

**OLİGOMERİK SİLOKSAN BAZLI AFFİNİTE
MONOLİTLERİN SENTEZİ, SIVI KROMATOĞRAFİSİ VE
BORAT AFFİNİTE KROMATOĞRAFİSİNDE KULLANIMI**

**SYNTHESIS OF OLIGOMERIC SILOXANE BASED
AFFINITY MONOLITHS AND THEIR USAGE IN LIQUID
CHROMATOGRAPHY AND BORONATE AFFINITY
CHROMATOGRAPHY**

GJULTEN NEDJİP

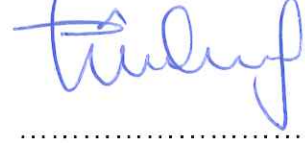
PROF. DR. S. ALİ TUNCEL
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

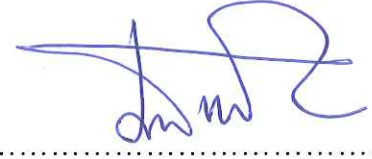
2017

Gjulten Nedjip' in hazırladığı **"Oligomerik Siloksan Bazlı Affinite Monolitlerin Sentezi, Sıvı Kromatografisi ve Borat Affinite Kromatografisinde Kullanımı"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

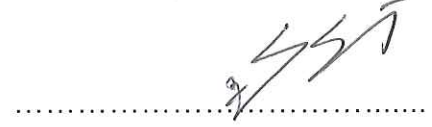
Prof. Dr. Tülay Durusoy
Başkan



Prof. Dr. S. Ali Tuncel
Danışman



Prof. Dr. Yeşim Sağ Açikel
Üye



Doç. Dr. Cengiz Koçum
Üye



Prof. Dr. Osman Sermet Kabasakal
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

- Tezimin/Raporumun 06/07/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

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

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

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

06 / 07 / 2017



Gjulden Nedjip

Değerli eşim ve canım aileme en içten sevgilerimle...

ETİK

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

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

beyan ederim.

04/07/2017



GJULTEN NEDJIP

ÖZET

OLİGOMERİK SİLOKSAN BAZLI AFFİNİTE MONOLİTLERİN SENTEZİ, SIVI KROMATOĞRAFİSİ VE BORAT AFFİNİTE KROMATOĞRAFİSİNDE KULLANIMI

Gjulten NEDJIP

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

Temmuz 2017, 109 sayfa

Tez kapsamında affinite kromatografisi modunda kullanım amaçlı, yeni hibrid monolitik yapılar sentezlenmiştir. Monolitik yapılarda kütle transfer direncine neden olan bölgelerin oluşumunu engellemek amacıyla çapraz bağ yoğunluğunun artırılması hedeflenmiştir. 10 metakrilat birimi içeren polihedral oligomerik silseskuioksan-metakrilat (POSS-MA) ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Nano-sıvı kromatografisi sisteminde kullanım amacıyla merkaptofenilborik asit (MPBA) bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kolon tiyol-en kimyasıyla tek basamaklı fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Ayrıca borat affinite kromatografisinde kullanım amacıyla vinilfenilborik asit (VPBA) bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid yapı termal başlatıcı varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Monolitik hibrit kolonların morfolojisinin, yüzey alanının ve fonksiyonel grup içeriğinin belirlenmesi için sırasıyla taramalı elektron

mikroskobu, azot adsorpsiyonu-desorpsiyonu ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır.

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun (iç çap: 100 µm, Uzunluk: 300 mm) kromatografik performansı nano-sıvı kromatografisi sisteminde alkilbenzen, anilin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların ayırımı ile test edilmiş ve amaçlanan alıkonma süresinden bağımsız kolon performansı elde edilmiştir. Mikroakış tabanlı affinite kromatografisi sisteminde VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon kullanılarak diol grubu içeren bileşiklerin yükleme konsantrasyonunun ve akış hızının izolasyon verimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Burada borat affinite kromatografisi, silika kapiler kolon (iç çap: 300 µm, uzunluk: 140 mm) içerisinde mikroakışkan sistemde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, diol içeren biyomolekülün (β -NAD ve ovalbumin) tatmin edici verim ve iyi bir tekrarlanabilirlik ile izole edilebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelime: oligomerik siloksan, borat affinite kromatografisi, nano-sıvı kromatografisi, çok modlu monolitik sabit faz, hibrid monolit, β -NAD, ovalbumin.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF OLIGOMERIC SILOXANE BASED AFFINITY MONOLITHS AND THEIR USAGE IN LIQUID CHROMATOGRAPHY AND BORONATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Gjulten NEDJIP

Master, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

July 2017, 109 pages

In this study, new hybrid monolithic structures were synthesized for use in affinity chromatography mode. This study was conducted to solve the previously encountered problems in the literature in which the increasing of cross-link density cause to prevent of the formation of mass transfer resistance regions. POSS-MA, with 10 methacrylate units, was utilized to overcome this problem as a cross-linker for synthesis of hybrid monolithic systems. For nano-liquid chromatography systems, MPBA-poly (POSS-MA) monolithic hybrid column was synthesized in one-step photopolymerization using thiol-ene chemistry method. Additionally, for borate affinity chromatography applications, VPBA-poly (POSS-MA) monolithic hybrid structure was synthesized in one-step method using free-radical polymerization in the presence of a thermal initiator. The surface morphology, specific surface areas (SSAs), and content of functional groups in the hybrid monolithic columns were determined using Scanning Electronic Microscope (SEM), nitrogen adsorption-desorption method and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), respectively.

The chromatographic performance of the MPBA-poly (POSS-MA) monolithic column (inner diameter: 100 μm , Length: 300 mm) was tested in the presence of alkylbenzenes, anilines and polycyclic aromatic hydrocarbons. It was found that the performance of column was independent from intended retention time. The VPBA-poly(POSS-MA) monolithic column was utilized in a microfluidic system using a silica capillary column (internal diameter: 300 μm , Length: 140 mm) for the isolation of diol containing biomolecules as well as the effect of loading concentration and flow rate on isolation yield was analysed. In this technique, the diol containing biomolecules (β -NAD and ovalbumin) were isolated with satisfactory efficiency and good reproducibility as well.

Keywords: the oligomeric silsesquioxane, boronate affinity chromatography, nano-liquid chromatography, mixed-mode monolithic stationary phase, hybrid monolith, β -NAD, ovalbumine.

