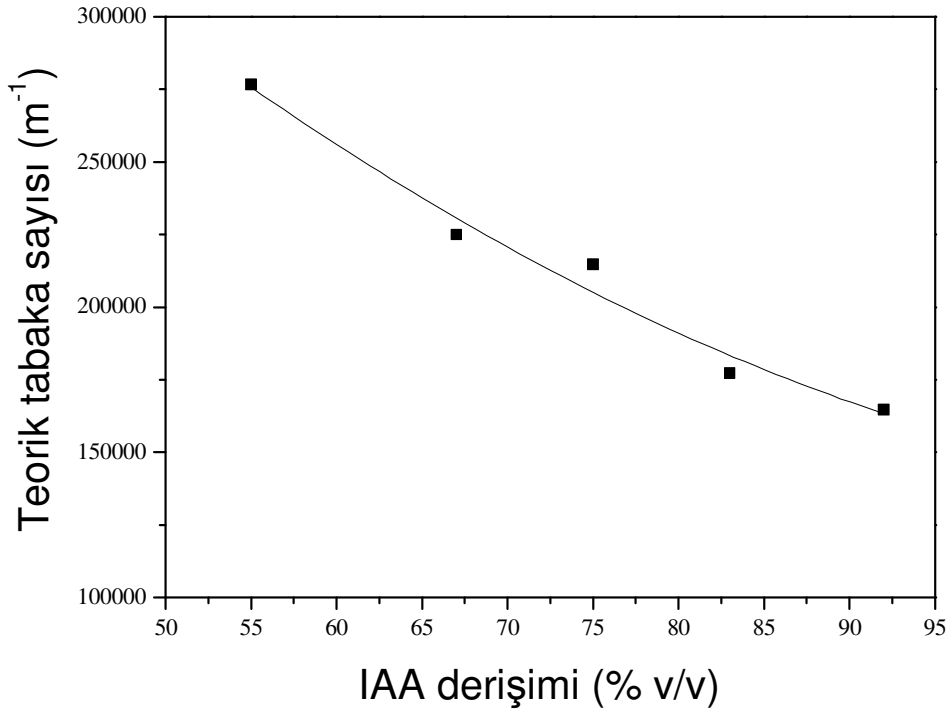


**Şekil 4.22.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi (Van-Deemter grafiği). Analit: tiyoüre.



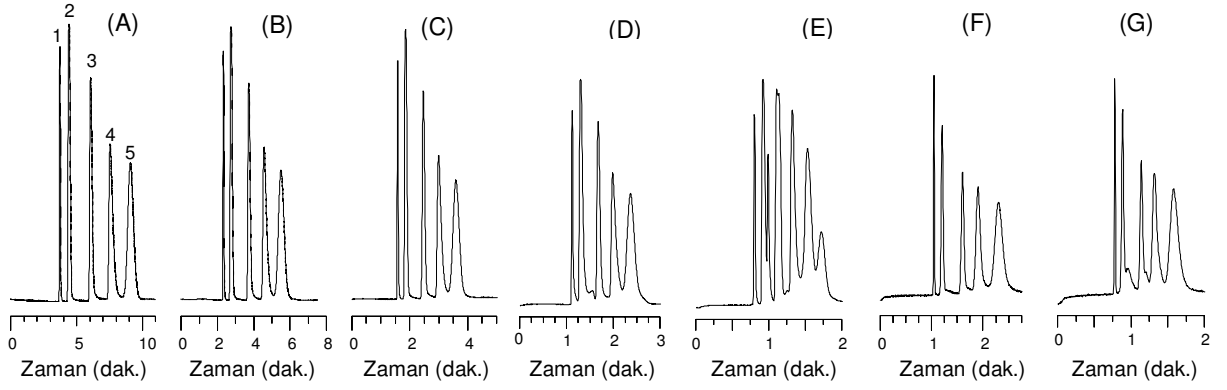
**Şekil 4.23.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi. Analit: tiyoüre.

Poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin ayırma verimi davranışı analit olarak tiyoüre kullanımı ile incelenmiştir. Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen poli(TFEM-co-EDM) monolitlerde teorik tabaka sayısının ve tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi, 60/40 ACN/Tampon oranı ile hazırlanan mobil faz için sırasıyla Şekil 4.22 ve 4.23'te verilmektedir. Şekil 4.22 ve 4.23'ten görüldüğü gibi % 55 IAA derişimi ile hazırlanan monolitik kolon ile  $280.000 \text{ m}^{-1}$  değerine ulaşan teorik tabaka sayıları ve  $3 \text{ }\mu\text{m}$ 'a düşen tabaka yükseklikleri elde edilmiştir. Bu değerler literatürde yer alan elektrokromatografik ayırmalar dikkate alındığında oldukça yüksek kolon verimlerine tekabül etmektedir. Şekil 4.22'den farklı IAA derişimleri ile hazırlanan bütün monolitlerde ayırma veriminin artan akış hızıyla önemli bir düşüş göstermediği dikkati çekmektedir. Yaklaşık % 30 oranında bir düşüş yalnızca % 55 IAA derişimi ile hazırlanan monolit ile gözlenmektedir. Diğer monolitlerde düşük akış hızlarında % 55 IAA derişimi ile sentezlenen monolite kıyasla daha düşük teorik tabaka sayıları elde edilmesine rağmen, kolon veriminin akış hızıyla değişiminin çok kararlı olduğu görülmektedir. Genelde literatürde  $200.000 \text{ m}^{-1}$  değerinin üzerinde olan teorik tabaka sayıları çok iyi elektrokromatografik ayırmaları tanımlamaktadır. Elde edilen kolon verimi davranışı sentezlenen monolitlerin ticari monolitler ile yarışabilir olduğunu göstermektedir. Yüksek ayırma verimine sahip monolitlerin kullanımı ile, uygulanan voltaj değerinin 3 kat arttırılması sonucu kromatografik analiz süresi 3 kat kısaltılabilmekte ve alkilbenzenlerin kromatografik ayırımı yaklaşık 4 dakikalık bir sürede tamamlanabilmektedir. Bu davranış BMA bazlı monolitlerde olduğu gibi üstün ayırma yeteneğine sahip kapiler monolitler için gözlenebilen tipik bir kromatografik özelliktir.



**şekil 4.24.** Farklı IAA derişimleri ile sentezlenen TFEM monolitlerde teorik tabaka sayısının IAA derişimi ile değişimi. Analit: tiyoüre. Uygulanan voltaj: 10 kV

Sabit voltaj değerinde, monolit sentezinde kullanılan IAA derişiminin kolon verimine etkisi şekil 4.24'te gsterilmektedir. Bu grafik 60/40 ACN/Tampon oranı içeren mobil faz kullanılarak, 10 kV analiz voltajı değerinde elde edilmiştir. Buradan gsterildiği gibi teorik tabaka sayısı artan IAA derişimi ile belirli bir dūřuř gstermektedir. Bu sonuç poli(TFEM-co-EDM) monolit sentezinde hacimce % 55-75 aralığında IAA içeren gzenek yapıcı zöcö sistemin kullanılmasının daha uygun olduğunu gstermektedir.



**Şekil 4.25.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda fenol türevlerinin elektrokromatografik ayırımına uygulanan voltaj değerinin etkisi. Mobil faz: 35/65 v/v ACN/10 mM fosfat tamponu pH 7 veya 8, 22°C, Kolon apı:100 µm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Enjeksiyon 5 kV, 3s. 200 nm. pH ve voltaj (kV): (a) 8, 10, (b) 8, 15, (c) 8, 20, (d) 8, 25, (e) 8,30, (f) 7, 25, (g) 7, 30, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. 3,5-dinitrofenol.

% 83 IAA derişimi ile hazırlanan TFEM monolit aynı zamanda fenollerin de kromatografik ayırımında kullanılmıştır. Bu ayırım iki pH değeri, 7 ve 8 için denenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.25'te verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi pH 8 değerinde, düşük voltaj değerlerinde iyi bir kromatografik ayırım elde edilmektedir. Yüksek voltaj değerlerine çıkıldığında, pH 7 değerinde kromatografik ayırımın daha iyi gerçekleştirildiği görülmektedir. Özellikle 30 kV değerinde analiz 2 dakika gibi çok kısa bir sürede tamamlanabilmektedir.

**Çizelge 4.8.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolit için farklı pH değerlerinde fenol türevlerinin ayırımında voltajın pik çözünürlüğüne etkisi.

pH 7, 10 mM fosfat tamponu, ACN/Tampon: 35/65 v/v.

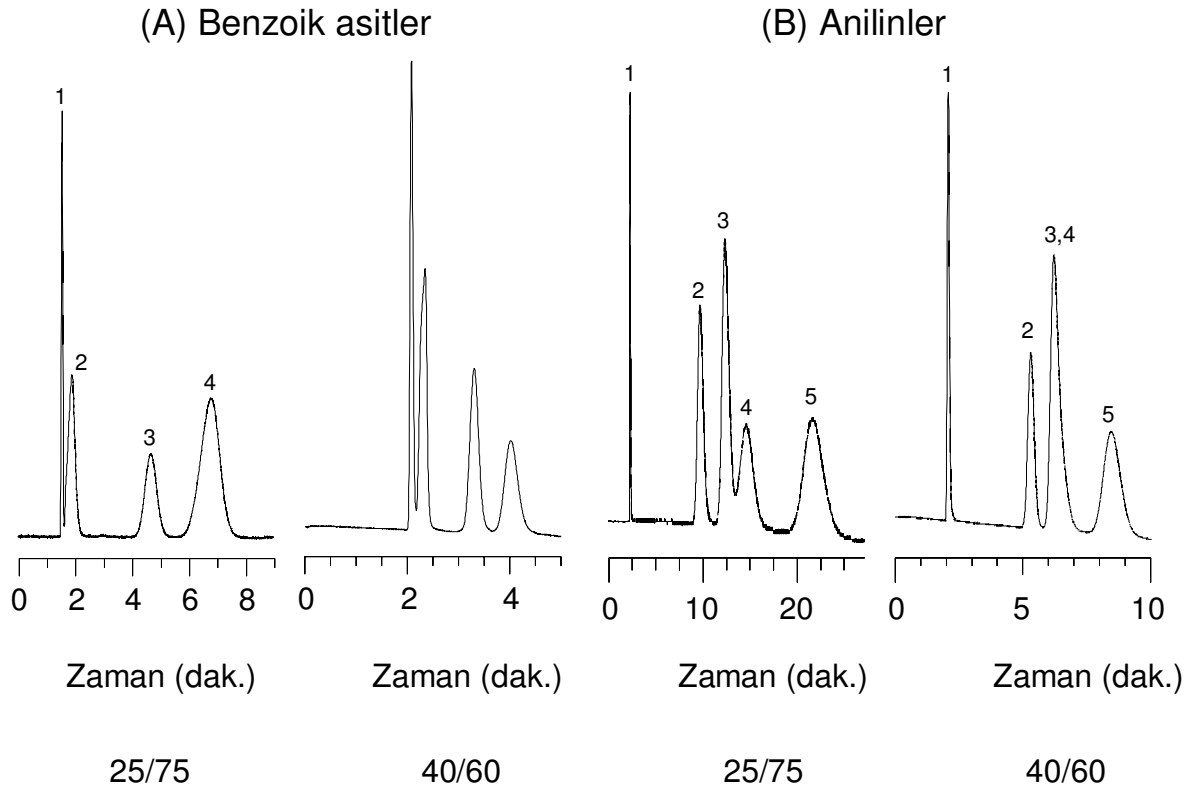
| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 3.63   | 6.33   | 3.50   | 2.55   |
| 15          | 3.12   | 6.00   | 2.88   | 2.31   |
| 20          | 2.23   | 4.93   | 2.80   | 1.98   |
| 25          | 1.98   | 4.44   | 2.50   | 1.88   |
| 30          | 1.89   | 4.29   | 2.46   | 1.72   |

pH 8, 10 mM fosfat tamponu, ACN/Tampon: 35/65 v/v.

| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 2.98   | 4.69   | 3.18   | 2.33   |
| 15          | 2.45   | 3.81   | 2.50   | 1.88   |
| 20          | 2.28   | 3.58   | 2.25   | 1.68   |
| 25          | 1.72   | 2.51   | 1.39   | 1.26   |
| 30          | 1.68   | 1.57   | 1.32   | 1.06   |

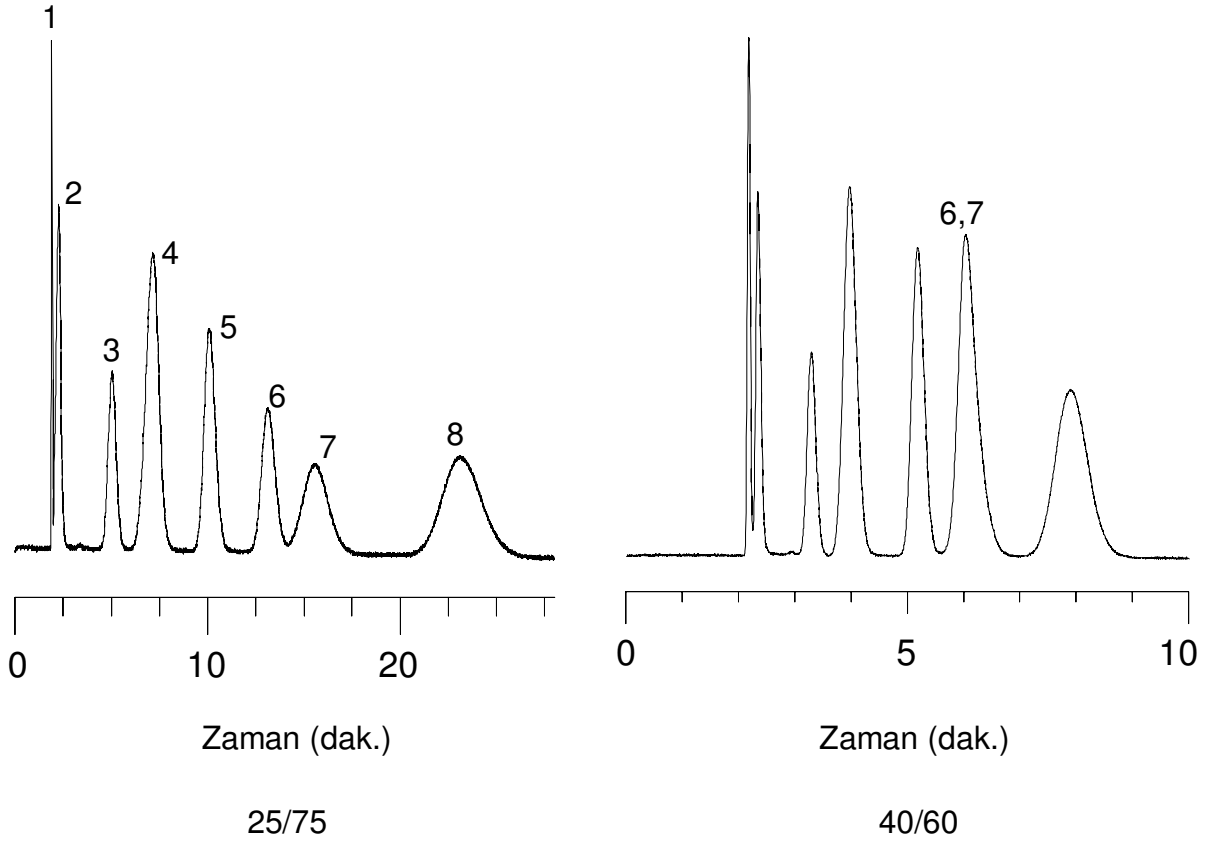
Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, DAD dedektör 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. 3,5-dinitrofenol.

Kromatografide başarılı bir ayırımın gerçekleşmesi için çözünürlük değerlerinin 1.5'den büyük olması beklenir. Fenollere ait farklı pH ve voltaj değerlerinde hesaplanan çözünürlük değerleri kromatografik ayırımın istenilen şekilde gerçekleştiğinin göstermektedir (Çizelge 4.8). pH 8 için yüksek voltaj değerlerinde bu değerler düşük olmasına karşın kromatogramlardan da görüldüğü gibi bu koşullarda da ayırımın gerçekleştiği söylenebilir.



**Şekil 4.26.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda anilin ve benzoik asit türevlerinin elektrokromatografik ayrımının farklı voltaj ve ACN/10 mM pH 4.5 fosfat tamponu oranlarında incelenmesi Kolon çapı:100  $\mu$ m, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Enjeksiyon 10 kV, 5 s, DAD dedektör 254 nm, Uygulanan voltaj: 20 kV. Pik sırası: Benzoik asitler: 1. Tiyoüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit, Anilinler: 1. Tiyoüre, 2. 2-nitroanilin, 3. 3-nitroanilin, 4. 2,4-dinitroanilin, 5. 3,5-dinitroanilin.

Anilin ve benzoik asit türevleri florlu monolit ile ayrılmak üzere yüklü analitler olarak seçilmiştir. İki farklı ACN/Tampon değerlerinde anilin ve benzoik asit türevlerinin ayrımı Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Bu kromatogramlardan ve Çizelge 4.9'dan görüldüğü gibi iki tür analit grubu için de düşük ACN/Tampon oranında (25/75) daha iyi ayırım gerçekleşmiştir.



**Şekil 4.27.** % 83 IAA derişim ile hazırlanan TFEM monolitik kolonda benzoik asit ve anilin türevlerinin eş-zamanlı elektrokromatografik ayırımının farklı ACN/10 mM pH 4.5 fosfat tamponu oranlarında incelenmesi, Kolon çapı: 100 µm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon 10 kV, 5 s, DAD dedektör 254 nm, Pik sırası: 1. Tiyüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit 5. 2-nitroanilin, 6. 3-nitroanilin, 7. 2,4-dinitroanilin, 8. 3,5-dinitroanilin.

Asidik ve bazik analitlerin eş-zamanlı olarak tek bir analizde ayırımı gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlardan (Şekil 4.27) ve Çizelge 4.9 daki çözünürlük değerlerinden görüldüğü gibi bu analitlerin eş-zamanlı olarak tek bir analizde başarılı bir ayırımı gerçekleştirilmiştir. 25/75 ACN/Tampon oranında iyi bir ayırımın gerçekleştiği gözlenmektedir. Yüksek ACN/Tampon oranlarında (40/60) 6. ve 7. piklerin (3-nitroanilin, 2,4-dinitroanilin) ayrılamadığı görülmektedir. Bu gruptaki elektrokromatografik deneylerde ACN/Tampon oranı ve uygulanan voltaj değiştirilerek, en iyi ayırmanın olduğu elektrokromatogramlar elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.27'de verilen elektrokromatogramlar poli(TFEM-co-EDM)

monolitinin kullanılması ile literatürde ilk kez aynı kolonda anilin ve benzoik asit türevlerinin ayrılabilmesini göstermiştir.