TEŞEKKÜRLER

*Yüksek lisans hayatım ve bu tez çalışması boyunca her konuda engin bilgi birikimi, hayat görüşü, davranış ve tavsiyelerinden faydalanarak fikirlerimin biçimlenmesine, akademik alanda kararlarımda yol gösteren çok değerli danışman hocam **Prof.Dr. S. Ali TUNCEL' e***

*Tez çalışmam boyunca, göstermiş olduğu anlayış, yardım, öneri ve tavsiyeleriyle karşılaştığım sorunların aşılmasında yardımlarını benden esirgemeyen, çalışma azmiyle kendime örnek aldığım **Arş. Gör. Dr. Fatoş Çiğdem KİP'e***

*Samimiyeti ve içten arkadaşlığı ile her zaman destekçim olan **Merve Durmaz'a**, tez çalışmam boyunca unutulmaz yardımlarda bulunan **M. Cihan DEMİR'e**, laboratuvarda beraber çalışma fırsatı bulduğum dürüst kişiliği ile tanıdığım **Dr. Kourosh SALİMİ'ye**, **Arş. Gör. Duygu Deniz USTA'ya**, **Arş. Gör. Dr. Özlem HAMALOĞLU'na**, **Arş. Gör. Anıl KUBAN'a**, **Fatma ÇAMBAY'a**, **Ebru SAĞ'a**, **Ege EDİZ'e**, **Gülçin GÜNAL'a**, **Özlem İPEK'e**,*

*Hayatımın her anında her türlü desteğini benden esirgemeyen, daha iyi bir gelecek için beni sürekli başarıya doğru teşvik eden, beni benden çok düşünen canım ailem ve hayat arkadaşım sevgili eşim **Rejhan Rahman' a**,*

*Ayrıca lisansüstü eğitimim boyunca 115Z250 kodlu ve "Organosilikon kapiler monolitlerin tiyol-en kimyası ile sentezi ve nano-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak kullanımı" adlı 1001 projesi kapsamında yüksek lisans öğrenci bursuyla maddi olarak beni ve yapılan bu çalışmayı destekleyen **TÜBİTAK'a**,*

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ EN İÇTEN DUYGULARIMLA SUNMAK İSTERİM.

Gjulten NEDJİP

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKÜRLER.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ixx
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxii
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Kromatografi	4
2.2. Sıvı Kromatografisi	6
2.2.1. Ters Faz Kromatografisi (RPC)	6
2.2.2. İyon Değişim Kromatografisi	7
2.2.3. Affinite Kromatografisi.....	7
2.2.3.1. Borat Affinite Kromatografisi (Borate affinity chromatography, BAC).....	9
2.3. Kolon Teknolojisi	11
2.3.1. Monolitik Kolon Tasarımı	11
2.3.2. Monolitik Hibrid Kolon	12
2.3.3. Çok Modlu Monolitik Hibrid Kolon	14
2.3.4. Tiyol-En Kimyası.....	15
2.4. Kromatografik Elüsyon Modları.....	17
2.5. Kromatografik Performans Parametreleri	17
2.5.1. Alıkonma Faktörü.....	17
2.5.2. Teorik Kademe Yüksekliği (h) ve Teorik Kademe Sayısı (N).....	18
2.5.3. Pik çözünürlüğü	18
2.5.4. Geçirgenlik.....	19
2.5.5. Tekrarlanabilirlik	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Fotopolimerizasyon ve Tiyol-en Kimyası ile Sentezi.....	22

3.3. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Termal Etki Eşliğinde, Serbest Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi.....	24
3.4. Kolonların Silanizasyon İşlemi.....	27
3.5. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonun Hidrofobik ve İyon Değişimi Modlarında Nano-Sıvı Kromatografisinde Performans Değerlendirilmesi.....	29
3.5.1.MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	29
3.5.1.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapı ile Alkilbenzenlerin Hidrofobik Etkileşimi	29
3.5.1.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapı Kullanımıyla Çok Halkalı Aromatik Hidrokarbon Bileşiklerin Analizi	30
3.5.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik/Katyon Değişim Etkileşim Kromatografisi	31
3.6. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Borat Affinite Kromatografisinde Performansının Değerlendirilmesi	31
3.6.1. β -NAD ve Ovalbumin Bileşiklerinin Borat Affinite Kromatografisi Tekniği ile İzolasyon İşlemi.....	32
3.6.1.1. β -NAD ve Ovalbumin Bileşiklerinin İzolasyonunda Uygun Desorpsiyon Tampon Çözeltilisinin Belirlenmesi.....	35
3.7. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Kapiler Kolonların Akış Hızına Bağlı Geri-Basınç Değerlendirilmesi.....	36
3.8.MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapıların Karakterizasyonu.....	36
3.8.1. Monolitik Kolonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu.....	36
3.8.2. Monolitik Yapıların BET Cihazı ile Karakterizasyonu	37
3.8.3. Monolitik Yapıların XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) Cihazı ile Karakterizasyonu.....	37
3.8.4. Monolitik Yapıların Cıvalı Porozimetre Cihazı ile Karakterizasyonu	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Nano-Sıvı Kromatografi Sistemi için Çok Modlu Monolitik Hibrid, Kapiler Kolon Geliştirilmesi	39
4.1.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapının Tiyol-en Kimyası ile Sentezi..	39
4.1.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Kapiler Kolonun Karakterizasyonu	40

4.1.3. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun Çok Modlu Sistemde Uygulanması.....	42
4.1.3.1. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	42
4.1.3.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Alkilbenzen Ayırımı	42
4.1.3.2.1. İzokratik Modda Alkilbenzenlerin Kromatografik Analizi.....	42
4.1.3.2.2. Gradient Modda Alkilbenzenlerin Kromatografik Analizi	50
4.1.3.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Çok Halkalı Aromatik Bileşik Ayırımı.....	54
4.1.3.3.1. İzokratik Modda Çok Halkalı Bileşiklerin Kromatografik Analizi	54
4.1.3.3.2. Gradient Modda Çok Halkalı Aromatik Hidrokarbon Bileşiklerin Kromatografik Analizi.....	60
4.1.3.4. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun	64
Hidrofobik/Katyon Değişimi Etkileşim Kromatografisi	64
4.2. Serbest Radikal Polimerizasyonu ile VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik, Hibrid Kapiler Kolonların Sentezi.	73
4.2.1. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonların Karakterizasyonu.....	74
4.2.2. Monolitik Yapılı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonların Borat Affinite Kromatografi Sisteminde Kullanımı.....	79
4.2.2.1. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrit Yapı ile β -NAD İzolasyonu.....	80
4.2.2.2. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrit Yapı ile Ovalbümin İzolasyonu.....	88
5. SONUÇLAR.....	98
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Farklı VPBA derişimlerinde termal etki eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitlerinin sentez koşulları (Sıcaklık: 60°C, Polimerizasyon süresi: 24 saat).....	25
Çizelge 4.1. XPS analiz sonuçlarına göre MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının yüzdelik atom içeriği.....	42
Çizelge 4.2. Alkilbenzenlerin kromatografik ayrımında MPBA bağı-poli(POSS-MA) monoliti için pik çözünürlüğünün hareketli fazdaki ACN derişimi ile değişimi.....	46
Çizelge 4.3. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	48
Çizelge 4.4. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile “Analizden analize” ve “Günden güne” tekrarlanabilirlik değerleri.....	50
Çizelge 4.5. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	51
Çizelge 4.6 Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.....	52
Çizelge 4.7. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	53
Çizelge 4.8. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.....	54