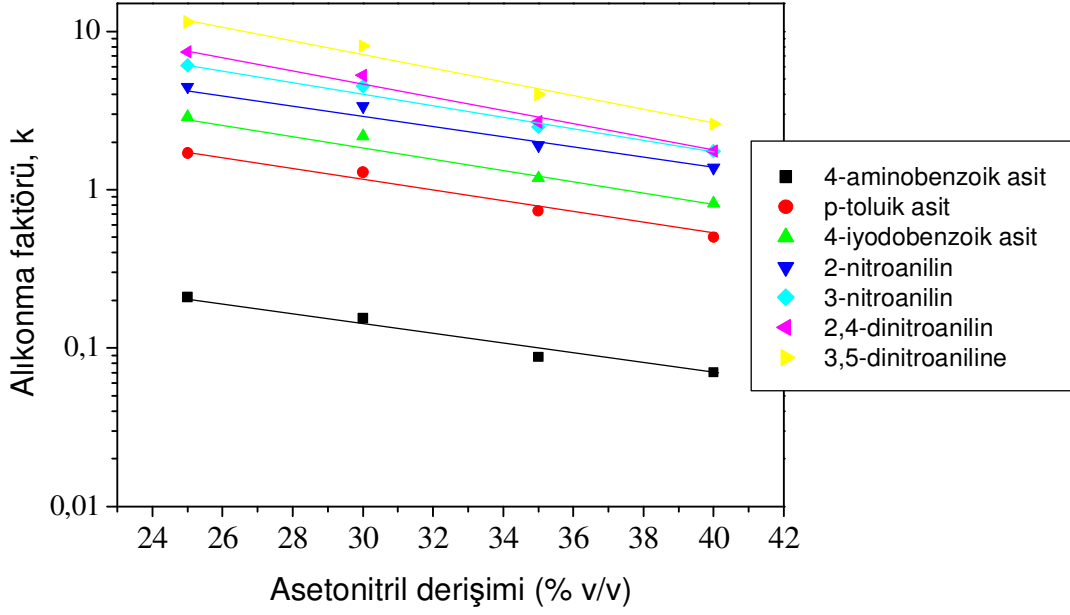
**Çizelge 4.9.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monoliti kullanılarak, benzoik asitlerin ve anilinlerin kromatografik ayrımında elde edilen pik çözünürlük değerleri.

| ACN/Tampon | Voltaj(kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) |
|------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 25/75      | 17         | 1.82   | 4.83   | 2.63   | 1.77   | 2.29   | 1.09   | 2.98   |
| 25/75      | 20         | 1.73   | 4.73   | 2.49   | 2.76   | 2.22   | 1.09   | 2.95   |
| 30/70      | 20         | 1.63   | 4.62   | 2.49   | 2.79   | 2.22   | 1.09   | 2.58   |
| 35/65      | 20         | 1.57   | 4.54   | 2.45   | 2.91   | 1.85   | 1.00   | 2.45   |
| 40/60      | 10         | 1.73   | 5.10   | 2.44   | 4.10   | 1.97   | 0.00   | 2.95   |
| 40/60      | 20         | 1.46   | 4.50   | 2.17   | 3.49   | 1.72   | 0.00   | 2.39   |

Mobil faz: ACN/10 mM pH 4.5 fosfat tamponu, Efektif kolon uzunluğu: 20 cm. Kolon çapı: 100 µm, DAD dedektör 254 nm, 1. tiyoüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit, 5. 2-nitroanilin, 6. 3-nitroanilin, 7. 2,4-dinitroanilin, 8. 3,5-dinitroanilin.

| ACN/Tampon | Benzoik Asitler |        |        | Anilinler |        |        |        |
|------------|-----------------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
|            | R(2/1)          | R(3/2) | R(4/3) | R(2/1)    | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) |
| 25/75      | 1.85            | 7.74   | 4.81   | 11.82     | 2.12   | 1.19   | 2.95   |
| 40/60      | 1.81            | 3.73   | 1.82   | 11.55     | 1.62   | 0.00   | 2.20   |

Mobil faz: ACN/10 mM pH 4.5 fosfat tamponu, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm. Kolon çapı: 100 µm, DAD dedektör 254 nm, Pik sırası: Benzoik asitler: 1. Tiyoüre, 2. 4-aminobenzoik asit, 3. p-toluik asit, 4. 4-iyodobenzoik asit. Anilinler: 1. tiyoüre, 2. 2-nitroanilin, 3. 3-nitroanilin, 4. 2,4-dinitroanilin, 5. 3,5-dinitroanilin.



**Şekil 4.28.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolitte yüklü analitler için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 10 kV, 5 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 254 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm.

ACN/Tampon oranının yüklü analitlerin alıkonma faktörleri üzerindeki etkisi Şekil 4.28'de verilmektedir. Bu şekilden görüleceği gibi kullanılan ACN/Tampon oranları aralığında 3-nitroanilin ve 2,4-nitroanilin hariç bu analitlerin eş-zamanlı ayırımı gerçekleştirilebilmektedir. Böylece, benzer çalışmalara göre daha düşük ACN derişimlerinde anilin ve benzoik asit türevlerinin eş-zamanlı olarak tek bir analizde ayrılabilceği gösterilmiştir. (Ping, G. et al, 2004)

**Çizelge 4.10.** % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolit için alkilbenzelerde kromatografik cevabın tekrarlanabilirliği.

| Bileşen      | Analizden analize<br>tekrarlanabilirlik<br>BSS (%) | Günden güne<br>tekrarlanabilirlik<br>BSS (%) |
|--------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Tiyoüre      | 0.21                                               | 1.39                                         |
| Fenol        | 0.47                                               | 1.45                                         |
| Benzen       | 0.52                                               | 1.23                                         |
| Toluen       | 0.57                                               | 1.31                                         |
| Etilbenzen   | 0.65                                               | 1.30                                         |
| Propilbenzen | 0.64                                               | 1.29                                         |
| Butilbenzen  | 0.64                                               | 1.19                                         |

ACN/ 5 mM pH 7 fosfat tamponu: 60/40 v/v, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, DAD dedektör, 200 nm.

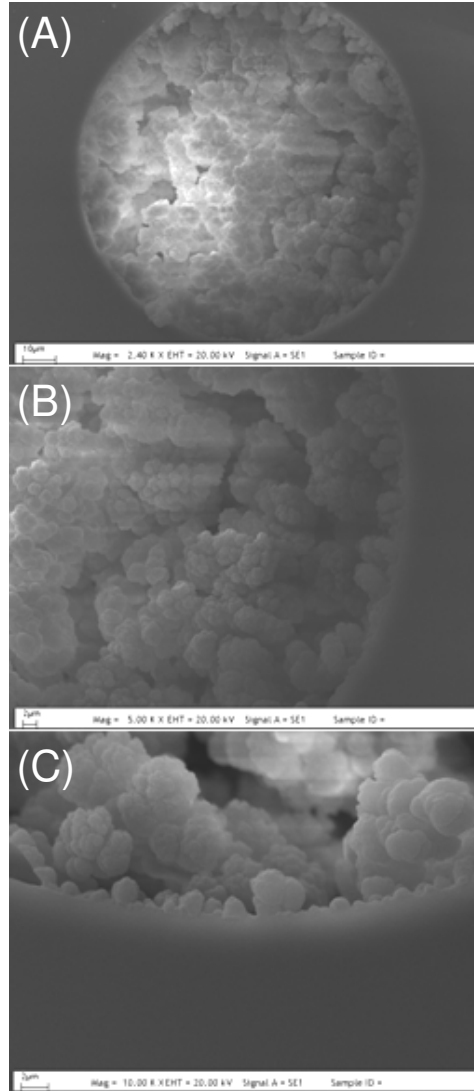
Poli(TFEM-co-EDM) monolit için kromatografik cevabın tekrarlanabilirliği ise Çizelge 4.10'da sunulmaktadır. Bu değerler alkilbenzen türevleri içeren analit karışımıyla ve % 83 IAA derişimi ile sentezlenen monolitik kolon kullanılarak elde edilmiştir. Görüldüğü gibi analizden analize tekrarlanabilirlik % 1, günden güne tekrarlanabilirlik de % 1.5 değerinin altında bulunmaktadır. Bu sonuçlar, poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin kromatografik analizlerin güvenle elektrokromatografika analizde kullanılabileceğini göstermektedir.

#### 4.2.2. Poli(Trifloroetil metakrilat-co-Propargil akrilat-co-Etilen dimetakrilat) monolit

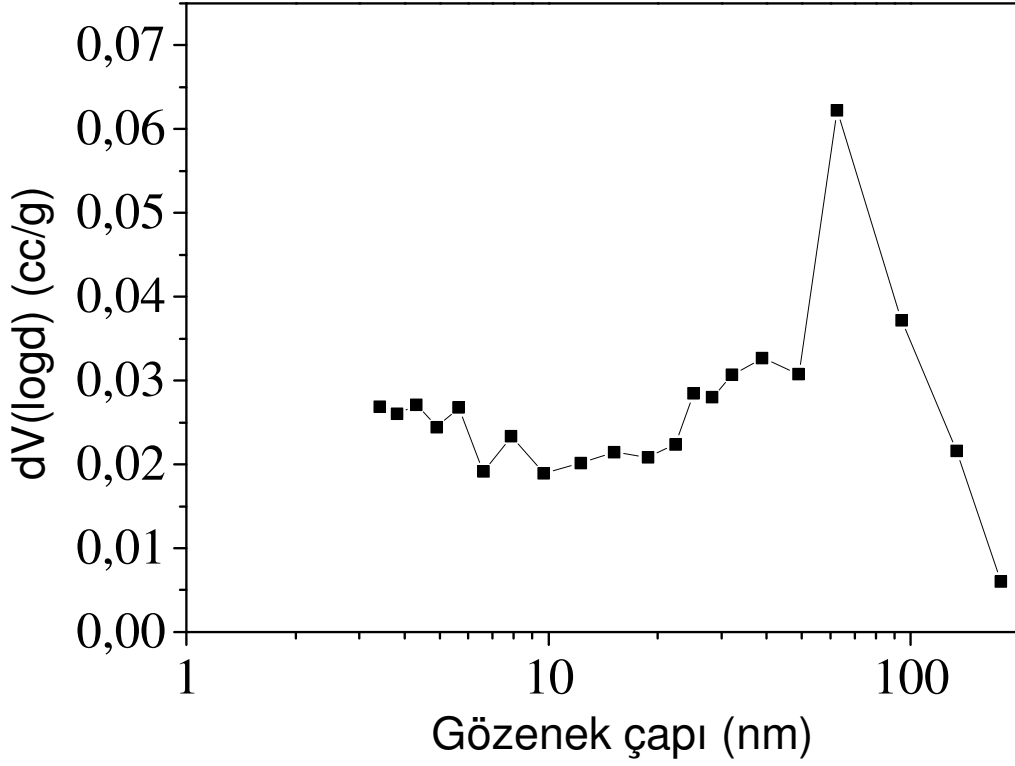
Tezin bu bölümünde monolitin kolon duvarına yapışması için kullanılan klasik duvar modifikasyon prosedürü yerine 'Kolay bağlanma' bazlı yeni bir yöntem önerilmiştir. Bir önceki bölümde anlatılan TFEM monolitlerden % 83 IAA derişimi ile sentezlenen monolit seçilmiştir.

Bu monolitin morfolojik yapısı ve kromatografik performansı bu bölümde tartışılmıştır.

##### 4.2.2.1. Poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolitin karakterizasyonu



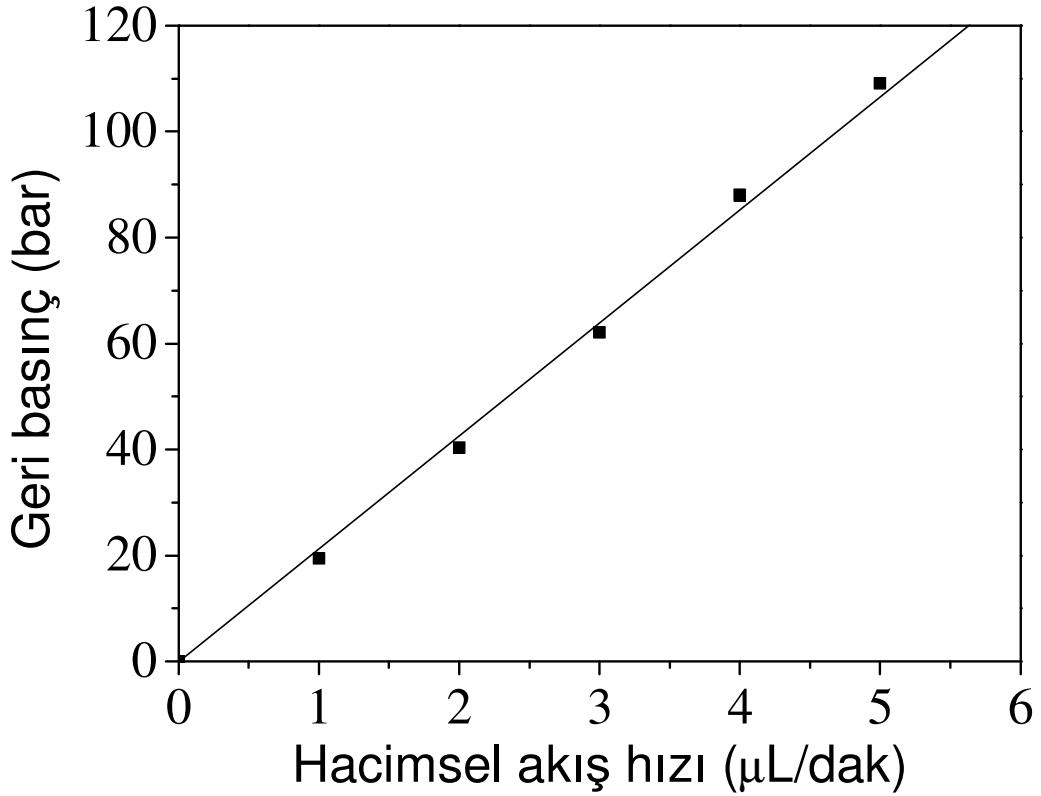
**Şekil 4.29.** TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: (A) 2500X, (B) 5000X, (C) 10000X.



**Şekil 4.30.** TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının gözeneklilik özelliklerini gösteren BET grafiği.

**Çizelge 4.11.** TFEM-co-PA-co-EDM monolitik yapının özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.

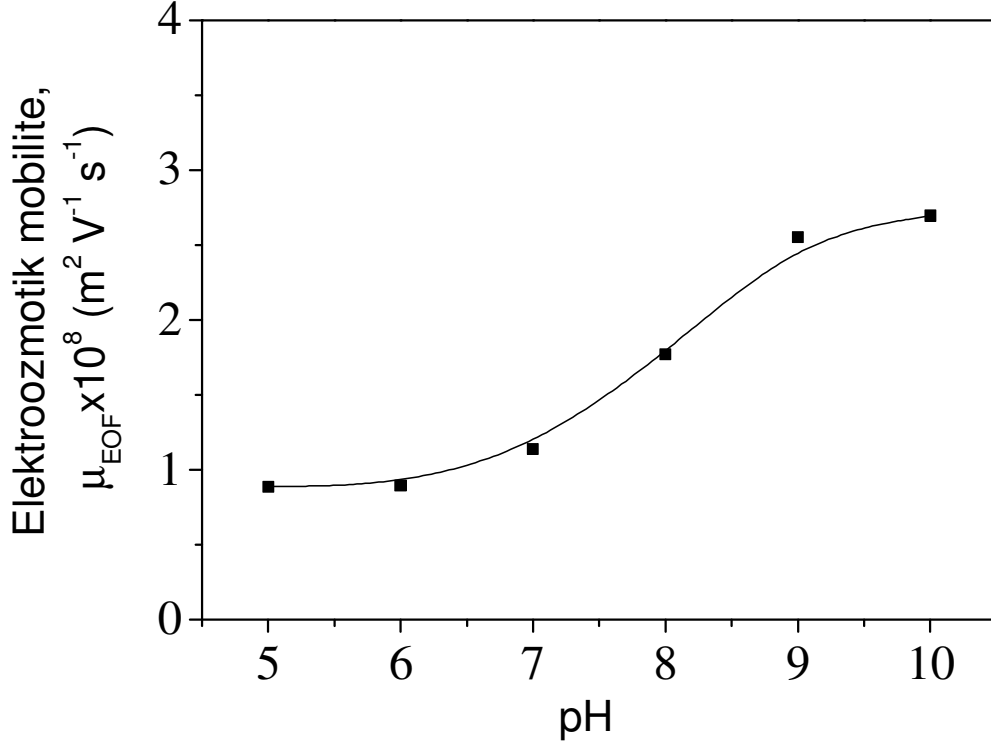
| Özgül yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) | Gözenek çapı (nm) |
|---------------------------------------|-------------------|
| 17.50                                 | 5.327             |



**Şekil 4.31.** TFEM-co-PA-EDM monolitinin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.

SEM görüntülerinden (Şekil 4.29) görüldüğü gibi poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolitinin kapiler kolon duvarına yapışmasının istenilen şekilde olduğu gözlenmektedir. Bu durum önerilen yeni kolon duvar modifikasyonunun uygun olduğunu göstermektedir. Bu monolit bölüm 4.2 de anlatılan TFEM monolitler içerisinde % 83 IAA derişimine sahip monolitinin reçetesine PA'ın eklenmesi ile sentezlenmiştir. Yani aynı gözenek yapıcı oranına sahiptir. PA'ın monolitinin yapısına girmesi ile ve kolon duvarına yapışma kimyasının değişmesi ile kolonda morfolojik olarak değişimler gözlenmektedir. Bölüm 4.2'de anlatılan TFEM monolite göre mikro-gözenek ortalama çapı artmış ve bu gözeneklerin hacimce miktarı 0.03 cc/g dan 0.06 cc/g a yükselmiştir (Şekil 4.30, Çizelge 4.11). Bu da mikro-gözenek miktarının açıkça arttığını gösterir. Dolayısıyla geri-basınç eğrisinden de görüldüğü gibi 5 µl/dak için 75 bar civarında olan basınç değeri 100

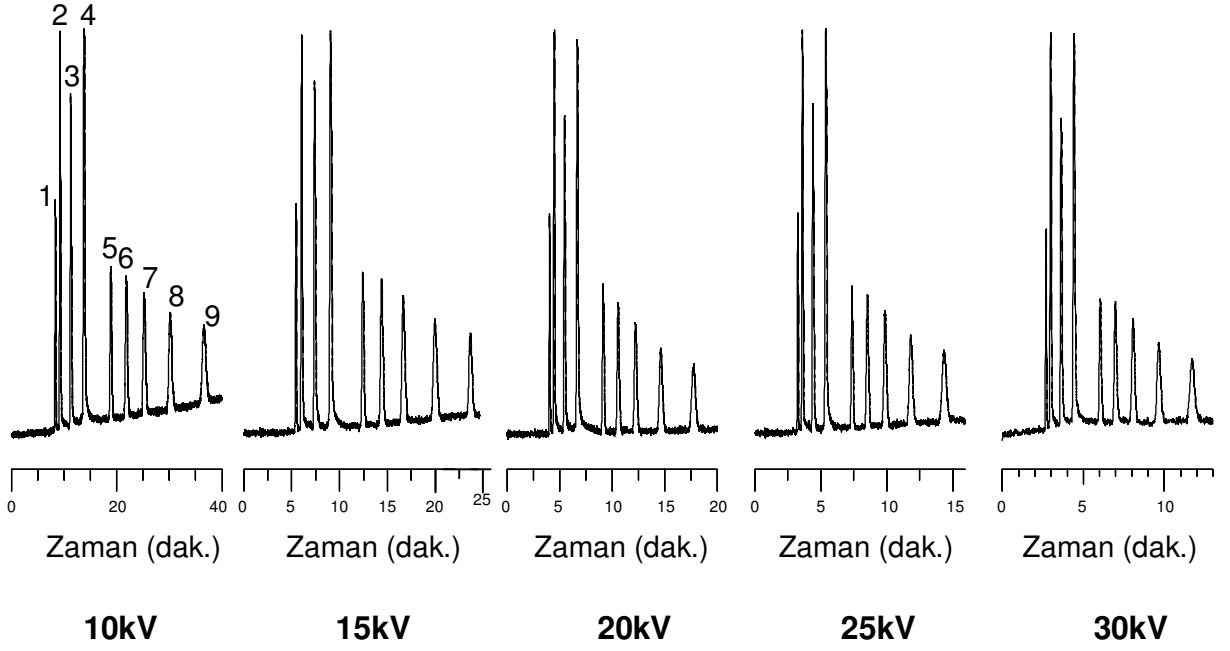
bar civarına çıkmıştır (Şekil 4.31). Bu da kolonda daha sıkı bir yapının oluştuğunu gösterir.