Çizelge 4.9. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak pik çözünürlük değerlerinin değişimi.....	56
Çizelge 4.10. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak pik çözünürlük değerlerinin değişimi.....	59
Çizelge 4.11. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	61
Çizelge 4.12. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.....	62
Çizelge 4.13. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	64
Çizelge 4.14 Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.....	64
Çizelge 4.15. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	66
Çizelge 4.16. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	69
Çizelge 4.17. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.....	72
Çizelge 4.18. Farklı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların özgül yüzey alanı ve geçirgenlik değerleri.....	77

Çizelge 4.19. XPS analiz sonuçlarına göre VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun yüzdeler atom içeriği.....	78
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Uluslararası hakemli dergilerde monolitik hibrid kolonlar üzerine basılan makalelerin yıllara göre değişimi.....	3
Şekil 2.1. Bir karışıma ait analitlerin kromatografik kolon içerisinde birbirinden ayrılması ve farklı zamanlarda detektöre ulaşması.....	5
Şekil 2.2. Kromatografi tekniklerinin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Affinite kromatografi mekanizması.....	9
Şekil 2.4. Borik asit ve cis-diol içeren bileşikler arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.5. Metakrilat bağlı polihedral oligomerik organosilikon kafes formu(silsesquioxane) (POSS-MA) (n=8 formu örneklenmiştir).....	13
Şekil 2.6. Tiyol-en kimyasının mekanizması.....	16
Şekil 2.7. Kromatografik analiz sırasında ardışık gelen iki pikin çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan parametrelerin gösterimi.....	19
Şekil 3.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin fotopolimerizasyon ve tiyol-en kimyası ile sentezi.....	24
Şekil 3.2. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin termal etki eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezi.....	26
Şekil 3.3. Polimerizasyon sistemleri. (A) VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların su banyosunda polimerizasyonu. (B) MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun UV-ışını altında polimerizasyonu.....	27
Şekil 3.4. Kapiler kolonun iç çeperindeki hidroksil grupları ve TMSPM'nin metil grupları arasındaki bağlanma.....	28
Şekil 3.5. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitlerin hazırlanması ve borat affinite kromatografisi modunda sabit faz olarak kullanımı. (A) Monolitik çözeltinin hazırlanması ve cam deney tüpünde polimerleşmiş hali. (B) Hazırlanan çözeltinin insülin şiringası yardımıyla kolona basılması. (C) β -NAD ve ovalbumin'in izolasyon işlemi.....	33

Şekil 3.6. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonların karakterizasyonunda kullanılan taramalı elektron mikroskobu, Quanta 200 FEG SEM cihazı.....	36
Şekil 3.7. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler monolitik yapıların özgül yüzey alanı ölçümünde kullanılan BET (Quantachrome Nova 2200) cihazı.....	37
Şekil 4.1. UV-başlatıcı varlığında tiyol-metakrilat polimerizasyonu ile sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti için SEM fotoğrafları.....	40
Şekil 4.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit için (A) geri basınç değerinin akış hızıyla değişimi. Mobil faz: 40/60 mL/mL ACN/ %0.1 formik asit tamponu. Kolon: 100 µm iç çap x 300 mm uzunluk, (B) gözenek boy dağılım eğrisi.....	41
Şekil 4.3. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (ACN/su oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (µL/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....	43
Şekil 4.4. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.3.'te verilmektedir.....	44
Şekil 4.5. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kolon kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.3.'te verilmektedir.....	45
Şekil 4.6. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile hareketli faz akış hızının değişimine	

bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 40/60 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızları (μ L/dk) kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....47

Şekil 4.7. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.6.'da verilmektedir.....47

Şekil 4.8. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alikonma faktörünün kademe yüksekliği ile değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.6.'da verilmektedir.....49

Şekil 4.9. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (μ L/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....51

Şekil 4.10. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (μ L/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....53

Şekil 4.11. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (ACN/su oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (µL/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....55

Şekil 4.12. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.11.'de verilmektedir.....56

Şekil 4.13. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.11.'de verilmektedir.....57

Şekil 4.14. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile hareketli faz akış hızının değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 45/55 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızı (µL/dk) akış hızları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....58

Şekil 4.15. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.....59

- Şekil 4.16. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün değişimi ile kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.....60
- Şekil 4.17. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (μ L/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....61
- Şekil 4.18. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (μ L/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....63
- Şekil 4.19. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilanilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 30/70 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızı (μ L/dk): 0.75, pH değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....65
- Şekil 4.20. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA

derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.19.'da verilmektedir.....66

Şekil 4.21. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.19.'da verilmektedir.....67

Şekil 4.22. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilanilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: pH 7 ACN/10 mM PBS tamponu (mL/mL) (oranlar kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$): 0.75, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....68

Şekil 4.23. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.22.'de verilmektedir.....69

Şekil 4.24. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.22.'de verilmektedir.....70

Şekil 4.25. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilanilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: pH 7 30/70 ACN/10 mM PBS tamponu (mL/mL), akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$) oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı

sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.....	71
Şekil 4.26. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.25.'te verilmektedir.....	71
Şekil 4.27. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün değişimine bağı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.25.'te verilmektedir.....	73
Şekil 4.28. Termal-başlatıcı eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolit için SEM fotoğrafları. (A) 0 mg VPBA, (B) 20 mg VPBA, (C) 40 mg VPBA, (D) 50 mg VPBA, (E) 60 mg VPBA ve (F) 80 mg VPBA.....	75
Şekil 4.29. Farklı VPBA derişimindeki VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapılar için yüzey alanı ve geri basınç karşılaştırılması. Hareketli faz: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat ve %3'lük formik asit çözeltisi: Akış hızı: 5 µL/dak, 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.....	76
Şekil 4.30. Termal başlatıcı eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapı için gözenek boy dağılım eğrisi. (A) 0 mg VPBA, (B) 50 mg VPBA.....	77
Şekil 4.31. Farklı VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapılar için geri basınç değerlerinin akış hızı ile değişimi. (A) 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, (B) %3 Formik asit, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk. VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez şartları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.....	79
Şekil 4.32. Farklı desorpsiyon çözeltileri kullanılarak VPBA bağı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β-NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES,	

desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.....81

Şekil 4.33. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β -NAD'ın %3 formik asit ve 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat desorpsiyon çözeltiri kullanılarak zaman içerisinde kolonun doygunluğa ulaşımı. Analiz koşulları: adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, monolitik yapının VPBA içeriği: 40 mg, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.....82