**Şekil 4.32.** TFEM-co-PA-EDM monolitin pH a karşı elektroozmotik mobilite değerleri.

Bu kolona ait elektroozmotik mobilitenin bölüm 4.2’de anlatılan TFEM monolitle aynı davranışı gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.32). Dolayısıyla aynı yorumlar bu monolit için de geçerlidir. Ancak bu monolitte elektroozmotik mobilite değerlerinde hafif bir azalma görülmektedir. Bunun sebebi olarak monolit yapısına katın PA’ın monolit yüzeyinde bulunan sülfonik asit gruplarının iyonlaşmasını kısmen etkilediği söylenebilir.

#### 4.2.2.2. Poli(TFEM-co-PA-EDM) monolitin kromatografik performansının incelenmesi



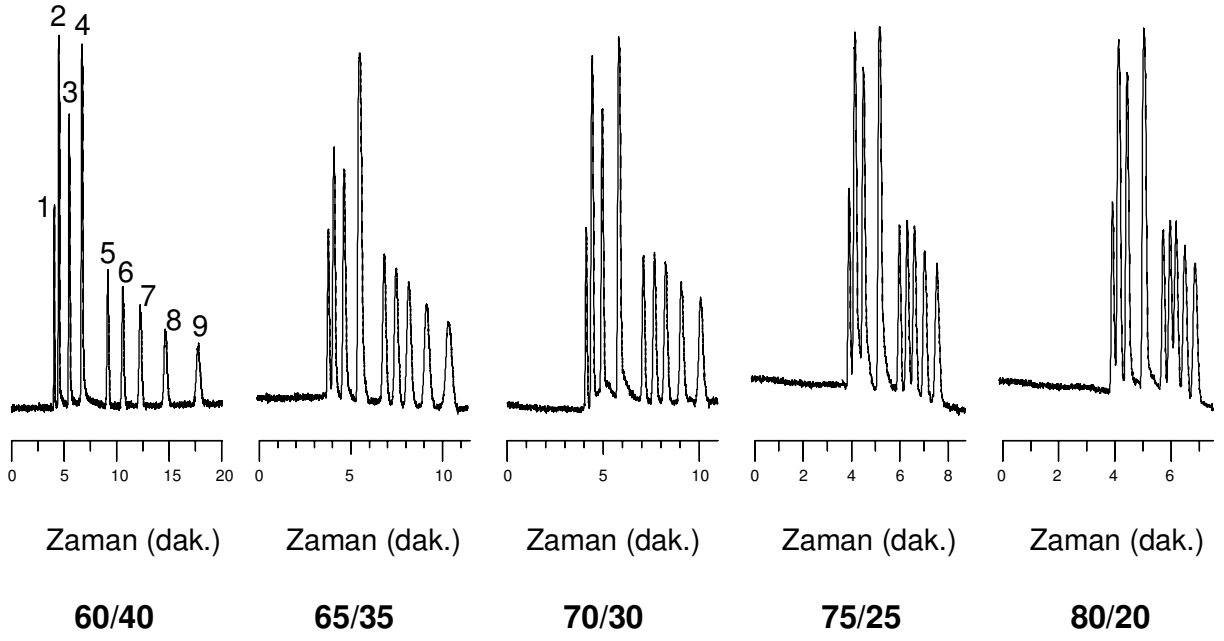
**Şekil 4.33.** TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak farklı voltaj değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. ACN/5 mM pH 7 tamponu: 60/40, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyu: 20 cm, Kolon çapı: 100  $\mu$ m, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehit, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.12.** TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı voltajlarda elde edilen pik çözünürlük değerleri.

| Voltaj(kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10         | 3.25   | 5.24   | 5.60   | 10.28  | 4.87   | 5.07   | 5.33   | 5.43   |
| 15         | 3.19   | 5.19   | 5.36   | 9.82   | 4.77   | 4.93   | 5.52   | 5.17   |
| 20         | 2.50   | 3.95   | 4.46   | 8.60   | 4.24   | 4.39   | 4.83   | 4.87   |
| 25         | 2.35   | 3.86   | 4.40   | 8.27   | 3.97   | 4.17   | 4.73   | 4.82   |
| 30         | 2.35   | 3.86   | 4.00   | 8.08   | 3.90   | 3.86   | 4.57   | 4.61   |

ACN/5 mM pH 7 tamponu: 60/40, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehid, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Şekil 4.33 ve Çizelge 4.12 alkilbenzen ve fenol türevleri karışımıyla alınan kromatogramlarla uygun ayrımın gerçekleştirildiğini göstermektedir. TFEM monolit yapısını PA'nın girmesi monolitin hidrofobitesini değiştirmiştir. Böylece kromatogramlara fazladan 2 analitin daha katılması sağlanmıştır. Alınan bu kromatogramlar uygulanan yeni kolon modifikasyon prosedürünün kolonun hidrofobitesinin değiştirilebilmesi için kullanılabileceğini göstermektedir.



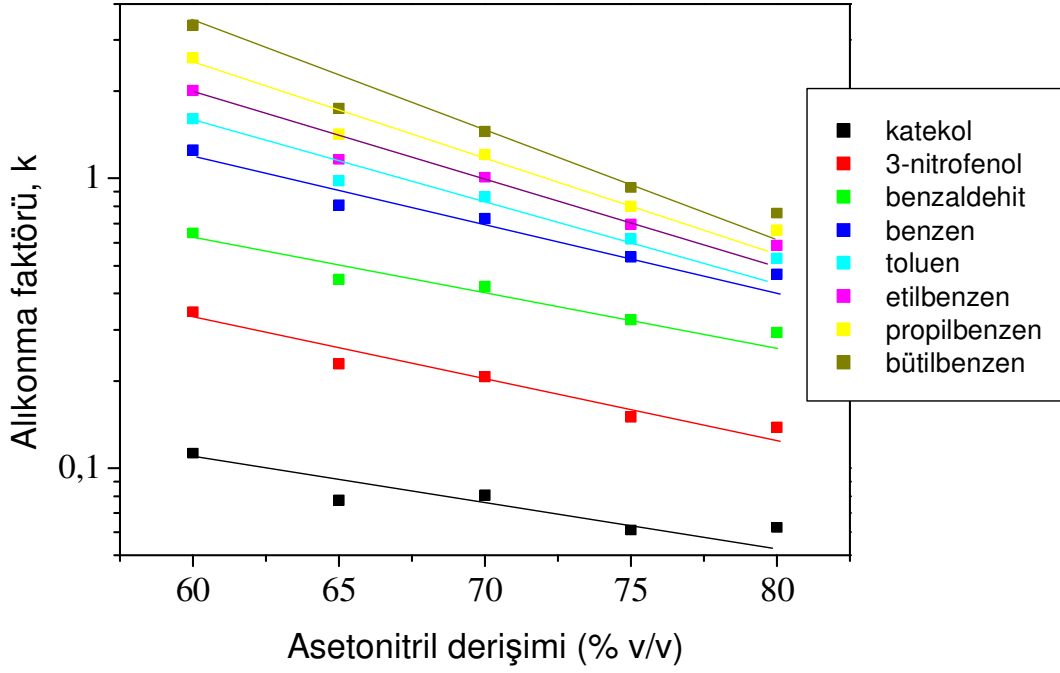
**Şekil 4.34.** TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak farklı ACN/5 mM pH7 fosfat tamponu değerlerinde elde edilen alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar. Uygulanan volataj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon boyu: 20 cm, Kolon çapı: 100  $\mu$ m, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehit, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.13.** TFEM-co-PA-EDM monolit kullanılarak, alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranlarında elde edilen pik çözünürlük değerleri.

| ACN/Tampon | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60/40      | 2.50   | 3.95   | 4.46   | 8.60   | 4.24   | 4.39   | 4.83   | 4.87   |
| 65/35      | 1.70   | 2.48   | 2.73   | 3.82   | 1.90   | 1.91   | 2.31   | 2.47   |
| 70/30      | 1.63   | 2.08   | 2.70   | 3.48   | 1.73   | 1.71   | 2.00   | 2.13   |
| 75/25      | 1.52   | 1.75   | 2.61   | 2.87   | 1.24   | 1.09   | 1.31   | 1.35   |
| 80/20      | 1.50   | 1.59   | 2.55   | 2.61   | 1.05   | 0.89   | 1.02   | 1.12   |

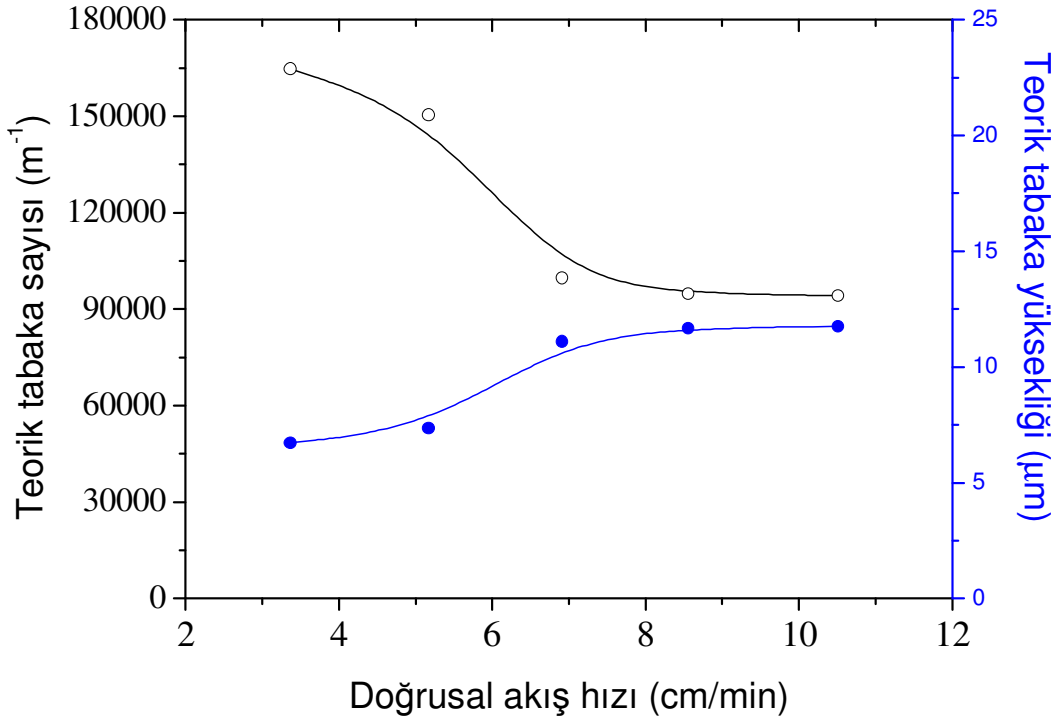
Uygulanan voltaj: 20 kV, Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöre, 2. Katekol, 3. 3-nitrofenol 4. Benzaldehid, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolit için farklı ACN/Tampon oranları ile alınan alkilbenzen karışımına ait elektrokromatogramlar Şekil 4.34'de verilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri ise Çizelge 4.13'te sunulmaktadır. Gerek şekil 4.34, gerekse Çizelge 4.13'ten görüldüğü gibi, TFEM-co-PA monolit kullanılarak düşük ACN/Tampon oranı değerlerinde (özellikle 60/40) daha iyi bir kromatografik ayırım elde edilmektedir. Bu davranış mevcut akrilik bazlı monolitlere göre, TFEM-co-PA monolitin bölüm 4.2'de anlatılan TFEM monolitlerde olduğu gibi önemli bir avantajını oluşturmaktadır.



**Şekil 4.35.** TFEM-co-PA-EDM monolitte alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Enjeksiyon koşulları: 5 kV, 3 s, Uygulanan voltaj: 20 kV, DAD dedektör, 200 nm, Etkin kolon uzunluğu: 20 cm, Kolon çapı: 100 µm

TFEM-co-PA monolit ile farklı ACN/Tampon oranları ile elde edilen kromatogramlar yardımıyla hesaplanan alıkonma faktörlerinin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.35’de verilmektedir. Bu grafik düşük ACN/Tampon oranları ile kromatografik ayırımın daha başarılı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.36.** TFEM-co-PA-EDM monolitte teorik tabaka sayısının ve teorik tabaka yüksekliğinin akış hızıyla değişimi. Analit: tiyoüre.

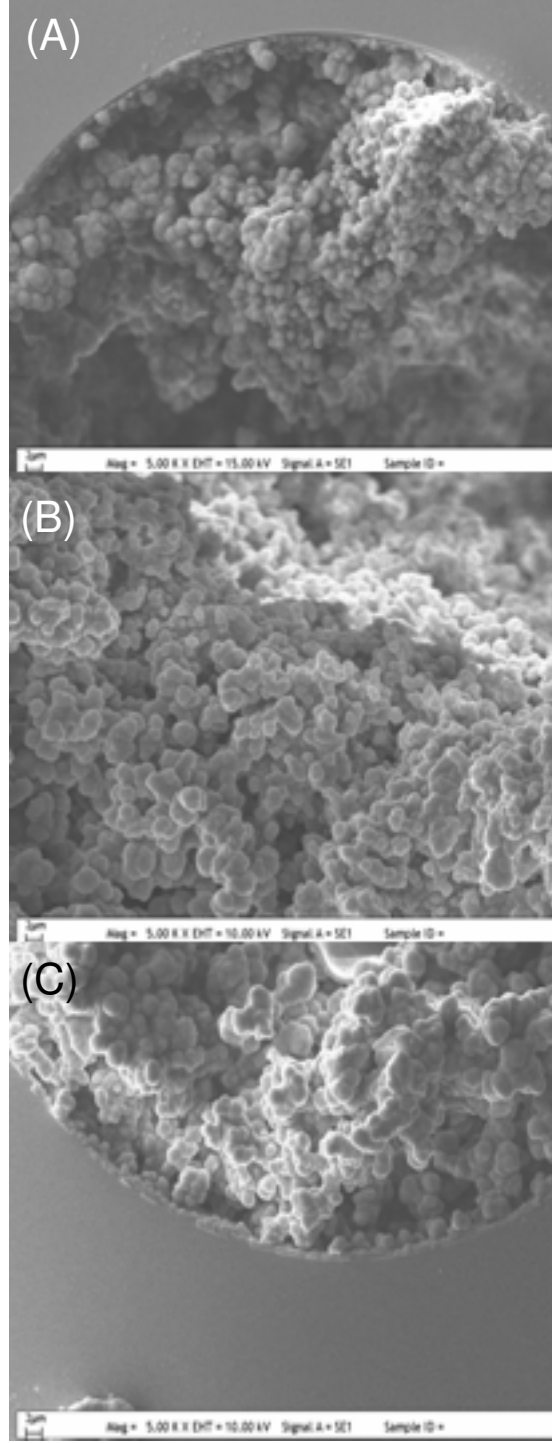
TFEM-co-PA monolit için teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliği değerleri bölüm 4.2’de anlatılan % 83 IAA derişimi ile sentezlenen TFEM monolit ile aşağı yukarı aynı miktardadır (Şekil 4.36). Bu kolon duvar modifikasyon işleminin kolonun verimi açısından zararlı olmadığını göstermektedir. Diğer açıdan bu değerler literatürdeki diğer tür monolitik kolonlarla yarışabilir niteliktedir. Böylece hem kolon duvar modifikasyonunun hem de PA ile TFEM’in kopolimerleştirilmesinin uygun olduğu gösterilmiştir.

### 4.3. (Polietilen glikol)fenileter akrilat Bazlı Monolitler

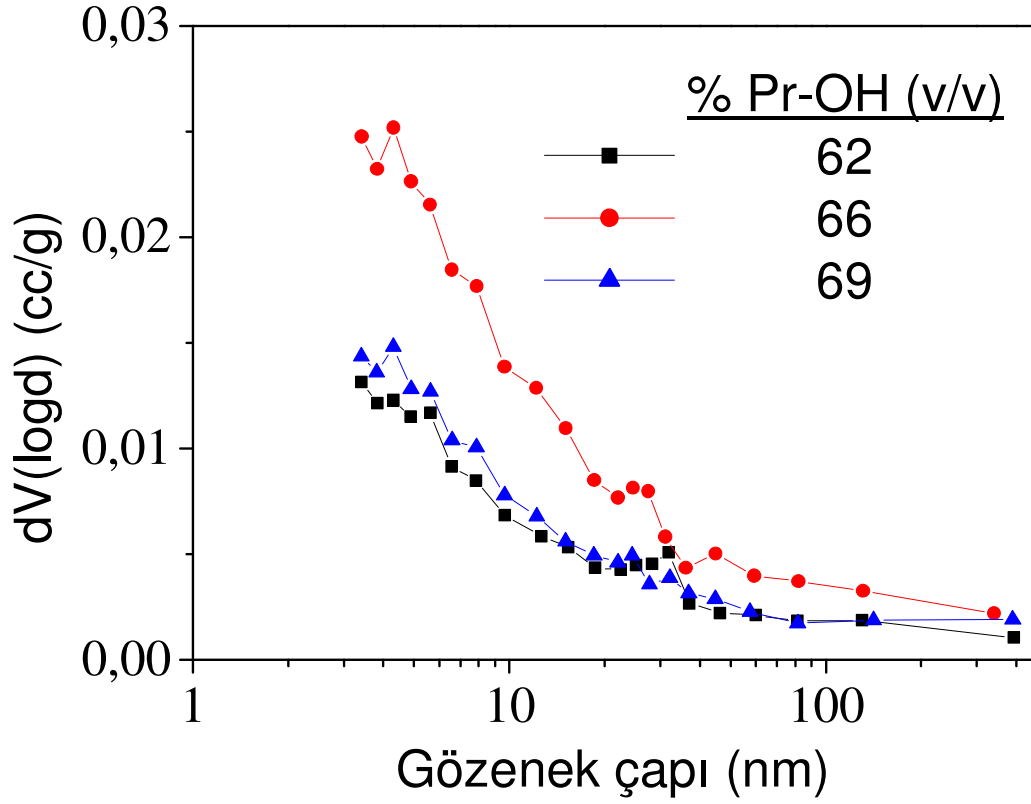
Bu bölümdeki deneylerde, ilk kez polietilen glikol (PEG) bazlı bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Polietilen glikol zincirinin varlığı, monolit polaritesinde bir artış meydana getirmektedir. Böylece polar formdaki monolitlerin sentezi ve kromatografik performanslarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Pr-OH derişimi ve AMPS derişimi olmak üzere iki ayrı değişkenin değiştirilmesi ile PEGPEA monolit sentezleri gerçekleştirilmiştir. BMA bazlı monolitler için literatürde tanımlanmış bir gözenek yapıcı sistemi olan Pr-OH/BD sisteminde Pr-OH derişimi ancak % 58-62 (v/v) aralığında değiştirildiği durumda CEC için kullanıma uygun gözeneklilik ve mobil faz geçirgenliğine sahip monolitler elde edilebilmektedir. Bu özellik göz önüne alınarak, PEGPEA bazlı monolitlerde nispeten daha geniş bir aralık % 62-69 v/v kullanılmıştır. İkinci grubu oluşturan üçlü deney setinde ise, monolitin negatif yüklü gruplarını içeren bileşen olan AMPS derişimi ağırlıkça % 0.3 ile % 0.9 aralığında değiştirilmiştir. Monolit sentezinde AMPS derişiminin % 1'in üzerine çıkarılması ile elde edilen monolitlerin ayırma gücünde önemli azalmanın olduğu literatürde gösterilmiştir. Bu nedenle % 1'in üzerindeki derişim değerleri denenmemiştir.