Şekil 4.34. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μ g), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μ g), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların sentez şartları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.....83

Şekil 4.35. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların sentez şartları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.....84

Şekil 4.36. Farklı β -NAD derişimi kullanılarak borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μ g), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μ g), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.....85

Şekil 4.37. Farklı β -NAD derişimi kullanılarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM

pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.....86

Şekil 4.38. Farklı akış hızlarında borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit ile β-NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, β-NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.....87

Şekil 4.39. Farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doğgunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, β-NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.....88

Şekil 4.40. Desorpsiyon çözelti kullanımı ile VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit ile borat affinite kromatografisi modunda ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük Formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.....89

Şekil 4.41. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda ovalbumin'in %3 formik asit ve 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat desorpsiyon çözeltiri kullanılarak zaman içerisinde kolonun doğgunluğa ulaşımı. Analiz koşulları: adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, monolitik yapının VPBA içeriği: 40 mg, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.....90

Şekil 4.42. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda Ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük Formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak. VPBA bağlı-

poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez koşulları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.....91

Şekil 4.43. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez koşulları Çizelge 3.1.'de verimiştir.....92

Şekil 4.44. Farklı Ovalbumin derişimi kullanılarak borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM, pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük Formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.....94

Şekil 4.45. Farklı Ovalbumin derişimi kullanılarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.....95

Şekil 4.46. Farklı akış hızlarında borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA)) monoliti ile ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu verilmiştir. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM Ph=8,5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük Formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, ovalbumin derişimi: 0,5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.....96

Şekil 4.47. Farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözelti: %3'lük formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, Kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.....97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔP	Basınç düşmesi
r	Kolon iç çapı
η	Mobil faz vizkozitesi
h	Teorik tabaka yüksekliği
k	Alıkonma faktörü
N	Teorik kademe sayısı
L	Kolon uzunluğu
R	Pik çözünürlüğü
t_R	Herhangi bir bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süre
t_o	Referans bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süre
w	1/2 Pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini
RT_i	i nolu analitin alıkonma süresi
RT_n	Ortalama alıkonma süresi
N_i	Analiz sayısı
u	Hareketli fazın akış hızı
K_o	Kolon geçirgenliği
SD	Standart sapma
BSS	Bağıl standart sapma
V	Numune hacmi
C_v	Adsorplanmayan analitin derişimi
C_a	Adsorplanan analitin derişimi
C_d	Desorplanan analitin derişimi
$A_{f,a}$	Adsorplanmayan analitin absorbansı
$A_{f,d}$	Adsorplanmayan analitin absorbansı
m_1	Adsorpsiyon çözelti içinde içinde hazırlanan analitin kalibrasyon eğrisi
m_2	Desorpsiyon çözelti içinde içinde hazırlanan analitin kalibrasyon eğrisi
Q_v	Adsorplanmayan analit miktarı
Q_a	Adsorplanan analit miktarı
Q_d	Desorplanan analit miktarı
Q_y	Yüklenen analit miktarı
$\%A$	Yüzdellik adsorpsiyon

%D	Yüzdellik desorpsiyon
%A	Yüzdellik izolasyon

Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
AIBN	2,2'-Azobisizobutironitril
β -NAD	β -Nikotinamid Adenin Dinukleotid
DMPA	2,2-Dimetoksi-2-fenilasetofenon
FA	Formik asit
HEPES	HEPES
HCl	Hidroklörük asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MPBA	P-Merkapto Fenil Boronik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
ÖYA	Özgül yüzey alanı
PAH	Çok halkalı aromatik hidrokarbonlar
POSS-MA	Poliheral Oligomeric Silsesquioxan
PBS	Fosfat tampon çözelti
RPC	Ters faz kromatografisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
STB	di-sodyum tetraborat
TMSPM	3-trimetoksi propil metakrilat
UV	Ultraviole
VPBA	P-Vinil Fenil Boronik asit

1.GİRİŞ

Analitik ayırma biliminde kromatografik ayırımların minyatürleştirilmesine yönelik eğilimlerin sonucunda nano-sıvı kromatografisi (nano-LC) sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem iç çapı 10 ile 100 µm aralığında değişen kapiler kolon kullanımıyla, düşük örnek ihtiyacı, kısa analiz süresi, düşük miktarda hareketli faz kullanımı gibi özellikleriyle geleneksel sıvı kromatografisine göre avantajlar sağlamaktadır. Nano-sıvı kromatografisi uygulamalarında, partikül dolgulu, açık tübüler ve monolitik kapiler kolonlar kullanılmaktadır. En yaygın uygulamalar ise monolitik kapiler kolon kullanımı ile gerçekleştirilmektedir [1].

Nishang'ın, serbest radikal polimerizasyonu kullanımı ile polimerik monolitler üzerine yapmış olduğu bir çalışmada, monolitik yapıda çapraz bağ yoğunluğunun eşit dağılım göstermediği görülmüştür [2-4]. Düşük çapraz bağ yoğunluğu gözlenen bölgelerin kromatografik analiz sırasında mobil faz ile temas etmesi sonucunda jel formunda geçici mikrogözenekliliğe (gel type temporary microporosity) sebebiyet verdiği görülmüştür. Bunun sonucunda bölgede kütle transfer direnci artmakta ve yapıda durgun bölgeler (stagnant mass transfer zone) oluşmaktadır. Bu durum analitlerin sabit fazdan elüsyonunu zorlaştırıp analiz süresinin uzamasına ve bant genişliğinin artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak kolon ayırma verimi, artan alıkonma süresine bağlı olarak düşmektedir (retention-dependent column performance). Laboratuvarımızda TÜBİTAK 1001 programı kapsamında yürütülen projede hidrofilik etkileşim kromatografisi modunda çalışılmak üzere sentezlenen polimerik monolitlerde de Nishang tarafından ters faz kromatografisi modundaki çalışmasında ortaya konulan **artan alıkonma faktörü ile kolon veriminin azalması** problemi görülmektedir [2,5]. Düzgün mezogözenekli yapıya sahip silika bazlı monolitlerde artan alıkonma faktörüne bağlı olarak kolon veriminin azalması problemi yoktur. Ancak, burada düşük kimyasal ve mekanik dayanım en önemli sorundur. Bu problemlerin çözümüne yönelik olarak bu tez çalışmasında yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip hibrid yapıli monolitlerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