#### 4.3.1. Poli(PEGPEA-co-EDM) monolitlerin karakterizasyonu



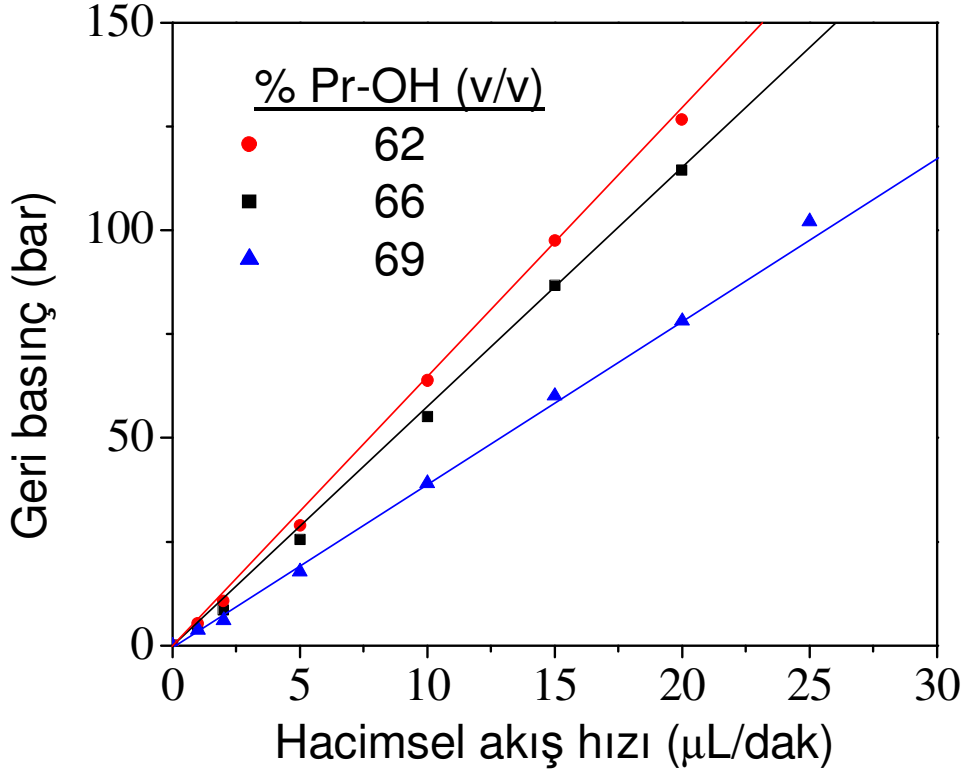
**Şekil 4.37.** Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: 5000X, Pr-OH oranları (% v/v): (A) 62, (B) 66, (C) 69.



**Şekil 4.38.** Farklı Pr-OH derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.

**Çizelge 4.14.** Farklı Pr-OH derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.

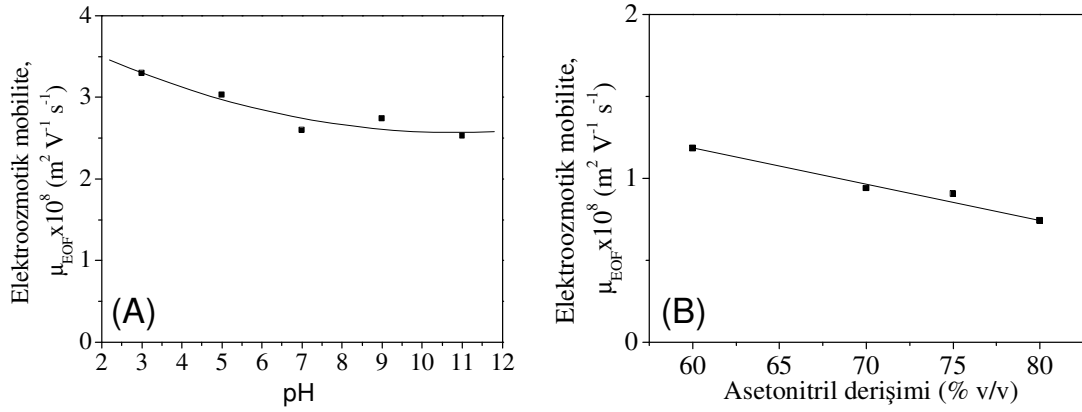
| PR-OH % (v/v) | Özgül yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) | Gözenek çapı (nm) |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| 62            | 4.72                                  | 7.07              |
| 66            | 5.32                                  | 6.83              |
| 69            | 9.27                                  | 3.41              |



**Şekil 4.39.** Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.

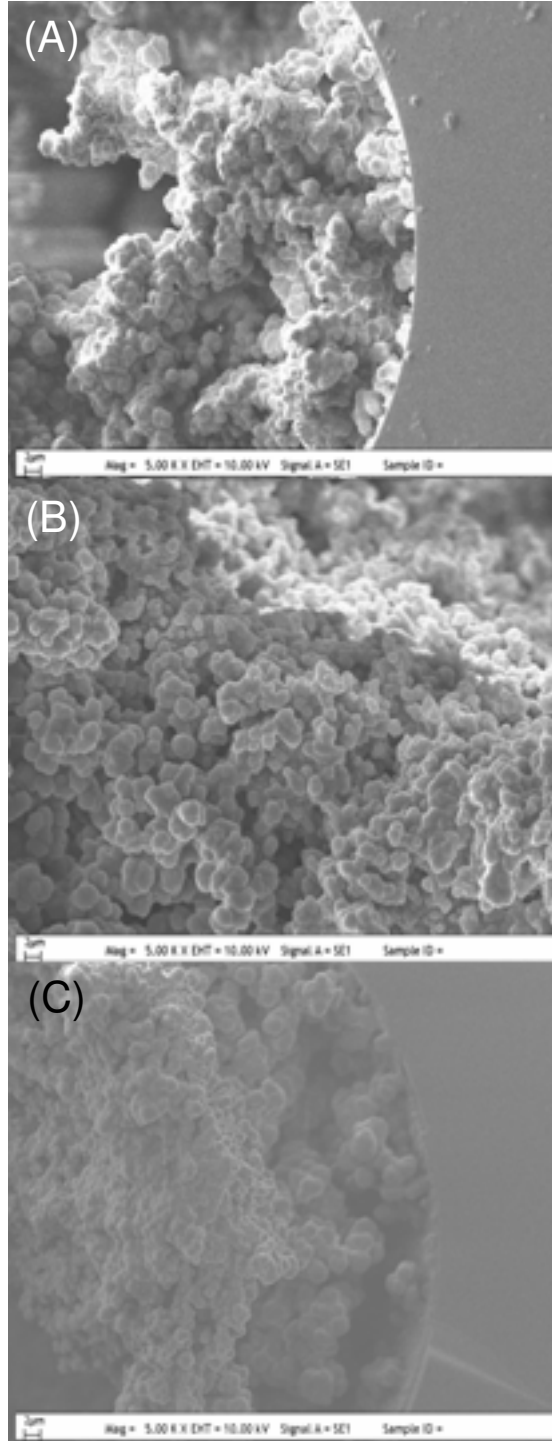
Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen monolitlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.37’de verilmektedir. Genelde hidrofobik formda alkil metakrilatlar ile yapılan monolit sentezlerinde Pr-OH derişiminin artışı ile monolitlerin agregat boyutu önemli ölçüde küçülmektedir. Ancak PEGPEA gibi hidrofilik bir monomer varlığında ise tam ters yönde bir etki oluşmakta ve artan Pr-OH derişimi ile agregat boyutunda ve buna bağlı olarak, mikro-gözenek hacminde azalma krater formunda makro-gözenek boyutunda belirgin bir artış meydana gelmektedir (Şekil 4.38, Çizelge 4.14).

Basınç eğrilerinden (Şekil 4.39) görüldüğü üzere, daha düşük agregat boyutuna sahip olan monolitte, sabit akış hızında daha yüksek geri-basınç değeri gözlenmektedir. Makro-gözenekliliği daha düşük olan ve daha sıkı bir yapıya sahip olması gereken bir monolitik yapı için bu davranış doğaldır.

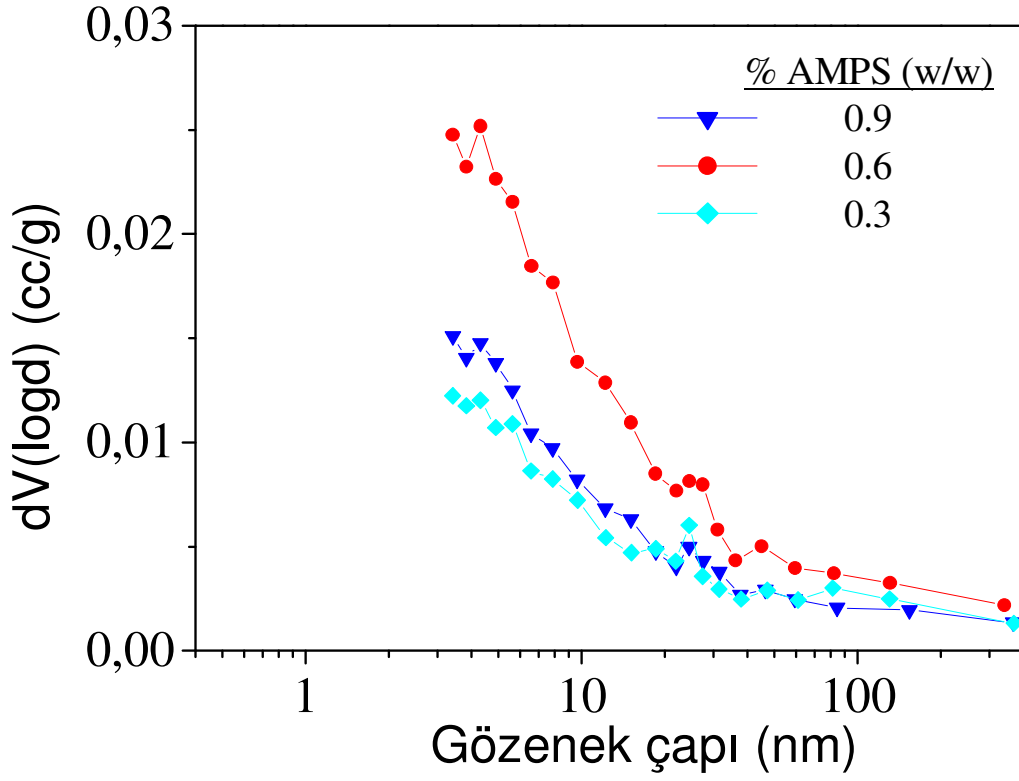


**Şekil 4.40.** % 69 (v/v) Pr-OH derişimine sahip PEGPEA monolitinin (A) pH, (B) Asetonitril derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.

Şekil 4.40'ta görüldüğü gibi elektroozmotik mobilite pH ile kayda değer bir değişim göstermemektedir. Bu durum PEGPEA bazlı monolitlerin geniş bir pH aralığında kullanılabileceğini göstermektedir. Artan ACN derişimi ile elektroozmotik mobilite değerinin azalması doğaldır. Çünkü ACN derişiminin artışı ile monolitik yapıdaki yüklü grupların iyonizasyon yeteneği ve buna bağlı olarak monolitik yapının Zeta Potansiyeli azalmakta ve kendisiyle doğru orantılı olan elektroozmotik mobilitenin azalmasını gerektirmektedir.



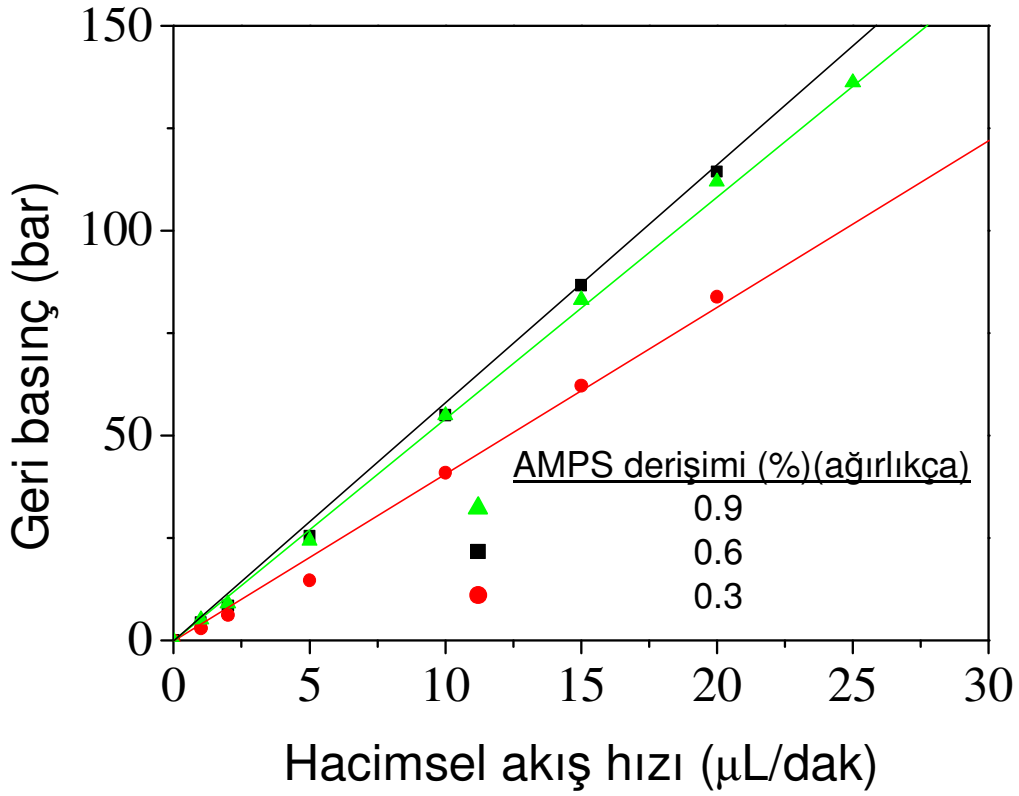
**Şekil 4.41.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitik yapıların örnek SEM fotoğrafları, Büyütme: 5000X, AMPS oranları (% w/w): (A) 0.3, (B) 0.6, (C) 0.9.



**Şekil 4.42.** Farklı AMPS derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin gözeneklilik özelliklerinin gösteren BET grafikleri.

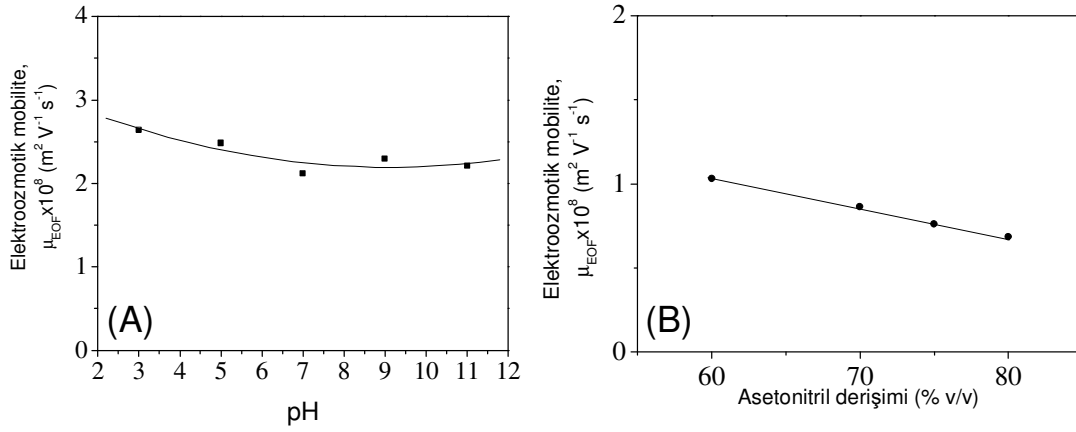
**Çizelge 4.15.** AMPS derişimleri ile hazırlanan PEGPEA monolitlerin özgül yüzey alanı ve gözenek çapı değerleri.

| AMPS % (w/w) | Özgül yüzey alanı (m <sup>2</sup> /g) | Gözenek çapı (nm) |
|--------------|---------------------------------------|-------------------|
| 0.3          | 4.54                                  | 7.10              |
| 0.6          | 5.32                                  | 6.83              |
| 0.9          | 5.43                                  | 6.30              |



**Şekil 4.43.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitlerin geri-basınç akış hızı eğrileri. Mobil faz: saf etanol.

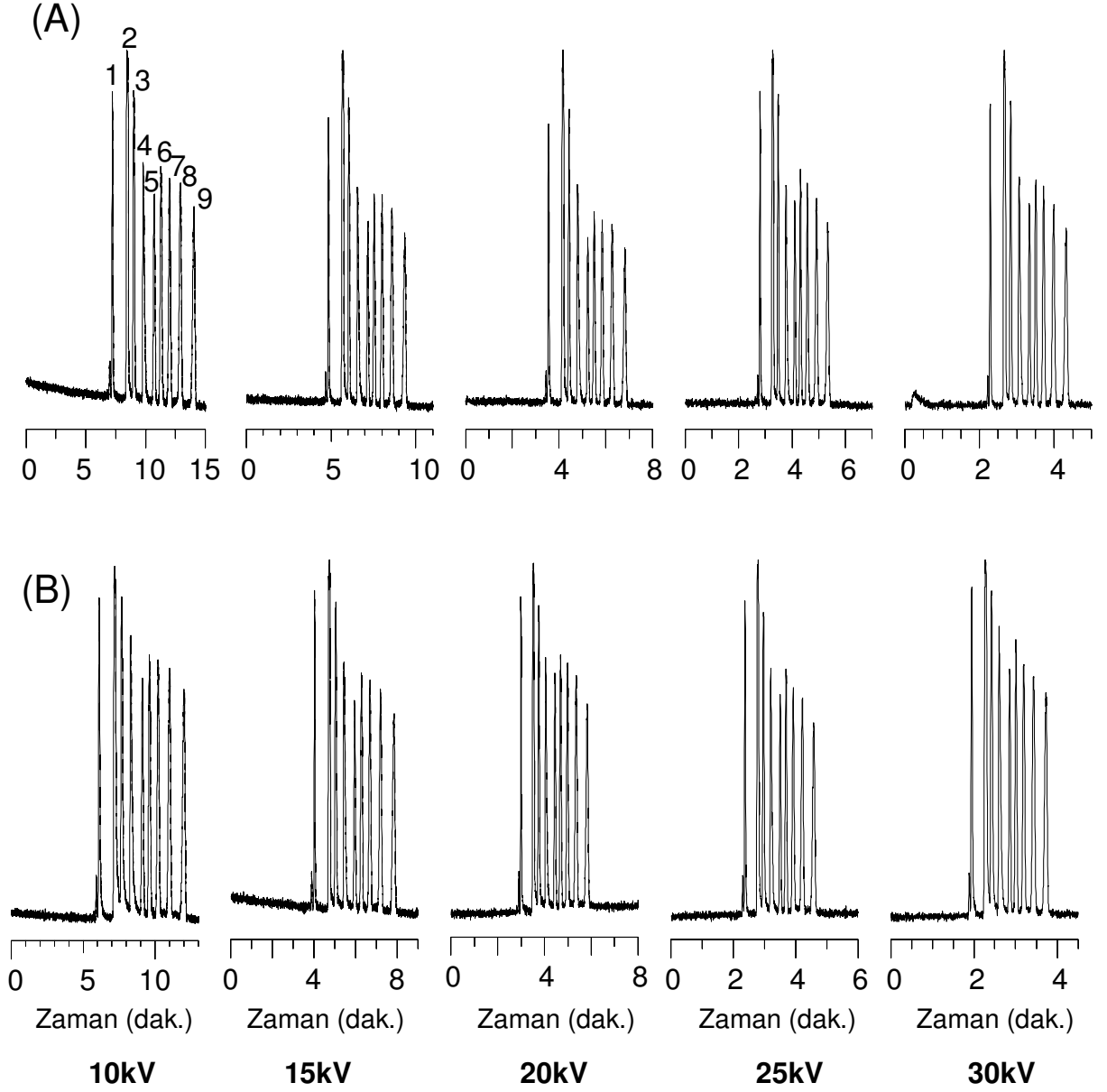
Farklı AMPS derişimleri ile elde edilen monolitlerin SEM fotoğrafları ise Şekil 4.41'de verilmektedir. Şekil 4.41'de yer alan fotoğraflardan, AMPS derişiminin değişimi ile agregat ve makro-gözenek boyutunda bariz bir değişim algılanmamaktadır. Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen monolitlerin BET eğrileri, yüzey alanı değerleri ve geri-basınç akış hızı ilişkileri ise sırasıyla Şekil 4.42, Çizelge 4.15 ve Şekil 4.43'te verilmektedir. Buradan görüldüğü üzere, daha düşük AMPS derişimi ile elde edilen monolitte, sabit akış hızı için daha düşük geri basınç değerleri elde edilmiştir. Bu durum, düşük AMPS derişimi ile elde edilen monolitte, makro-gözenek yoğunluğunun daha yüksek olduğuna işaret etmektedir.