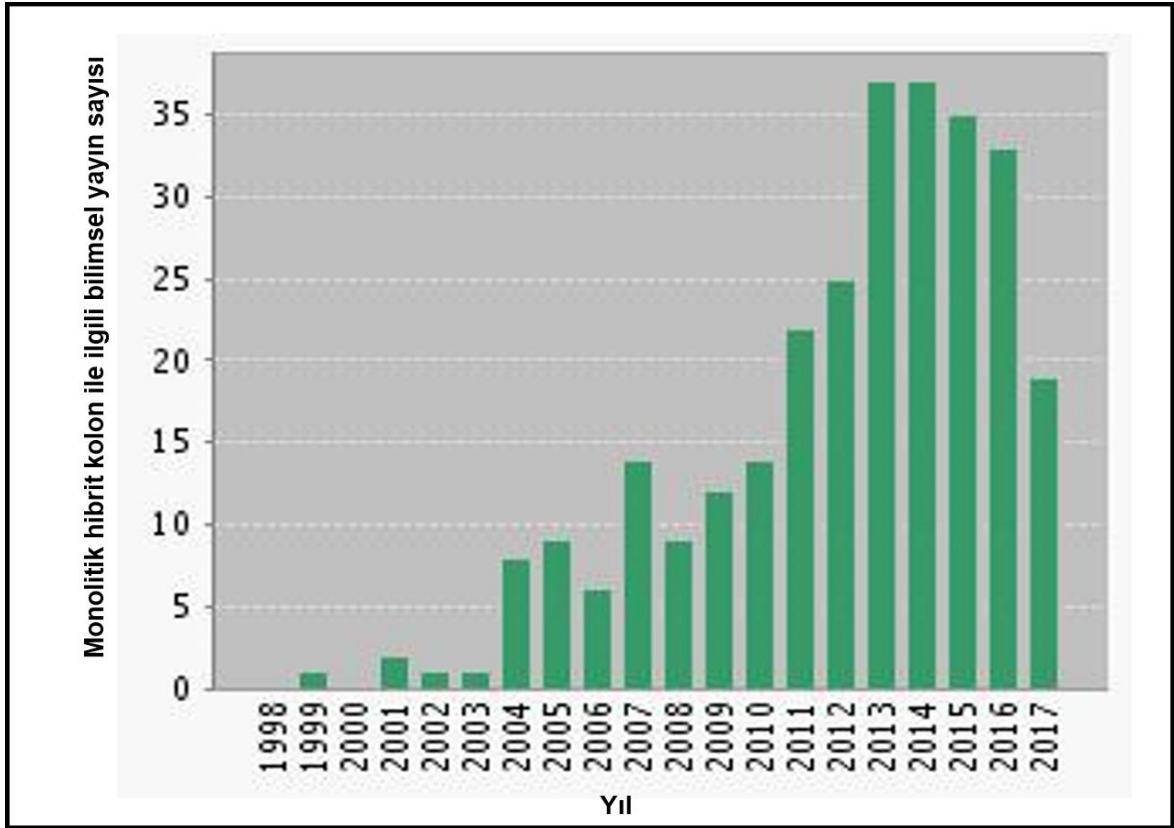
Tez kapsamında MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitin sentezi tek basamaklı fotopolimerizasyon ile yapılmıştır. Bu reaksiyonda ana monomer ve çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS'un metakrilat grupları ile ligand görevini üstlenen

MPBA'nın tiyol grubu bir UV-başlatıcı varlığında reaksiyona girmektedir. POSS-MA'nın 10 metakrilat grubuna sahip olması çapraz bağlayıcı ajan görevini üstlenerek monolitin yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip olacak şekilde sentezlenmesini sağlamaktadır. Yüksek çapraz bağ yoğunluğu ile mikro gözenekli formda jelimsi yapı oluşumu engellenip nano-sıvı kromatografi sisteminde "**analit alıkonma süresinden bağımsız ayırma performansına**" ulaşılması amaçlanmıştır. Monolitin gözenekliliği ve geçirgenliği polimerizasyon ortamının bileşimine bağlı olup bu tür monolitler organik polimer bazlı ve aynı zamanda silika bazlı olmaları nedeniyle mekanik dayanıklılık ve iyi pH (1-11) kararlılığı göstermektedir. Sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitin nano-sıvı kromatografisinde kullanımı amaçlanmıştır. Bu bölümde sentezlenen kolon alkilbenzen ve çok halkalı aromatik bileşiklerin ters faz kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC) modunda ve anilin türevlerinin hidrofobik etkileşim/katyon değişimi kromatografisi modunda ayırımı için sabit faz olarak kullanılmıştır. MPBA, yapısında hidrofobik fenil halkası ve hidrofilik bir borik asit grubu barındırmasıyla hidrofobik, hidrofilik etkileşim ve iyon değişimi sağlayan ligand görevini üstlenerek, tek kolon kullanımıyla değişik kromatografik modlarda çalışma fırsatı sağlamaktadır. Böylece değişik kimyasal ve fiziksel özellikteki bileşiklerin ayırımında kullanılabilir. Yapılan kromatografik analizler sonucunda "pik çözünürlüğü, analitlerin kolonda alıkonma faktörü ve kolonun teorik kademe yüksekliği" cinsinden kromatografik ayırma verimi hesaplanmıştır.

VPBA bağlı-poli(POSS-MA) organosilikon monolit ise affinite kromatografi sistemi için diol grubu içeren biyolojik moleküllerin izolasyonunda sabit faz olarak kullanılmıştır. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid yapı, ana monomer ve aynı zamanda çapraz bağlayıcı olarak POSS-MA, ligand olarak VPBA, uygun gözenek yapıcı sistem ve termal başlatıcı kullanımıyla 300 µm'lik silika kapiler kolonlarda sentezlenmiştir. VPBA ligandın taşıdığı borik asit grubu, cis-diol grubu içeren biyolojik bileşikler ile halkalı ester yapılar oluşturarak bileşiklerin yapıya adsorplanması sağlanmaktadır. Sonrasında uygun bir tampon çözelti kullanımı ile ortamın pH'ı değiştirilerek adsorplanan bileşiklerin kolondan elüsyonu gerçekleşmektedir. Glikoproteinler, glikopeptidler, ribonükleotidler, ribonükleosidler, sakaritler ve katekolaminler gibi önemli biyolojik moleküllerin analizinde kullanılan borat affinite kromatografisi günümüzde en çok kullanılan tekniklerinden birisidir.