**Şekil 4.44.** % 0.3 (w/w) AMPS derişimine sahip PEGPEA monolitin (A) pH, (B) Asetonitril derişimine karşı elektroozmotik mobilite değerleri.

Şekil 4.44'te görüldüğü gibi elektroozmotik mobilite pH ile kayda değer bir değişim göstermemektedir. Bu durum PEGPEA bazlı monolitlerin geniş bir pH aralığında kullanılabileceğini göstermektedir. Artan ACN derişimi ile elektroozmotik mobilite değerinin azalması doğaldır. Çünkü ACN derişiminin artışı ile monolitik yapıdaki yüklü grupların iyonizasyon yeteneği ve buna bağlı olarak monolitik yapının zeta potansiyeli azalmakta ve kendisiyle doğru orantılı olan elektroozmotik mobilitenin azalmasını gerektirmektedir.

#### 4.3.2. Poli(PEGPEA-co-EDM) monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi



**Şekil 4.45.** Farklı Pr-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlar: Pr-OH derişimleri: (A) 62, (B) 69, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.16.** Farklı PR-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.

| % Pr-OH | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 62      | 5.71   | 2.32   | 3.36   | 3.56   | 2.22   | 2.48   | 3.08   | 3.70   |
| 66      | 4.73   | 1.57   | 1.87   | 3.03   | 1.72   | 2.24   | 3.03   | 3.03   |
| 69      | 5.72   | 2.36   | 3.00   | 3.85   | 2.21   | 2.73   | 3.14   | 3.39   |

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Uygulanan voltaj: 15 kV, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluene, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Pr-OH %: 66

| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 5.14   | 1.84   | 2.00   | 3.09   | 1.96   | 2.27   | 3.05   | 3.43   |
| 15          | 4.73   | 1.57   | 1.87   | 3.03   | 1.72   | 2.24   | 3.03   | 3.03   |
| 20          | 3.60   | 1.47   | 1.69   | 2.94   | 1.69   | 2.13   | 2.52   | 2.72   |
| 25          | 3.07   | 1.33   | 1.53   | 2.66   | 1.71   | 1.79   | 2.41   | 2.52   |
| 30          | 3.00   | 1.11   | 1.55   | 2.49   | 1.59   | 1.77   | 2.32   | 2.52   |

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluene, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

---

Pr-OH %: 69

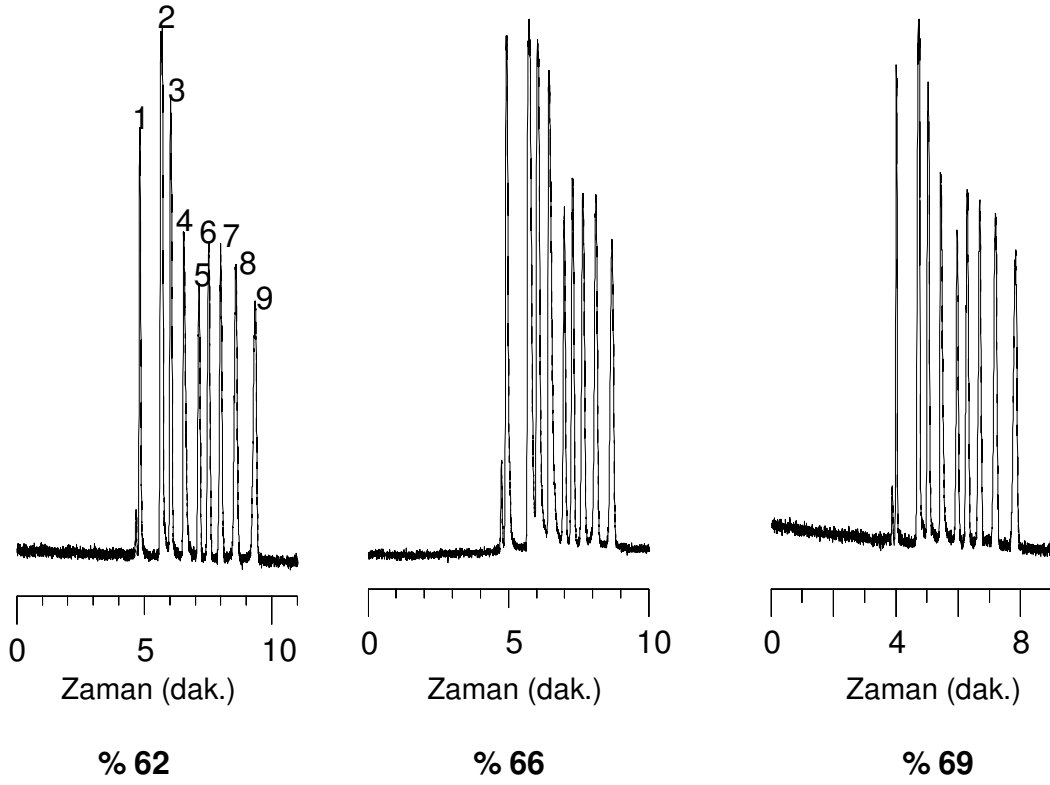
---

| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 6.38   | 2.38   | 3.52   | 4.22   | 2.32   | 2.77   | 3.45   | 3.73   |
| 15          | 5.72   | 2.36   | 3.00   | 3.85   | 2.21   | 2.73   | 3.14   | 3.39   |
| 20          | 5.67   | 2.22   | 2.81   | 3.42   | 1.86   | 2.23   | 2.55   | 2.85   |
| 25          | 5.47   | 2.21   | 2.80   | 3.31   | 1.84   | 2.15   | 2.53   | 2.85   |
| 30          | 4.91   | 2.07   | 2.61   | 3.27   | 1.76   | 2.11   | 2.51   | 2.78   |

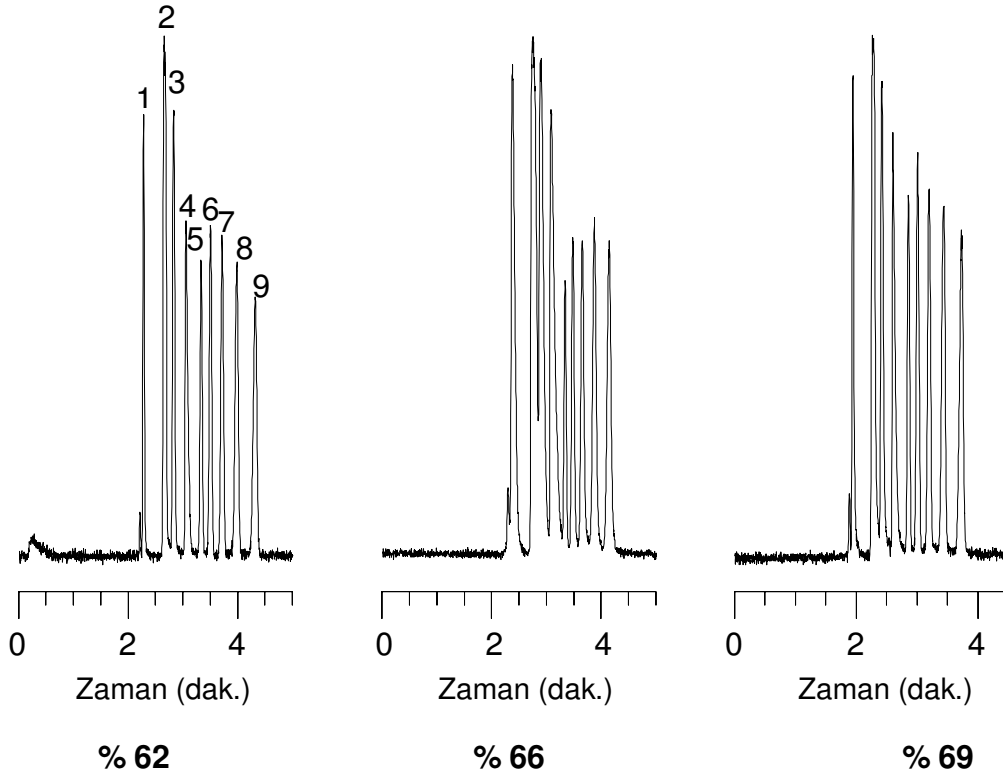
---

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Farklı Pr-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlar Şekil 4.45'te verilmektedir. Burada örneklendiği gibi tiyüre, benzen ve fenol türevlerini içeren 9 bileşenli analit karışımının kromatografik ayrımı bütün Pr-OH derişimleri ile üretilen monolitler ile başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu ayrımın 10-30 kV aralığında bütün voltaj değerlerinde yapılabilmesi önemli bir üstünlüktür. Farklı Pr-OH derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.16'te verilmektedir. Görüldüğü gibi farklı Pr-OH derişimleri ile üretilen monolitler için elde edilen pik çözünürlük değerleri arasında önemli bir farklılık mevcut değildir. Bütün çözünürlük değerleri, başarılı bir kromatografik ayrım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin üzerindedir.

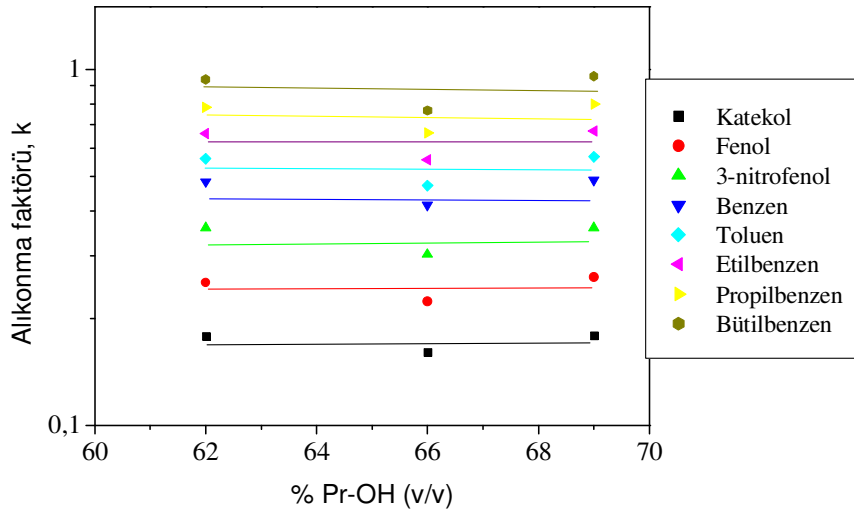


**Şekil 4.46.** Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile düşük voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan Voltaj: 15 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100  $\mu$ m, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Büttilbenzen.

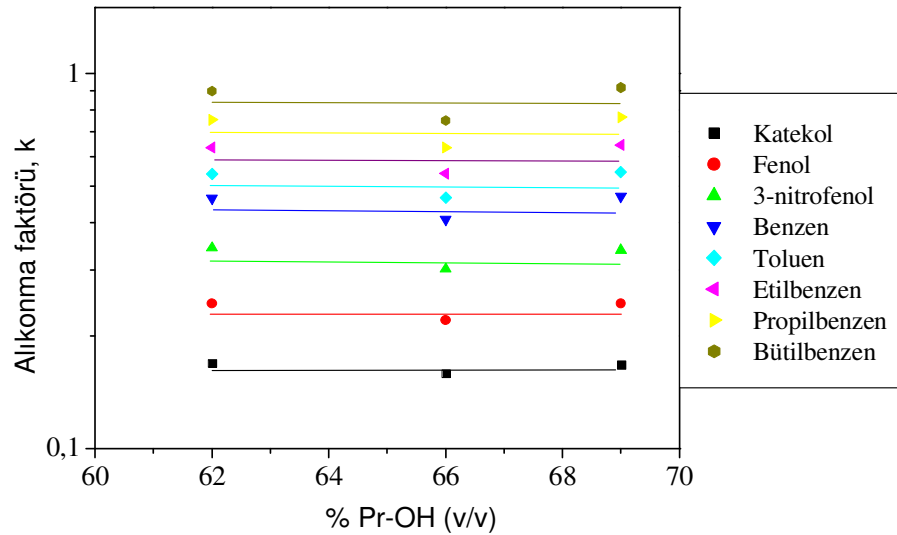


**Şekil 4.47.** Farklı Pr-OH derişimler ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile yüksek voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan Voltaj: 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Sabit kromatografik koşullarda, farklı Pr-OH derişimleri ile elde edilen monolitlerin davranışı ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de verilmektedir. Bu karşılaştırmalar düşük ve yüksek voltaj değerleri olarak kabul edilebilecek 15 ve 30 kV değerlerinde yapılmaktadır. Buradan da görüldüğü gibi çalışılan aralıkta Pr-OH derişimlerinin değiştirilmesi ile pik çözünürlüğünde önemli bir değişim meydana gelmemektedir. Ancak artan Pr-OH derişimi ile kromatografik ayırımın daha hızlı olarak gerçekleştiği, bir başka deyimle toplam analiz süresinin kısaldığı görülmektedir.



(A)

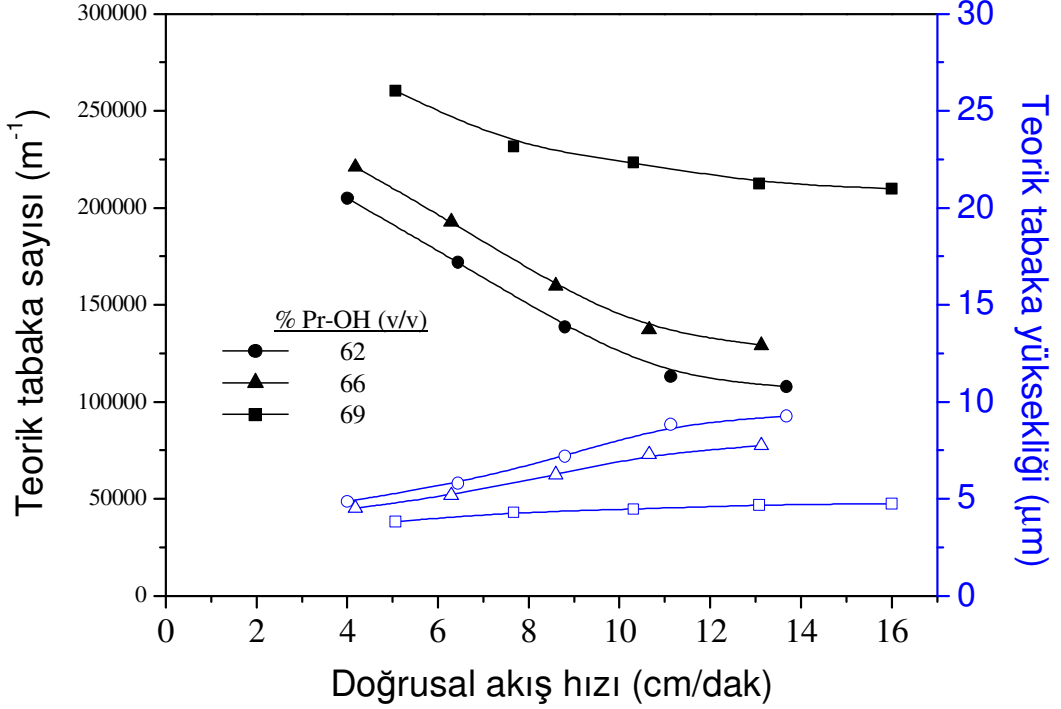


(B)

**Şekil 4.48.** PEGPEA monolitler için alıkonma faktörünün Pr-OH derişimi ile değişimi. Uygulanan voltaj: (A) 15 kV, (B) 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100  $\mu$ m, Enjeksiyon: 5  $\mu$ l, 3s, DAD dedektör, 200 nm.

PEGPEA monolitler için alıkonma faktörünün Pr-OH derişimi ile değişimi ise Şekil 48'de verilmektedir. Buradan, çalışılan aralıkta Pr-OH derişiminin gerek düşük, gerekse yüksek voltaj değerleri ile elde edilen alıkonma faktörleri üzerinde çok etkili olmadığı söylenebilir. Elde edilen ayırma faktörlerinin seçilen her Pr-OH

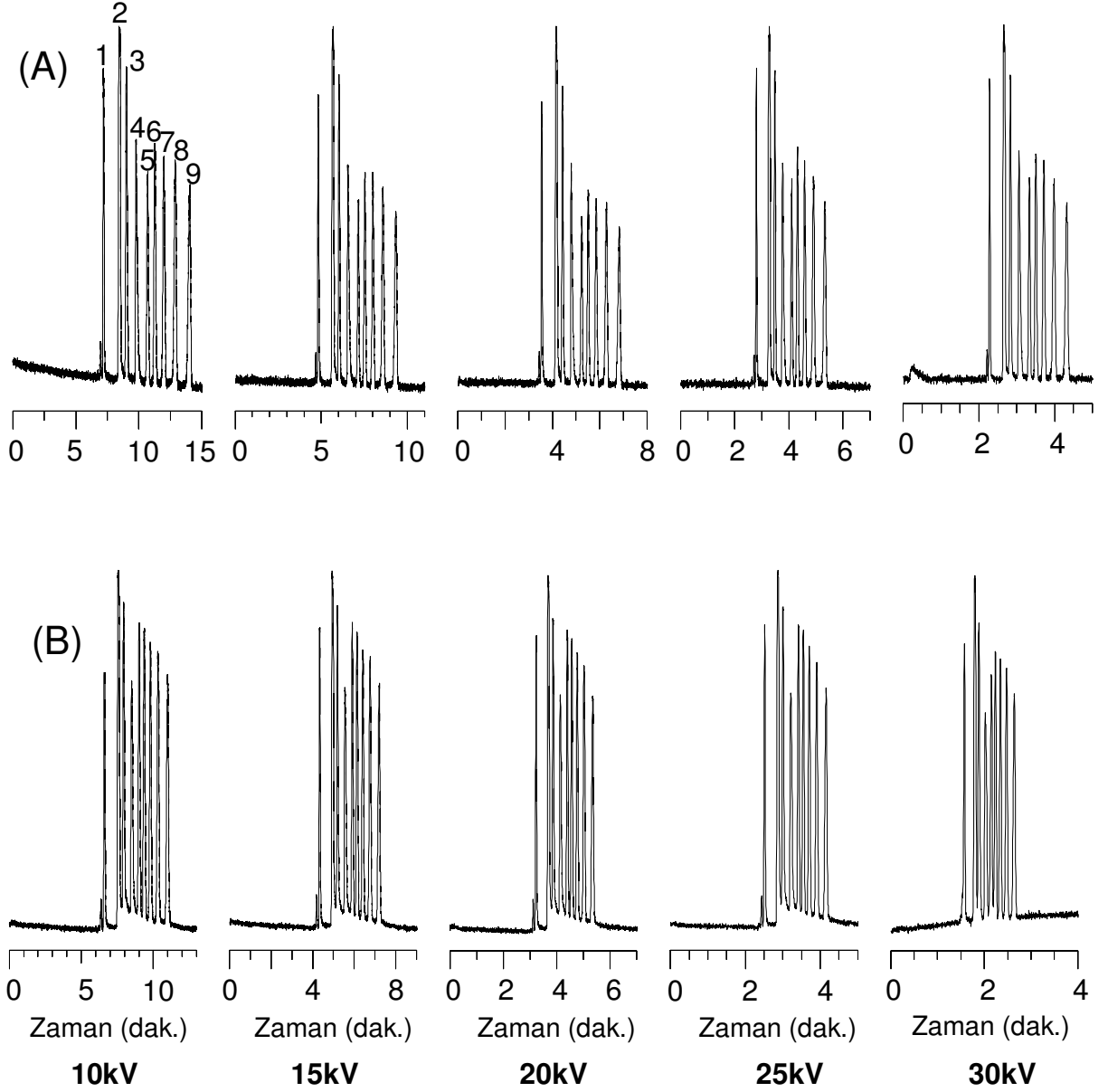
derişimi ile ayırma yeteneğine sahip PEGPEA bazlı monolit sentezinin yapılabildiğini göstermektedir.



**Şekil 4.49.** Farklı Pr-OH derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler için teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliğinin mobil faz akış hızı ile değişimi. Analit: Tiyüre, Uygulanan voltaj aralığı: 10-30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, DAD dedektör, 200 nm.

Şekil 4.49'dan görüldüğü üzere yüksek Pr-OH derişimi ile sentezlenen monolitlerde daha yüksek ayırma verimine karşılık gelen yüksek teorik tabaka sayısı ve düşük tabaka yüksekliği değerleri elde edilmektedir. Bu durum, Pr-OH derişiminin artması üzere yapıda makro-gözenek sıklığının artması ve böylece konvektif taşınımın önemli hale gelmesi ile açıklanabilir. Konvektif taşınım varlığında kolon içerisinde daha iyi bir kütle transferinin sağlanması, ayırma veriminde artışı sağlamaktadır. Bu arada dikkati çeken önemli bir özellik, en yüksek Pr-OH derişimi ile teorik tabaka sayısı 265.000 m<sup>-1</sup> olan monolitlerin elde edilmiş olmasıdır. Bu değer, alkil metakrilat bazlı bilinen monolitlerin ayırma verimlerinin üzerindedir. PEGPEA gibi, klasik alkil metakrilat bazlı monomerlere

kıyasla daha hidrofilik bir yapının seçilmesi, alkilbenzen türü analitlerin kolondan daha hızlı geçişini sağlamakta, bu durum ise ayırma veriminin artışı sağlamaktadır.



**Şekil 4.50.** Farklı AMPS derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan kromatogramlar: Monolit türü: (A) 0.3, (B) 0.9, ACN/fosfat tamponu oranı: 75/25, pH 7, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.17.** Farklı AMPS derişimleri ile üretilen PEGPEA monolitler için farklı voltaj değerlerinde alınan elektrokromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.

| % AMPS | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0.3    | 5.71   | 2.18   | 2.91   | 3.85   | 2.40   | 2.66   | 3.02   | 3.32   |
| 0.6    | 4.73   | 1.57   | 1.87   | 3.03   | 1.72   | 2.24   | 3.03   | 3.03   |
| 0.9    | 4.84   | 1.92   | 2.92   | 2.51   | 2.00   | 2.58   | 2.47   | 2.93   |

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Uygulanan voltaj: 15 kV, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

AMPS %: 0.6

| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 5.14   | 1.84   | 2.00   | 3.09   | 1.96   | 2.27   | 3.05   | 3.43   |
| 15          | 4.73   | 1.57   | 1.87   | 3.03   | 1.72   | 2.24   | 3.03   | 3.03   |
| 20          | 3.60   | 1.47   | 1.69   | 2.94   | 1.69   | 2.13   | 2.52   | 2.72   |
| 25          | 3.07   | 1.33   | 1.53   | 2.66   | 1.71   | 1.79   | 2.41   | 2.52   |
| 30          | 3.00   | 1.11   | 1.55   | 2.49   | 1.59   | 1.77   | 2.32   | 2.52   |

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyöüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

---

AMPS %: 0.9

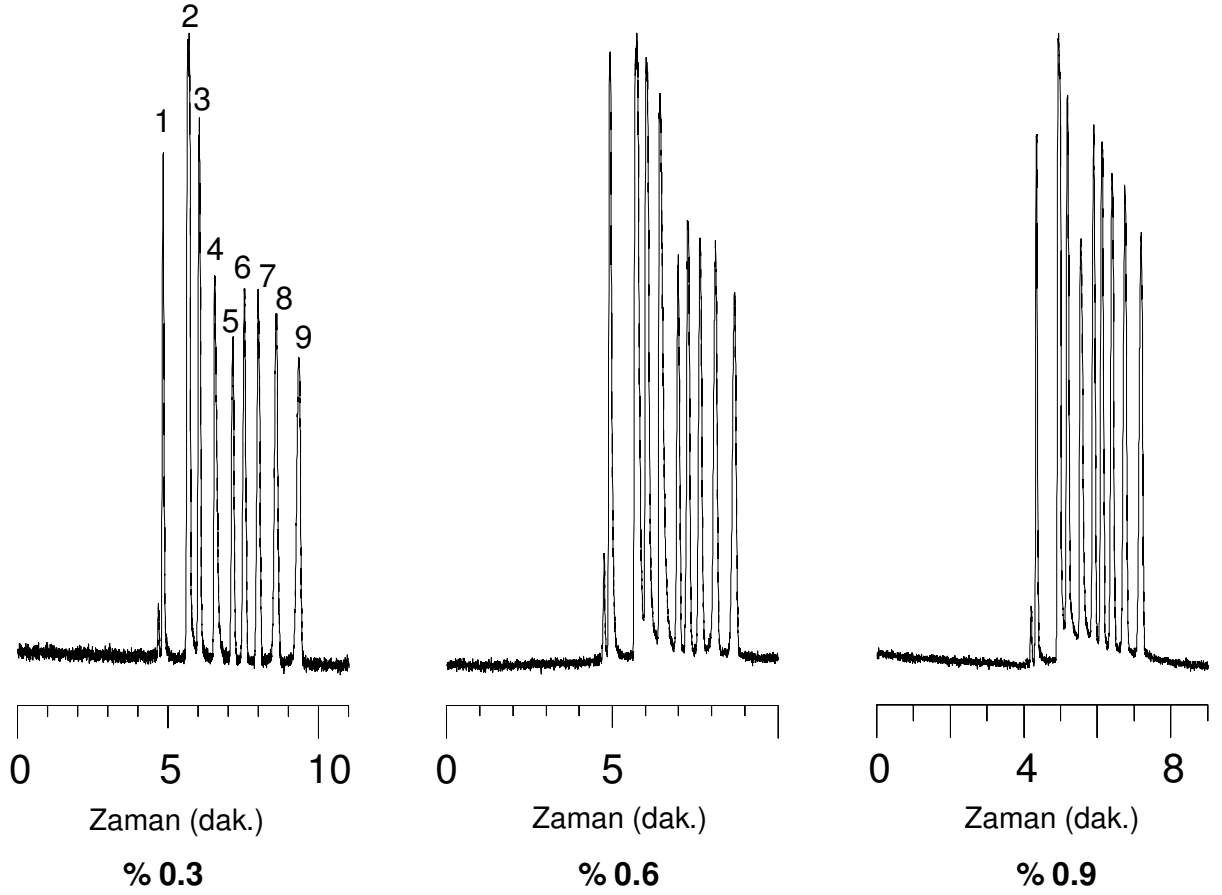
---

| Voltaj (kV) | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10          | 5.32   | 2.00   | 3.28   | 2.55   | 2.09   | 2.58   | 2.58   | 3.17   |
| 15          | 4.84   | 1.92   | 2.92   | 2.51   | 2.00   | 2.58   | 2.47   | 2.93   |
| 20          | 4.68   | 1.80   | 2.80   | 2.44   | 1.91   | 2.27   | 2.47   | 2.70   |
| 25          | 3.91   | 1.52   | 2.38   | 2.18   | 1.74   | 2.23   | 2.18   | 2.57   |
| 30          | 4.12   | 1.56   | 2.40   | 2.11   | 1.64   | 2.18   | 2.04   | 2.51   |

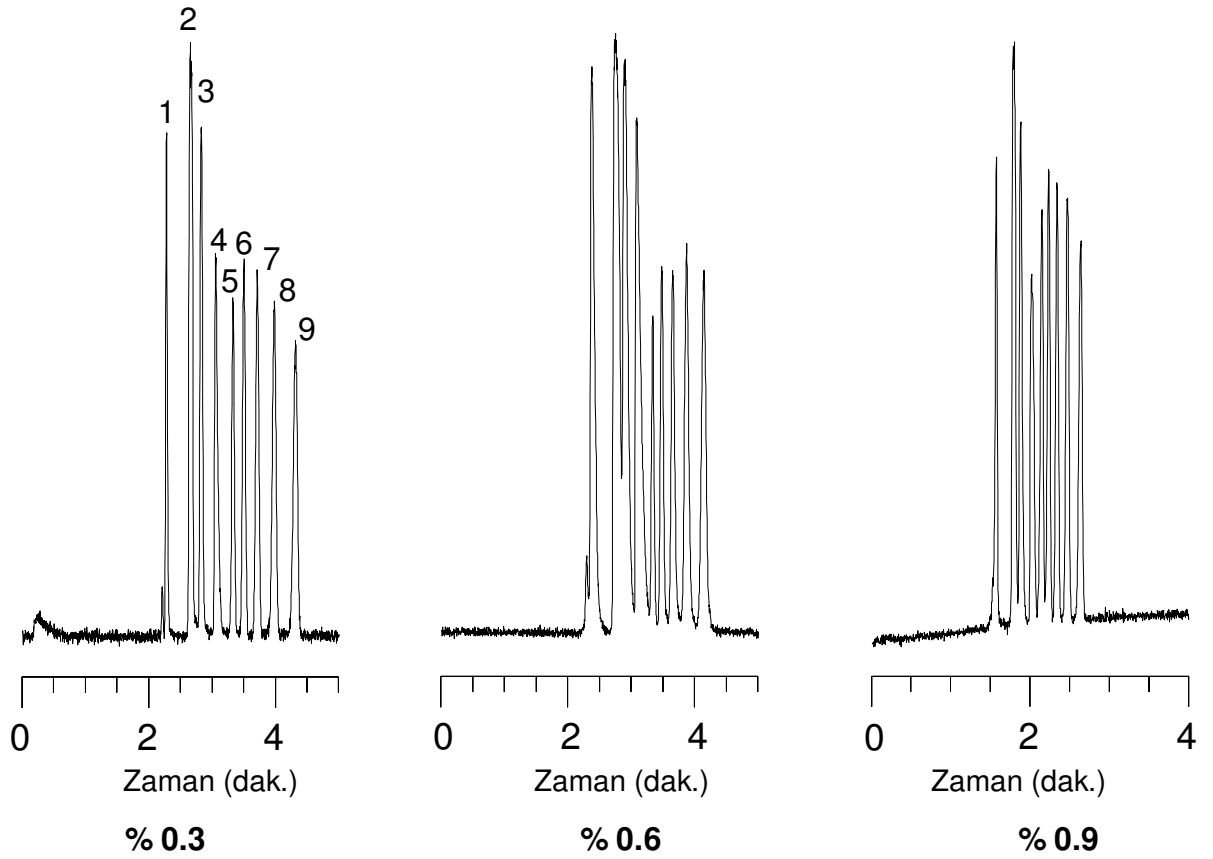
---

ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu: 75/25, Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

Farklı AMPS derişimleri ile elde edilen PEGPEA monolitler ile 10-30 kV aralığında voltaj değerleri kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar Şekil 4.50'de örneklenmektedir. Burada gözlenen davranış AMPS derişiminin % 0.9 değerine yükseltilmesi ile sentezlenen monolitlerin diğer monolitlere kıyasla düşük ayırma gücüne sahip olduğudur. Farklı AMPS derişimleri ile elde edilen PEGPEA monolitler ile 10-30 kV aralığında voltaj değerleri kullanılarak elde edilen elektrokromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.17'de verilmektedir.

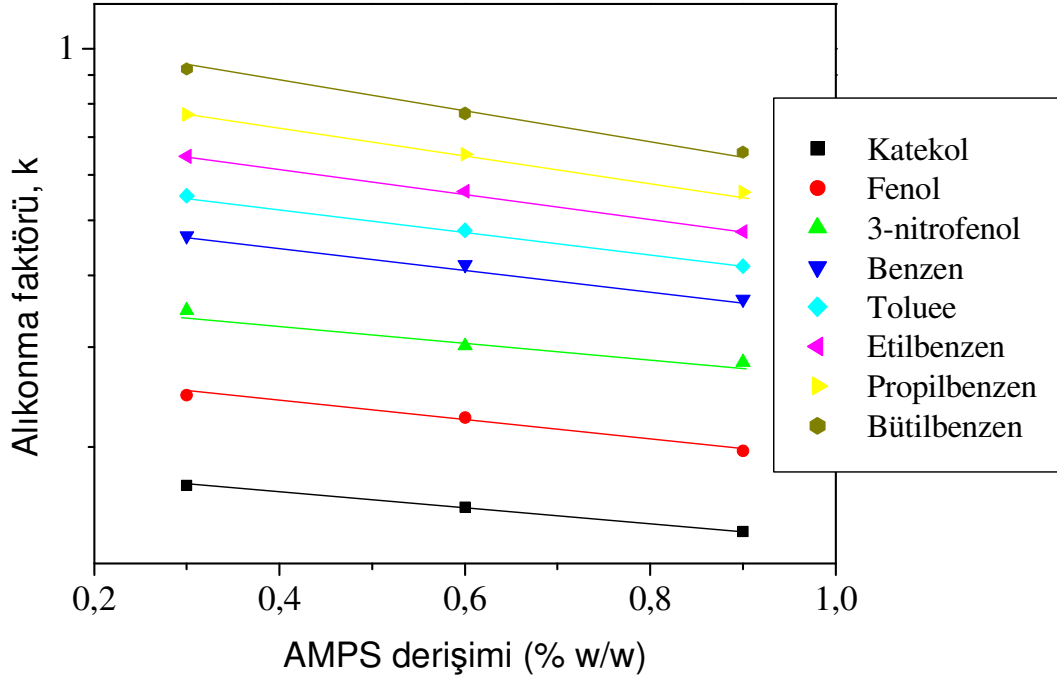


**Şekil 4.51.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile düşük voltaj değeriinde alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 15 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.



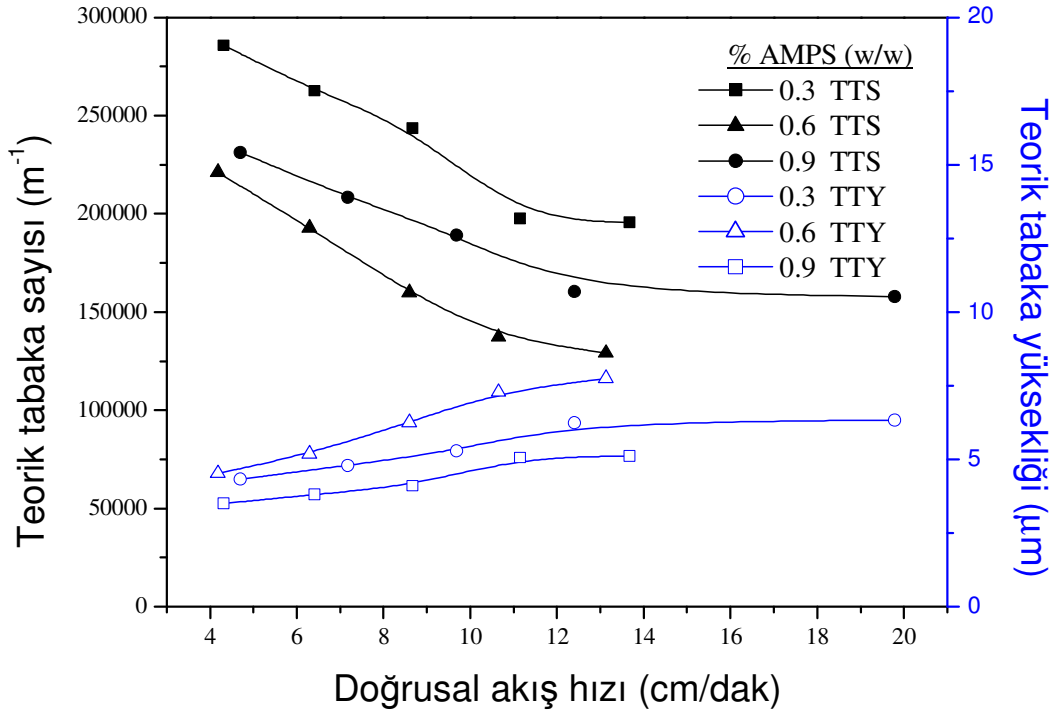
**Şekil 4.52.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler ile yüksek voltaj değerinde alınan elektrokromatogramlar. Uygulanan voltaj: 30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100  $\mu$ m, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütılbenzen.

Sabit kromatografik koşullar için, AMPS derişiminin monolitın kromatografik davranışına etkisi ise Şekil 4.51 ve 4.52'de verilmektedir. Buradan artan AMPS derişimi ile ayırma gücünde oluşan azalma gerek düşük, gerekse yüksek voltaj değerlerinde, net olarak görülebilmektedir.



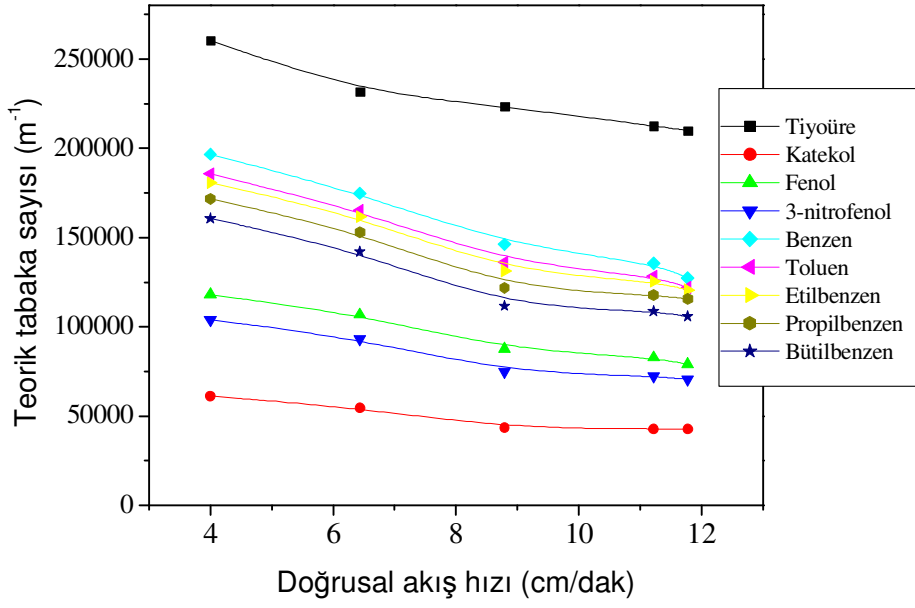
**Şekil 4.53.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA bazlı monolitler için alıkonma faktörünün AMPS derişimi ile değişimi. ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon apı: 100  $\mu$ m, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Uygulanan voltaj: 20 kV.

Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA bazlı monolitler için alıkonma faktörünün AMPS derişimi ile değişimi ise Şekil 4.53'te verilmektedir. Bu grafikten artan AMPS derişiminin alıkonma faktöründe hafif bir azalmaya neden olduğu görölmektedir. Artan AMPS derişimi ile monolitın yüklü grup içeriğinin artması, buna bağlı olarak elektroozmotik mobilite değerinin yükselmesi gerekir. Elektroozmotik akış değerinin yükselmesi anlamına gelen bu etki analitlerin kolonu daha hızlı geçmesini sağlamakta ve bu durum alıkonma faktörünün azalmasına neden olmaktadır.

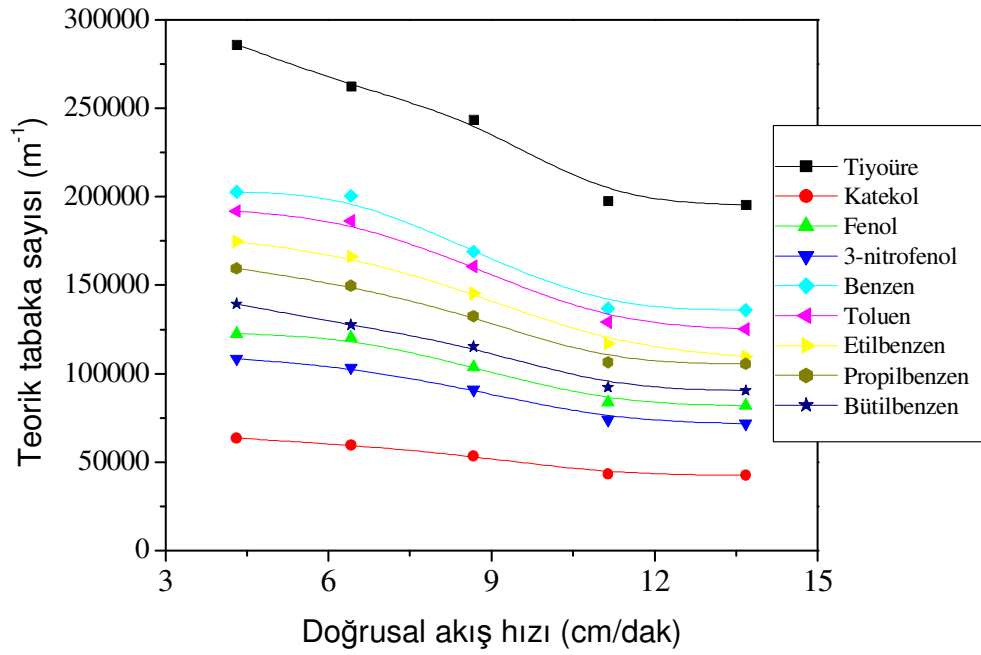


**Şekil 4.54.** Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen PEGPEA monolitler için teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliğinin mobil faz akış hızı ile değişimi. Uygulanan voltaj aralığı: 10-30 kV, ACN/5 mM pH 7 fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm.

Farklı AMPS derişimleri ile sentezlenen monolitler için teorik tabaka sayısı ve tabaka yüksekliğinin mobil faz akış hızı ile değişimi ise Şekil 4.54'te verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi AMPS derişiminin artmasıyla teorik tabaka sayısı değeri azalmaktadır. Burada belirtilmesi gereken önemli nokta, en düşük AMPS derişimi ile sentezlenen PEGPEA monolit için teorik tabaka sayısının  $280.000 \text{ m}^{-1}$  değerinin üzerinde olmasıdır. Bu değer son yıllarda kapiler monolitik kolonlar için rapor edilmiş en yüksek ayırma verimi değerlerinden biridir.



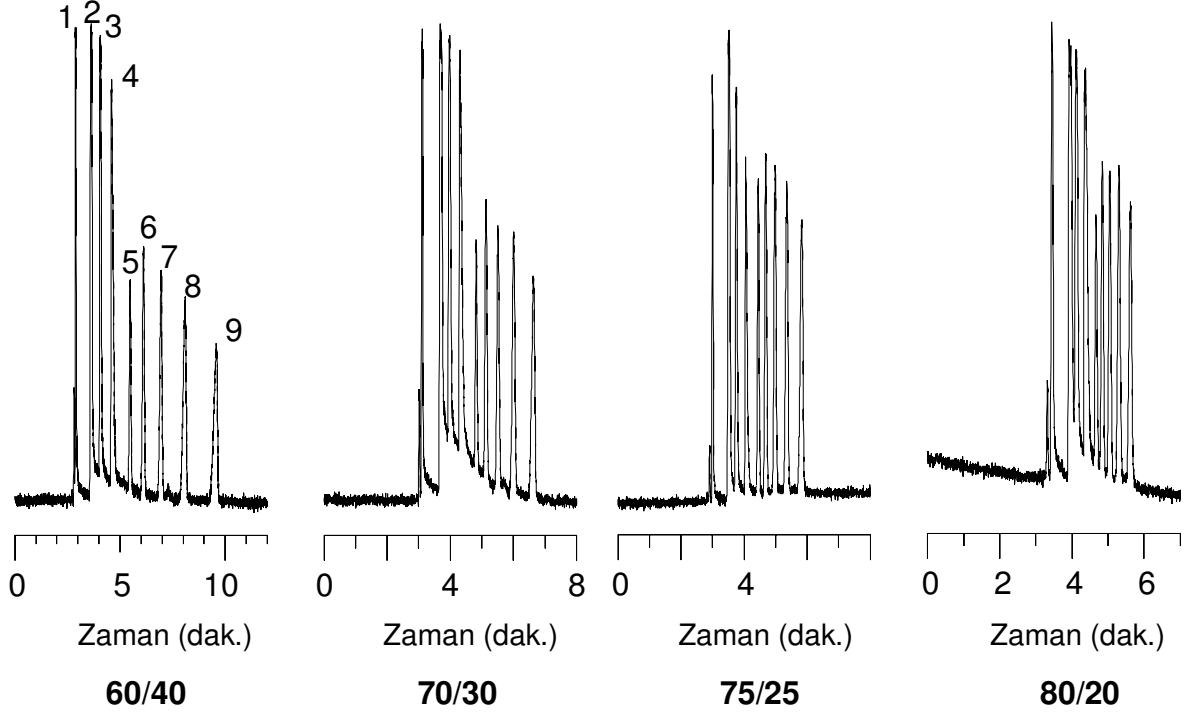
(A)



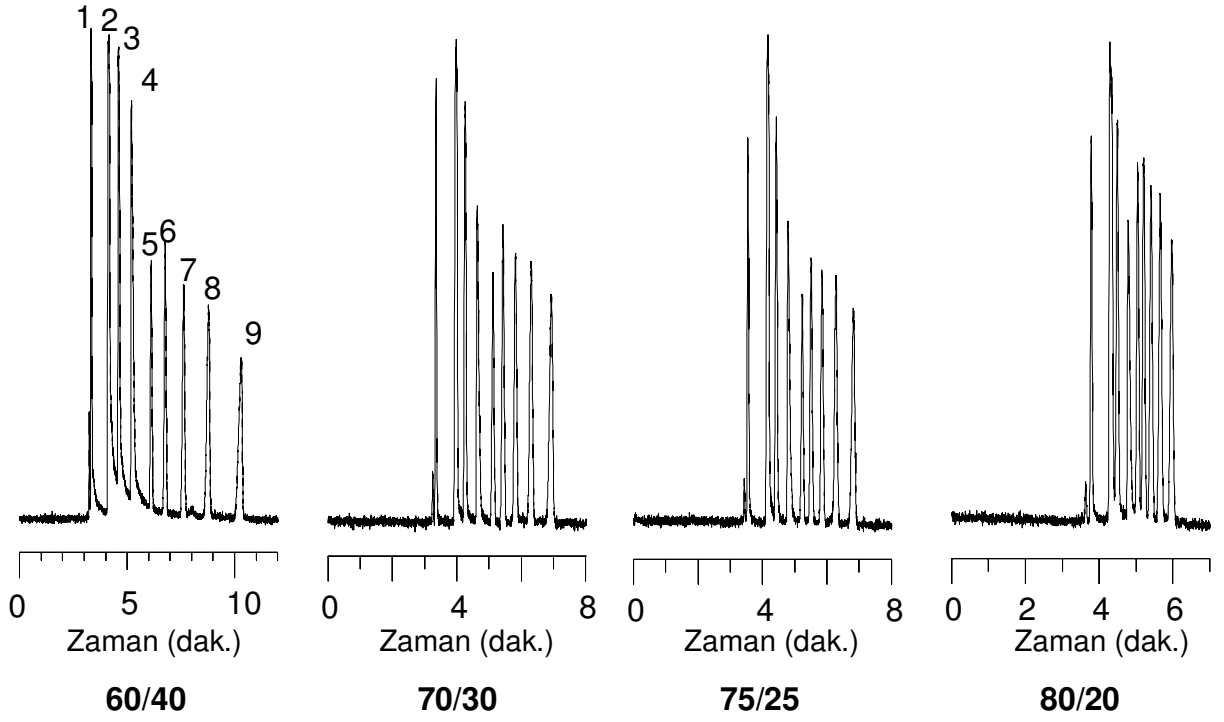
(B)

**Şekil 4.55.** PEGPEA monolit ile farklı analitler için teorik tabaka sayısının akış hızıyla değişimi. Monolit türü: (A) % 69 Pr-OH derişimi ile sentezlenen monolit, (B) % 0.3 AMPS derişimi ile sentezlenene monolit. ACN/5 mM pH 7fosfat tamponu oranı: 75/25, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, ID: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm.

PEGPEA bazlı monolitlerin teorik tabaka sayısının analit türü ile değişimini örnekleyebilmek amacıyla, her iki deney grubundan en iyi ayırma performansına sahip monolitler seçilmiştir. Bu değişim Şekil 4.55'te gösterilmektedir. Görüldüğü gibi her iki monolit için de analit hidrofobitesinin artışı ile kolon veriminde belirgin bir azalma meydana gelmektedir.



**Şekil 4.56.** % 69 Pr-OH derişimi kullanılarak sentezlenen PEGPEA monolit için farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tampon oranları ile alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 µL, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.



**Şekil 4.57.** % 0.3 AMPS derişimi kullanılarak sentezlenen PEGPEA monolit için farklı ACN/5 mM pH 7 fosfat tampon oranları ile alınan kromatogramlar. Uygulanan voltaj: 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

**Çizelge 4.18.** En iyi kromatografik performansa sahip PEGPEA monolitler kullanılarak farklı ACN/Tampon oranları ile alınan elektrokromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri.

---

% Pr-OH: 69

---

| ACN/Tampon | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60/40      | 6.72   | 3.33   | 3.83   | 5.58   | 3.82   | 4.70   | 5.85   | 6.53   |
| 70/30      | 6.44   | 2.92   | 3.20   | 4.91   | 2.46   | 2.88   | 3.53   | 4.13   |
| 75/25      | 5.72   | 2.36   | 3.00   | 3.85   | 2.21   | 2.73   | 3.14   | 3.39   |
| 80/20      | 5.47   | 2.11   | 2.68   | 2.86   | 1.49   | 1.69   | 2.13   | 2.24   |

---

Tampon: 5 mM pH 7 fosfat tamponu, Voltaj: 15 kV Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

---

% AMPS: 0.3

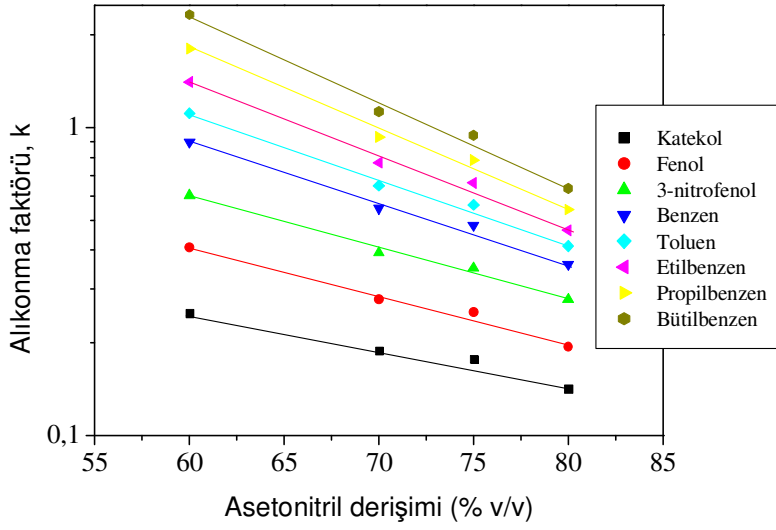
---

| ACN/Tampon | R(2/1) | R(3/2) | R(4/3) | R(5/4) | R(6/5) | R(7/6) | R(8/7) | R(9/8) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 60/40      | 6.28   | 2.91   | 3.64   | 5.45   | 4.00   | 4.83   | 6.00   | 6.67   |
| 70/30      | 6.04   | 2.18   | 3.09   | 4.00   | 2.55   | 2.83   | 3.54   | 3.60   |
| 75/25      | 5.71   | 2.18   | 2.91   | 3.85   | 2.40   | 2.66   | 3.02   | 3.32   |
| 80/20      | 4.91   | 1.43   | 2.31   | 2.15   | 1.25   | 1.41   | 1.71   | 1.90   |

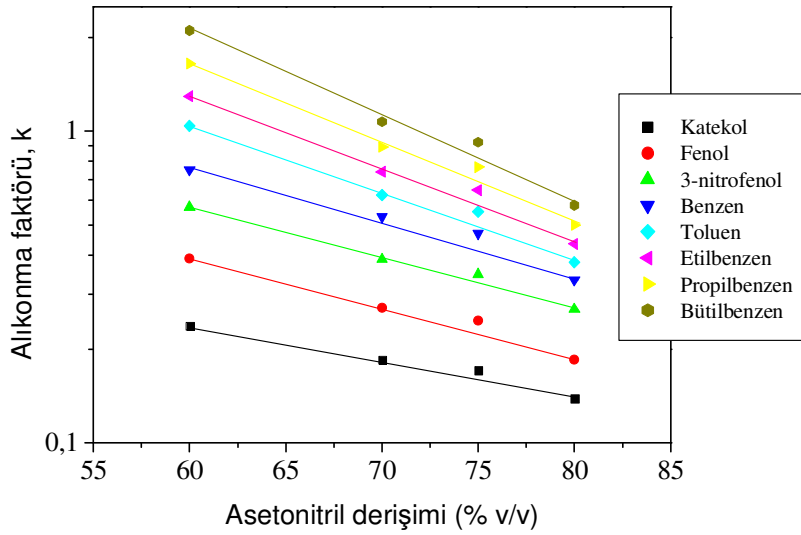
---

Tampon: 5 mM pH 7 fosfat tamponu, Voltaj: 15 kV Enjeksiyon: 5 kV, 3 s, DAD dedektör, 200 nm, Kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Pik sırası: 1. Tiyüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütilbenzen.

PEGPEA bazlı monolitlerin ayırma davranışının kromatografik koşullar ile değişimini inceleyebilmek amacıyla her iki deney grubunda en iyi ayırma performansını sergileyen monolitler seçilerek, öncelikle mobil fazdaki ACN/Tampon oranı ile monolitlerin ayırma davranışı incelenmiştir. Her iki monolit ile, farklı ACN/Tampon oranları ile alınan elektrokromatogramlar sırasıyla Şekil 4.56 ve Şekil 4.57'de, bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan pik çözünürlüğü değerleri ise Çizelge 4.18'de verilmektedir. Çizelge 4.18'den gözlenen bu davranış, Şekil 4.58'de verilen alıkonma faktörleri tarafından da doğrulanmaktadır. Şekil 4.58'den de görüldüğü gibi düşük Asetonitril derişimlerinde daha başarılı ayrımlar gerçekleşmektedir.



(A)



(B)

**Şekil 4.58.** PEGPEA monolitler için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi. Monolit türü: (A) % 69 Pr-OH derişimi ile sentezlenen monolit, (B) % 0.3 AMPS derişimi ile sentezlenen monolit, Uygulanan voltaj: 20 kV, Tampon: 5 mM pH 7, Etkin kolon uzunluğu: 25 cm, Kolon çapı: 100 µm, Enjeksiyon: 5 kV, 3s, DAD dedektör, 200 nm, Pik sırası: 1. Tiyoüre, 2. Katekol, 3. Fenol, 4. 3-nitrofenol, 5. Benzen, 6. Toluen, 7. Etilbenzen, 8. Propilbenzen, 9. Bütılbenzen.

## 5. SONUÇLAR

### Monolit Sentezi ve Karakterizasyonu

- Literatürden farklı bir gözenek yapıcı sistem kullanılarak farklı yüzey morfolojilerine ve yüzey polaritelerine sahip poli(BMA-co-EDM) monolitler sentezlenmiştir. Sentez aşamasında kullanılan bu yeni gözenek yapıcı sisteminde DMF/EG oranı değiştirilerek farklı gözeneklilikte monolitler elde edilmiştir. Bu monolitlerin yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile, gözeneklilik özellikleri Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı ile incelenmiştir.
- Farklı yüzey morfolojilerine özelliklere ve yüzey polaritelerine sahip hidrofobik poli(TFEM-co-EDM) monolitler sentezlenmiştir. Sentez aşamasında gözenek yapıcı sistemindeki IAA/BD oranı değiştirilerek farklı gözeneklilikte monolitler elde edilmiştir. Bu monolitlerin yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile, gözeneklilik özellikleri Civa Porosimetri ve Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı ile incelenmiştir.
- 'Click chemistry' temelli yeni kolon duvarı modifikasyon yöntemi önerilmiştir. Önerilen bu yöntem kullanılarak poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolit sentezlenmiştir. Bu monoliti yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile, gözeneklilik özellikleri Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı ile incelenmiştir.
- Farklı yüzey morfolojilerine ve yüzey polaritelerine sahip poli(PEGPEA-co-EDM) monolitler sentezlenmiştir. Sentez aşamasında gözenek yapıcı sistemindeki Pr-OH/BD oranı ve EOF'un oluşmasını sağlayan sülfonik asit grubu içeren AMPS monomer miktarı değiştirilerek farklı gözeneklilikte ve farklı yüzey kimyasal yapısına sahip monolitler elde edilmiştir. Bu monoliti yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile, gözeneklilik özellikleri Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı ile incelenmiştir.