Tez kapsamında sentezlenen VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid yapı ovalbumin ve β -NAD'ın izolasyonunda kullanılmıştır.

Şekil 1'de monolitik hibrid kolonlar üzerine uluslararası hakemlik dergilerde yıllara göre basılmış makale sayısı verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere yapılan literatür araştırmalarında organosilikon hibrid kapiler monolitlerin sentezi 2013 yılında hız kazanmıştır. Buna rağmen MPBA ve VPBA bağı POSS-MA bazlı monolitik kolonların sentezi ve kullanımı literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 1. Uluslararası hakemli dergilerde monolitik hibrid kolonlar üzerine basılan makalelerin yıllara göre değişimi.

Tez çalışması kapsamında sentezlenen MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik kolon, seçilen analitlerin kromatografik ayrımında ve VPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik kolon seçilen diol grubu içeren bileşiklerin mikroakış tabanlı sistemde izole edilmesinde başarıyla kullanılmıştır.

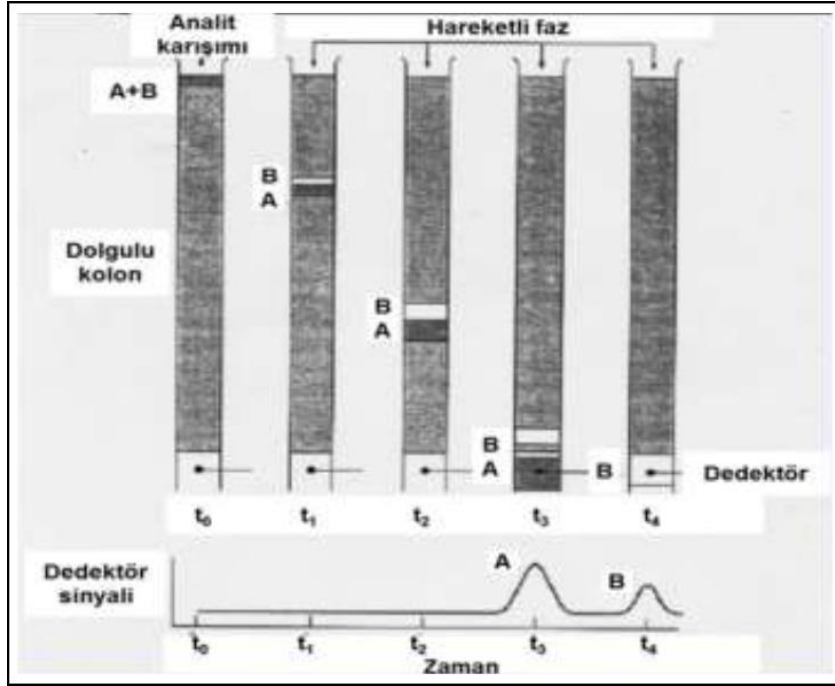
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kromatografi

Ayırma bilimi, bir asır önce keşfedilen temel fiziki süreçleri kullanan bir bilimdir. Bu alan biyolojik, ilaç, çevre ve adli bilim gibi birçok alanda ayırma yöntemlerine ihtiyaç duyulması ve teknolojinin gelişmesiyle bilim adamlarını kromatografik yöntemleri geliştirmeye yöneltmiştir. Ayrıca, malzeme bilimi, elektronik ve mühendisliğin katkısıyla bugünkü kromatografik teknolojinin daha küçük boyutta, daha hızlı ve daha doğru sonuçlar vermesine etki sağlamıştır [6]. İlk kez 1899-1901 yılları arasında M. S. Tswett tarafından bitki klorofillerin fiziko-kimyasal yapısı üzerine yapılmış olan bir çalışmada kromatografik analiz uygulanmıştır. Her bir on yılda kromatografik analiz üzerine yeniliklerin getirilmesiyle 20. yüzyılın sonlarında kromatografi kimyada ve biyokimyada en yaygın kullanılan analitik ayırma tekniği haline gelmiştir [7].

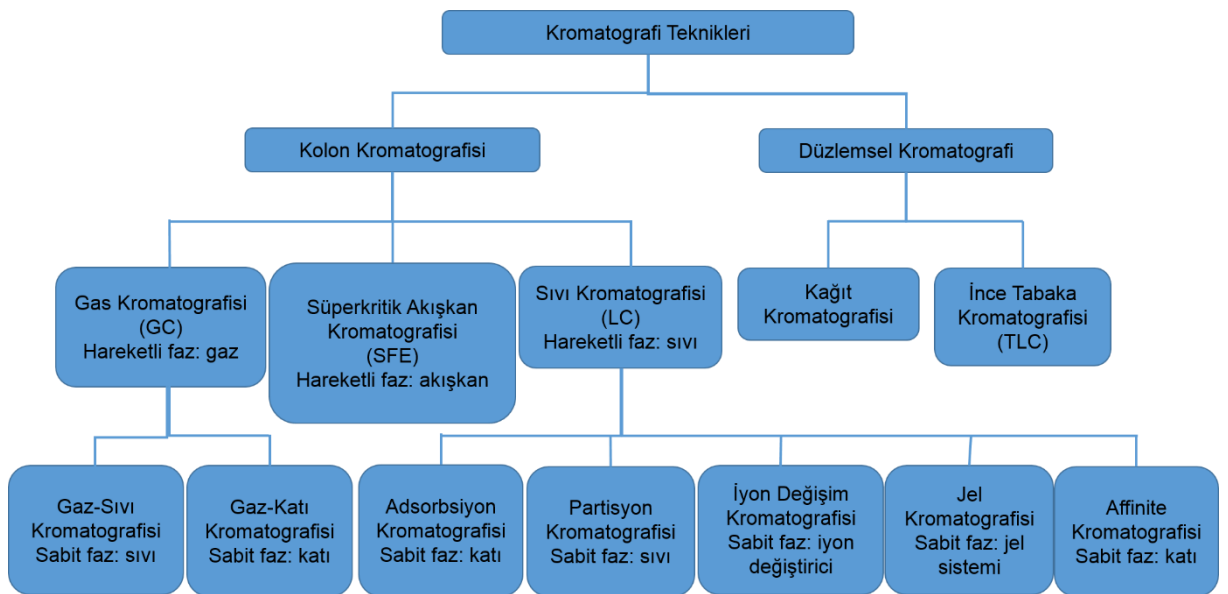
Kromatografi tekniği sabit bir faz üzerinden, hareketli faz eşliğinde bir karışımın bileşenlerinin geçirilmeleri, bu geçiş sırasında analitlerin iki faz arasında farklı dağılım göstermeleri ve bunun sonucunda farklı hızlarla hareket edip farklı zamanlarda kromatografik kolonu terk etmeleri prensibine dayanır. Kromatografi özellikle bir karışımda birbirine çok yakın fiziksel ve kimyasal özellikteki bileşikleri ayırmak ve başarılı sonuçlar ile maddeleri saflaştırmak için kullanılan analitik bir tekniktir [7]. Burada sabit faz (durgun faz yada stasyoner faz) dediğimiz düzlemsel kromatografi tekniklerinde düz bir yüzeye, kolon kromatografisi tekniklerinde ise kolon içerisine tutturulmuş hareketsiz, kararlı duran bir “katı” yada katı bir destek üzerine emdirilmiş bir “sıvı” olabilir. Sabit fazın katı olması durumunda ayırım analitlerin polarite farklılığına göre gerçekleşir. Eğer katı sabit fazımız bir iyon değiştirici ise analitlerin sabit faz ile iyon değiştirmesi sonucunda ayırım gerçekleşir. Sabit fazın sıvı olması durumunda ise, analitlerin sabit ve hareketli faz arasında çözünürlük farkı göstermesiyle sabit faz üzerinden geçiş hızlarında farklılık gözlemlenir. Hareketli faz (sürükleyici faz ya da mobil faz) ise sabit fazın üzerinden veya arasından hareket eden bir “sıvı” veya “gaz” olabilir [7-10].