## **Monolitik kolonların kromatografik performanslarının incelenmesi**

- Önerilen yeni gözenek yapıcı sistemiyle geçirgen poli(BMA-co-EDM) monolitler elde edilebilmiştir. Bu monolitlerin kromatografik performanslarının incelenmesi amacı ile alkilbenzen türevlerinin ayrımı denenmiştir. Her bir kolondan elde edilen kromatogramlar ile önerilen yeni gözenek yapıcı sisteminin (DMF/EG) poli(BMA-co-EDM) monolitler sentezlemek için uygun olduğunu göstermiştir. 4 dakika içerisinde alkilbenzen türevlerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir.  $250.000 \text{ m}^{-1}$  'e kadar çıkan teorik tabaka sayıları elde edilmiştir. Bu değerler literatürdeki poli(BMA-co-EDM) monolitlerle yarışabilecek değerlerdir.
- Literatürde ilk kez flor grubu içeren bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. F grubunun varlığı, organik bileşiklerin polaritesinde bir değişim meydana getirmektedir. F grubu içeren polimer bazlı bir monolitin, akrilik ve stiren bazlı klasik monolitlere göre farklı bir polariteye sahip olacağı açıktır. Bu nedenle tez kapsamında F içeren monomer kullanımı ile sentezlenen monolitin kromatografik davranışı incelenmiş ve akrilik ve stiren bazlı monolitlere göre avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur. Flor içeren monomer olarak, 2,2,2-trifloroetil metakrilat (TFEM) seçilmiştir. Sentezlenen bu monolitlerle farklı analit grupları (alkilbenzen, fenol, benzoik asit, anilin türevleri) için elde edilen kromatogramlar poli(TFEM-co-EDM) monolitlerin akrilik bazlı monolitler içerinden önemli bir yere sahip olacağını göstermektedir. 4 dakika içerisinde alkilbenzen türevleri, 2 dakika içerisinde fenol türevleri, 9 dakika içerisinde ise hem asidik hem de bazik olan analitler içeren karışım ayrılmıştır. Kromatogramlardan elde edilen teorik tabaka sayıları  $280.000 \text{ m}^{-1}$  'e ulaşmaktadır. Bu değer literatürdeki değerlerin üzerindedir.
- 'Kolay bağlanma' (Click chemistry) bazlı yeni duvar modifikasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen poli(TFEM-co-PA-co-EDM) monolit ile alkilbenzen ve fenol türevleri içeren 9'lu bir karışım başarılı şekilde ayrılmıştır. Klasik duvar modifikasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen (TFEM-co-EDM)

monolit ile aynı teorik tabaka sayılarına sahip olmakla birlikte farklı polariteye sahip olmasından dolayı 9'lu bir karışım ayrılabilmiştir. Sentezlenen bu monolit ile 9'lu karışım 12 dakika içerisinde yüksek çözünürlük değerlerine sahip olarak ayrılabilmiştir.

- İlk kez polietilen glikol (PEG) bazlı bir monomer kullanılarak, kapiler monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Polietilen glikol zincirinin varlığı, monolit polaritesinde bir artış meydana getirmektedir. Böylece polar formdaki monolitlerin sentezi ve kromatografik performanslarının belirlenmesi sağlanabilmiştir. Pr-OH derişimi ve AMPS derişimi olmak üzere iki ayrı değişkenin değiştirilmesi ile PEGPEA monolit sentezleri gerçekleştirilmiştir. BMA bazlı monolitler için literatürde tanımlanmış bir gözenek yapıcı sistemi olan Pr-OH/BD sisteminde Pr-OH derişimi ancak % 58-62 (v/v) aralığında değiştirildiği durumda CEC için kullanıma uygun gözeneklilik ve mobil faz geçirgenliğine sahip monolitler elde edilebilmektedir. Bu özellik göz önüne alınarak, PEGPEA bazlı monolitlerde nispeten daha geniş bir aralık % 62-69 v/v kullanılmıştır. İkinci grubu oluşturan üçlü deney setinde ise, monolitın negatif yüklü gruplarını içeren bileşen olan AMPS derişimi ağırlıkça % 0.3 ile % 0.9 aralığında değiştirilmiştir. Monolit sentezinde AMPS derişiminin % 1'in üzerine çıkarılması ile elde edilen monolitlerin ayırma gücünde önemli azalmanın olduğu literatürde gösterilmiştir. Bu nedenle % 1'in üzerindeki derişim değerleri denenmemiştir. Alkilbenzen ve fenol türevlerini içeren 9'lu bir karışımın 3 dakika gibi kısa bir süre içerisinde kromatografik ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. En yüksek Pr-OH derişimi (% 69) ile ve % 0.3 AMPS derişimi ile hazırlanan monolitlerde sırasıyla teorik tabaka sayısı için 265.000 ve 285.000 m<sup>-1</sup> değerleri edilmiştir. PEGPEA gibi, klasik alkil metakrilat bazlı monomerlere kıyasla daha hidrofilik bir yapının seçilmesi, alkilbenzen türü analitlerin kolondan daha hızlı geçişini sağlamakta, bu durum ise ayırma veriminin artışını sağlamaktadır.

## 6. REFERANSLAR

Yurtsever A., Saraçoğlu B., Tuncel A., Capillary electrochromatography with new monolithic stationary phase based on a fluorinated monomer, trifluoroethyl methacrylate, *Electrophoresis* (In Press).

Knox J.H., 1994, Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems, *Journal of Chromatography A*, Vol. 680 Is. 1, 3-13.

Grant I.H., 1996, Capillary electrochromatography, *Methods Mol. Biol.*, 52, 197-209.

Pretorius V., Hopkins B.J., Schieke J.D., 1974, Electroosmosis. A new concept for high-speed liquid chromatography, Vol. 99 Is. C, 23-30.

Jorgenson J.W., Lukacs K.D., 1981, Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries, *Analytical Chemistry*, 53, 1298-1302.

Tang Q., Lee M.L., 2000, Column technology for capillary electrochromatography, Vol. 19, 648-663.

Bragg W, Norton D., Shamsi S.A., 2008, Optimized separation of  $\beta$ -blockers with multiple chiral centers using capillary electrochromatography–mass spectrometry (In Pres).

Smith N., 1999, *Capillary Electrochromatography*, Baeckman Coulter, İngiltere, Sf:3).

Starkey A.J., 2007, Biochemical applications of microcolumn separation techniques, PhD, Indiana University, Department of Chemistry, Sf: 26.

Xu L., Sun Y., 2008, Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows, *Journal of Chromatography A*, 1183, 128-134.

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

Wu R., Hu R.L., Wang F., Ye M., Zou H., 2007, Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation, *Journal of Chromatography A* (In Pres).

Svec F., Huber C.G., 2006, Monolithic materials, promises, challenges, achievements, American Chemical Society, *Analytical Chemistry*, 2100-2107.

Hjerten S., Liao J.L., Zhang R., 1989, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography*, 473, 273-275.

Minakuchi H., 1996, Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 68, 3498-3501.

Xie S., Allington R.W., Svec F., Frechet J.M.J., 1999, Rapid reversed-phase separation of proteins and peptides using optimized 'moulded' monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns, *Journal of Chromatography A*, 865, 169-174.

Liapis A.I., Meyers J.J., Crosser O.K., 1999, Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths. Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *Journal of Chromatography A*, 865(1-2), 13-25.

Okanda F.M., Rassi Z.E., 2005, Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases. 4. Preparation of neutral stearyl - acrylate monoliths and their evaluation in capillary electrochromatography of neutral and charged small species as well as peptides and proteins, *Electrophoresis*, Vol. 26 Is.10, 1988-1995.

Palm A., Novotny M.V., 1997, Macroporous Polyacrylamide/Poly(ethylene glycol) Matrixes as Stationary Phases in Capillary Electrochromatography, *Analytical Chemistry*, Vol. 69 Is. 22, 4499-4507.

Gusev I., Huang X., Horvath C., 1999, Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 855(1), 273-290.

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.

Peters E.C., Petro M., Svec F., Frechet J.M.J., 1998, Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry, *Analytical Chemistry*, 70(11), 2288-2295.

Svec F., Frechet J.M.J., 1992, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Analytical Chemistry*, 64, 820-822.

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

Lee D., Svec F., Frechet J.M.J., 2004, Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1051 Is. 1-2, 53-60.

Ishizu K., Mitsutani K., Fukutomi T., 2003, Synthesis of poly(*t*-butyl methacrylate) macromonomer, *Journal of Polymer Science Part C*, Vol. 25 Is. 7, 287-291.

Xie S., Svec F., Frechet J.M.J., 2000, Preparation of porous hydrophilic monoliths: Effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-N,N-methylenebisacrylamide) monolithic rods, *Journal of Polymer Science Part A*, Vol. 35 Is. 6, 1013-1021.

Legido-Quigley C, Marlin N., Smith N.W., 2004, Comparison of styrene–divinylbenzene-based monoliths and Vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis, *Journal of Chromatography*, Vol. 1030 Is. 1-2, 194-200.

Cooper A.I., 2000, Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide, *Journal of Material Chemistry*, 10, 207-234.

Krajnc P., Leber N, Stefanec D, Kontrec S, Podgornik A., 2005, Preparation and characterisation of poly(high internal phase emulsion) methacrylate monoliths and their application as separation media, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1065 Is. 1, 69-73.

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

Peterson D.S., Rohr T., Svec F., Frechet J.M.J., 2003, Dual-Function Microanalytical Device by In Situ Photolithographic Grafting of Porous Polymer Monolith: Integrating Solid-Phase Extraction and Enzymatic Digestion for Peptide Mass Mapping, *Analytical Chemistry*, 75, 5328-5335.

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.

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

Hilder E.F., Svec F., Frechet J.M.J., 2002, Polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 23, 3934–3953.

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.

Hilder E.F., Svec F., Frechet J.M.J., 2004, Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 3–22.

Zou H., Huang X., Ye M., Luo Q., 2002, Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 954, 5–32.

Liapis A.I., Meyers J.J., Crosser O.K., 1999, Modeling and simulation of the dynamic behavior of monoliths. Effects of pore structure from pore network model analysis and comparison with columns packed with porous spherical particles, *J. Chromatogr. A.*, 865(1-2), 13-25.

Stulik K., Pacakova V., Suchankova J., Coufal P., 2006, Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography, *Journal of Chromatography B*, 841, 79–87.

Wu R., Hu L., Wang F., Ye M., Zou H., 2007, Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation, *Journal of Chromatography A* (In Pres).

Tang Q., Lee M. L., 2000, Column technology for capillary electrochromatography, *Trends in analytical chemistry*, Vol. 19, No. 11.

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

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

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

Klampfl C. W., Haddad P. R., 2000, Behavior of basic compounds in ion-exchange capillary electrochromatography with low-pH carrier electrolytes, *Journal of Chromatography A*, 884, 277–285.

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

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

Fu H., Xie C., Xiao H., Dong J., Hu J., Zou H., 2004, Monolithic columns with mixed modes of reversed-phase and anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 237–244.

Pyell U., 2000, Advances in column technology and instrumentation in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 892, 257–278.

Quaglia M., Sellergren B., De Lorenzi E., 2004, Approaches to imprinted stationary phases for affinity capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 53–66.

Bandilla D., Skinner C. D., 2004, Capillary electrochromatography of peptides and proteins, *Journal of Chromatography A*, 1044, 113–129.

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

Vegvari A., 2005, Homogeneous gels for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1079, 50–58.

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

Jinno K., Sawada H., 2000, Recent trends in open-tubular capillary electrochromatography, *Trends in analytical chemistry*, Vol. 19, No. 11.

Li W., Fries D. P., Malik A., 2004, Sol–gel stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 23–52.

Fritz J. S., Breadmore M. C., Hilder E. F., Haddad P. R., 2002, Use of ionic polymers as stationary and pseudo-stationary phases in the separation of ions by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 942, 11–32.

Svec F., Tennikova T.B., Deyl Z., 2003, *Monolithic materials: preparation, properties and applications*, Elsevier.

Svec F., Frechet J.M.J., 1992, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Anal. Chem.* 64, 820-2.

Svec F., Frechet J.M.J., 1996, New formats of polymeric stationary phases for HPLC separations: Molded macroporous disks and rods, *J. Mol. Recognit.*, 9, 326-34.

Guyot A., Bartholin M., 1982, Design and properties of polymers as materials for fine chemistry, *Prog. Polym. Sci.*, 8, 277-332.

Okay O., 2000, Macroporous copolymer Networks, *Prog. Polym. Sci.*, 2000, 25, 711-79.

Svec F., Frechet J.M.J., 1995, Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers, *Macromolecules*, 28, 7580-2.

Xie S., Svec F., Frechet J.M.J., 1997, Rigid porous polyacrylamide-based monolithic columns containing butyl methacrylate as a separation medium for the rapid hydrophobic interaction chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A*, 775, 65-72.

Peters E.C., Petro M., Svec F., Frechet J.M.J., 1997, Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography, *Anal. Chem.*, 69, 3646-9.

Yu C., Xu M., Svec F., Frechet J.M.J., 2002, Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 40, 755-69.

Premstaller A., Oberacher H., Huber C.G., 2000, High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns, *Anal. Chem.*, 72, 4386-93.

Petro M., Svec F., Gitsov I., Frechet J.M.J., 1996, Molded monolithic rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene) as a separation medium for HPLC of synthetic polymers: on-column precipitation-redissolution chromatography as an alternative to size exclusion chromatography of styrene oligomers and polymers, *Anal. Chem.*, 68, 315-21.

Kubin M., Spacek P., Chromecek R., 1967, Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, 32, 3881-3887.

Petro M. et al., 1996, Molded monolithic rod of macroporous Poly(styrene-co-divinylbenzene) as a Separation Medium for HPLC of Synthetic Polymers: "On-Column" Precipitation-Redissolution Chromatography as an Alternative to Size Exclusion Chromatography of Styrene Oligomers and Polymers", *Anal. Chem.*, 68, 315-321.

Lubbad S., Mayr B., Huber C.G., Buchmeiser M.R., 2002, Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: influence of stoichiometry on separation, *J. Chromatogr. A*, 959, 121-9.

Jorgenson J., Lukacs, 1981, High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis, *J. Chromatogr.*, 218, 209-216.

Berruex L.G., Freitag R., Tennikova T.B., 2000, Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in High Performance Monolith Affinity Chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 95-104.

Pretorius V., Hopkins B.J., Schieke J.D., 1974, Electro-osmosis A new concept for high-speed liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 99, 23-30.

Hildera E.F., Svec F., Frechet J.M.J., 2004, *J. Chromatogr. A*, Latex-functionalized monolithic columns for the separation of carbohydrates by micro anion-exchange chromatography, 1053, 101-6.

Hileman, F. D., Sievers R.E., Hess G.G., Ross W.D., 1973, In situ preparation and evaluation of open pore polyurethane chromatographic columns, *Anal.Chem.*, 45, 1126–1130.

Vlakh E., Ostryanina N., Jungbauer A., Tennikova T.B., 2004, Use of monolithic sorbents modified by directly synthesized peptides for affinity separation of recombinant tissue plasminogen activator (t-PA), *J. Biotechnol.*, 107, 275-84.

Xie S., Svec F., Frechet J.M.J., 1997, Monolithic poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) support for design of high throughput bioreactors, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 38(2), 211-2.

Buchmeiser M.R., 2006, Tailored ring-opening metathesis polymerization derived monolithic media prepared from cyclooctene-based monomers and cross-linkers, *Macromolecules*, 39, 5222-9.

Svec F., Frechet J.M.J., 1995, Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis, *Chem. Mater.*, 7, 707-15.

Chirica G.S., Remcho V.T., 2001, Novel monolithic columns with templated porosity, *J. Chromatogr. A*, 924, 223-32.

Fu H., Xie C., Dong J., Huang X., Zou H., 2004, Monolithic column with zwitterionic stationary phase for capillary electrochromatography, *Anal. Chem.*, 76, 4866-74.

Rohr T., Hilder E.F., Donovan J.J., Svec F., Frechet J.M.J., 2003, Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths, *Macromolecules*, 36, 1677-84.

Gusev I., Huang X., Horvath C., 1999, Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, 855, 273-90.

Takeuchi T., Matsui J., 2000, Miniaturized molecularly imprinted continuous polymer rods, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 23, 44-6.

Mayr B., Tessadri R., Post E., Buchmeiser M.R., 2001, Metathesis-based monoliths: Influence of polymerization conditions on the separation of biomolecules, *Anal. Chem.*, 73, 4071-8.

Krajnc P., Brown J.F., Cameron N.R., 2002, Monolithic scavenger resins by amine functionalizations of poly(4-vinylbenzyl chloride-co-divinylbenzene) polyHIPE materials, *Org. Lett.*, 4, 2497-500.

Ruan Z., Liu H., 1995, Preparation of 4-vinylpyridine and divinylbenzene porous-layer open tubular columns by in situ copolymerization, *J. Chromatogr. A*, 693, 79-88.

Xie S., Svec F., Frechet J.M.J., 1999, Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: Poly(2-vinyl-4;4 dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths, *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 30-5.

Hahn R., Podgornik A., Merhar M., Schallaun E., Jungbauer A., 2001, Affinity monoliths generated by in situ polymerization of the ligand, *Anal. Chem.*, 73, 5126-32.

Huang X., Zhang S., Schultz G.A., Henion J., 2002, Surface-alkylated polystyrene monolithic columns for peptide analysis in capillary liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 74, 2336-44.

Ueki Y., Umemura T., Li J., Odake T., Tsunoda K., 2004, Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography, *Anal. Chem.*, 76, 7007-12.

Lubbad S., Mayr B., Mayr M., Buchmeiser M.R., 2004, Monolithic systems: From separation science to heterogeneous catalysis, *Macromol. Symp.*, 210,1-9.

Santora B.P., Gagne M.R., Moloy K.G., Radu N.S., 2001, Porogen and cross-linking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization 3, *Macromolecules*, 34, 658-61.

Maruska A., Ericson C., Vegvari A., Hjerten S., 1999, (Normal-phase) capillary chromatography using acrylic polymer-based continuous beds, *J. Chromatogr. A.*, 837, 25-33.

Cooper A.I., Holmes A.B., 1999, Synthesis of molded monolithic porous polymers using supercritical carbon dioxide as the porogenic solvent, *Adv. Mater.*, 11, 1270-4.

Altria K.D., Smith N.W.,Turnbull C.H., 1997, A Review of the Current Status of Capillary Electrochromatography technology and Applications, *Chromatographia*, 46, 664-674.

Annabelle S., Carter-Finch, Smith N.W., 1999, Enantiomeric Separations by Capillary ElectroChromatography using a Macrocyclic Antibiotic Stationary Phase, *J. Chromatogr. A*, 848, 375-385.

Dearie H.S., Spikmans V., Smith N.W., Moffatt F., Wren S.A.C., Evans K.P., 2001, Characterisation of Electroosmotic flow in Capillary Electrochromatography columns., *J. Chromatogr. A*, 929, 123-131.

Dearie H.S., Smith N.W., Moffatt F., Wren S.A.C., Evans K.P., 2002, Effect of ionic strength on perfusive flow in capillary electrochromatography columns packed with wide-pore stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 945, 231-238.

Fujimoto C., 1995, Charged polyacrylamide gels for capillary electrochromatographic separations of uncharged, low molecular weight compounds, *Anal. Chem.*, 67, 2050-2053.

Mould D.L., Synge R.L., 1954, Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes, *Biochemistry Journal*, 58(4), 571-585.

Kubin M., Spacek P., Chromeczek R., 1967, Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, 32, 3881-3887.

Belenkii B.G., Podkladenko A.M., Kurenbin O.I., Maltser V.G., Nasledor D.G., Trushin S.A., 1993, Peculiarities of zone migration and band broadening in gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins with respect to membrane chromatography, *Journal of Chromatography*, Vol. 645 Is. 1, 1-15.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı, Soyadı** : Hüsnü Arda Yurtsever  
**Doğum Tarihi** : 20/01/1983  
**Doğum Yeri** : Mersin  
**Medeni hali** : Bekar  
**e-posta** : arday@hacettepe.edu.tr

### EĞİTİM DURUMU

**Lisans** : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,  
2002-2006  
**Yüksek Lisans** : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya  
Mühendisliği Bölümü, 2006-2008  
**Yabancı Dil** : İngilizce, Almanca