A ve B olmak üzere iki analitin kolon içerisinde sabit faz ile farklı etkileşim göstermesine karşılık ayırımı ve bunun sonucunda detektörün farklı zamanlarda pik sinyali vermesi Şekil 2.1'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Bir karışıma ait analitlerin kromatografik kolon içerisinde birbirinden ayrılması ve farklı zamanlarda detektöre ulaşması [9].

Aşağıda kromatografi tekniklerini kullanma biçimine göre, sonrasında faz tipine göre ve daha sonra ayırma mekanizmasına göre kromatografik tekniklerin sınıflandırmasını kapsayan şema verilmiştir [7,8, 10,11].



Şekil 2.2. Kromatografi tekniklerinin sınıflandırılması.

2.2. Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-High Performance Liquid chromatography) günümüzde özellikle biyoloji ve biyomedikal alanlarında molekül analizi ve saflaştırmada, özellikle organik ve peptid-protein gibi maddelerin saflaştırmasında ve karakterizasyonunda büyük önem arz etmektedir [7,8]. HPLC eski kromatografi türlerinin geliştirilmiş ve hızlandırılmış şekli olup daha küçük boyutlarda kolon kullanımı ile daha yüksek basınçlara ulaşır, kısa sürede daha yüksek kromatografik analiz verimi elde etmeyi olanaklı kılmıştır.

Analiz verimliliğini iyileştirmek adına, analiz sırasında daha düşük hacimde hareketli faz kullanımı, daha düşük miktarlarda numune hacmi ve daha güçlü algılama duyarlılığı sağlamak adına HPLC'ye alternatif olarak mikro-sıvı ve nano-sıvı kromatografi sistemleri geliştirilmiştir. Mikro-sıvı kromatografisinde iç çapı 0.5-2.1 mm arası kolonlar, mikrolitre düzeyinde hacimsel akış hızı kullanılarak analiz yapımına imkân verir [12]. Nano-sıvı kromatografisi günümüzde en yeni sıvı kromatografi sistemi olup nicel ve nitel analizlerde kullanılarak yüksek ayırma verimi ve kısa analiz süresi ile mikrolitre düzeyinde mobil faz ve örnek hacmi kullanıma imkân vermektedir. Sabit faz olarak nano-sıvı kromatografisinde polimer veya silika bazlı, 10 ila 100 mikron çap değeri aralığına sahip partikül dolgululu, açık tübüler ve monolitik kapiler kolonlar kullanılmaktadır. En yaygın ise monolitik kapiler kolonlar kullanılmaktadır [1]. Floresans ve ultraviyole detektör kullanımı sayesinde, düşük numune hacminde yüksek duyarlılıkta analit tayini ve ayrıca kütle spektrometrisi ile birlikte kullanıldığında, çözelti içerisinde düşük derişime sahip analitlerin miktarının belirlenmesinde kolaylık sağlamaktadır [9].

2.2.1. Ters Faz Kromatografisi (RPC)

Ters faz sıvı kromatografisi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)'nin bir alt sınıfı olup günümüz kimya ve ilaç endüstrilerinde en sık kullanılan analitik teknolojilerden biridir [6].

Ters faz kromatografisi apolar sabit fazın, metanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi polar hareketli faz ile birlikte kullanımıyla gerçekleşir. Hidrofobik etkileşime dayalı bu kromatografik teknik fenolik, çok halkalı aromatik ve hidroksil grup içerikli polar bileşiklerin ayırımında çokça kullanılmaktadır. Polaritesi en yüksek olan bileşik

detektöre en önce ulaşır ve hareketli fazın polaritesi arttıkça elüsyon zamanı da artar. Metanol asidik, asetonitril ise bazik bileşiklerin analizinde kullanılmakta olup, en çok kullanılan asetonitril'dir. Su polariteyi ayarlamak için kullanılır, tetrahidrofuran ise büyük dipollü bileşikler için kullanılır. Sabit faz olarak genelde n-oktadesil (C₁₈) ya da n-desil (C₈) karbon zincirleri veya fenil gruplu materyaller kullanılmaktadır [13,14].

2.2.2. İyon Değişim Kromatografisi

Çözeltideki iyonların sabit faz üzerindeki zıt iyonlara karşı gösterdiği ilgiye dayalı analit ayırımı gerçekleştiği bir kromatografik teknik türüdür. Hareketli fazın tamponlanmış sulu bir çözelti olduğu ve sabit fazın iyon değiştirici bir katı olduğu bu kromatografik analiz türü ilk kez Small ve ekibi tarafından önerilmiştir [12]. Değişik iyonik bileşiklerin ayırımında kullanılan bu kromatografik teknik, suda çözünen organik maddelerin analizinde de kullanılmaktadır. Pozitif yüklü iyonlar için anyonik fonksiyonel gruplu sabit fazlar, negatif yüklü iyonlar için ise katyonik fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar kullanılmaktadır [9,12]. Hareketli fazın zıt yüklü iyonları ile aynı yükte olan iyonik yapıdaki örnek bileşikler kolonun sabit fazına bağlanmak için hareketli fazın zıt iyonlarıyla yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan "uygun yükte" bileşikler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşikler kolonu daha kısa sürede terk eder. İyon değiştirme kromatografisini, sabit fazın zayıf/kuvvetli anyonik veya zayıf/kuvvetli katyonik yapıda bir reçine olmasına bağlı olarak katyon değiştirme kromatografisi veya anyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılabilir [15].

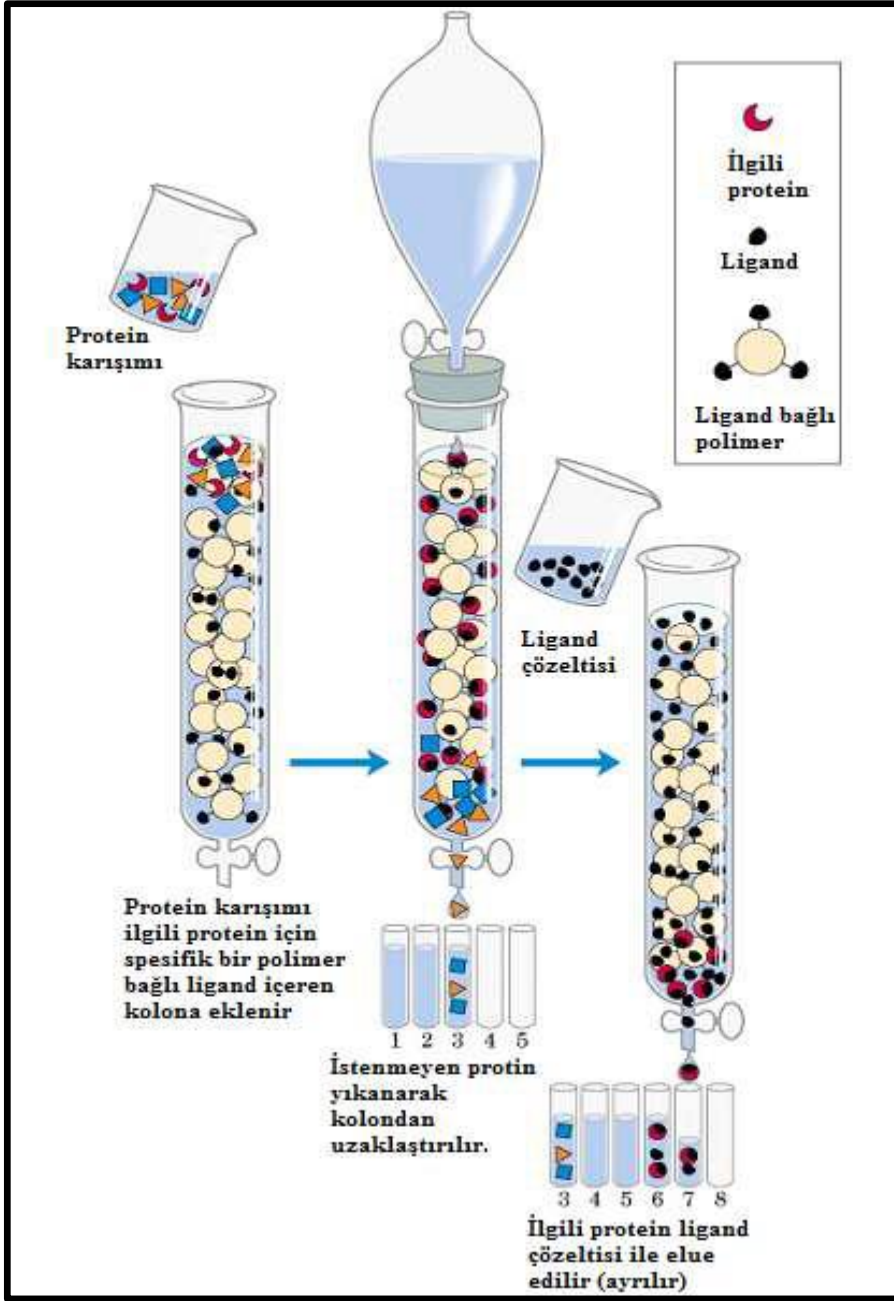
2.2.3. Affinite Kromatografisi

Bütün analitik kromatografi tekniklerinde analiz sırasında matris ve analit üzerinde bulunan fonksiyonel grup arasında farklı etkileşim mekanizması sergileyerek hepsinin işleyiş biçimi farklı olmaktadır. Bu tür kromatografik tekniklerin bir diğer dezavantajı ilgili molekülü izole etmek için daha yüksek örnek hacmine ihtiyaç duymalarıdır. Affinite kromatografisi dışında belirli bir analit için özgün olan başka bir kromatografi türü yoktur. Affinite kromatografisi ilk kez 1910 yıllarında

Starkenstein tarafından düşük çözünürlüğe sahip olan nişastanın α -amilaz bağlarının incelenmesinde öne sürülmüştür. Daha sonraları düşük çözünürlükteki maddelerin üzerinde enzim, antikor gibi maddelerin izolasyonunda denenmiştir. 1960'larda agaroz destekli yatakların oluşturulmasıyla ve siyanojen bromür bazlı kovalent immobilizasyon metotlarının keşfedilmesiyle modern affinite kromatografisine adım atılmıştır. Affinite kromatografisi tekniği ile kromatografi matrisinin belirli bir molekül veya protein grubu üzerine spesifik olarak çalışması mümkün kılınmıştır. Affinite kromatografisi tıpkı bir antijen ile antikor ve enzim ile sübstratta olduğu gibi bir ligand ve reseptörün karşılıklı birbirini tanıma ilkesine dayanır. Oldukça spesifik, biyolojik etkileşime dayanan bu teknik biyokimyasal karışımları ayırmak için kullanılan en etkili kromatografik yöntemlerden biridir [12,14].

Affinite kromatografisi bir karışım ortamından bir molekülü izole etme ve derişimi artırma veya bir karışımda o molekülün derişimini azaltma ve ilaç, uyuşturucu gibi yabancı maddelere bağlanan biyolojik bileşikleri tanımlama amacıyla kullanılmaktadır.

Affinite saflaştırma işlemi sırasında ilgili molekülün iyi bilinen ve tanımlanmış özelliği sayesinde hedef molekülü haline gelmiş olması, katı düzenek üzerinde bağlanmış ligandla tersinir etkileşime girmesi sağlanmaktadır. Çözeltideki diğer moleküller istenen özelliklere sahip olmamasıyla ligand ile etkileşime giremez. Katı ortamdaki liganda bağlı duran hedef molekülü elüsyon olarak bilinen bir işlemle serbest bırakılır [14]. Şekil 2.3'te protein karışımından oluşan bir çözeltiden ilgili bir proteinin affinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması şematik olarak gösterilmiştir.

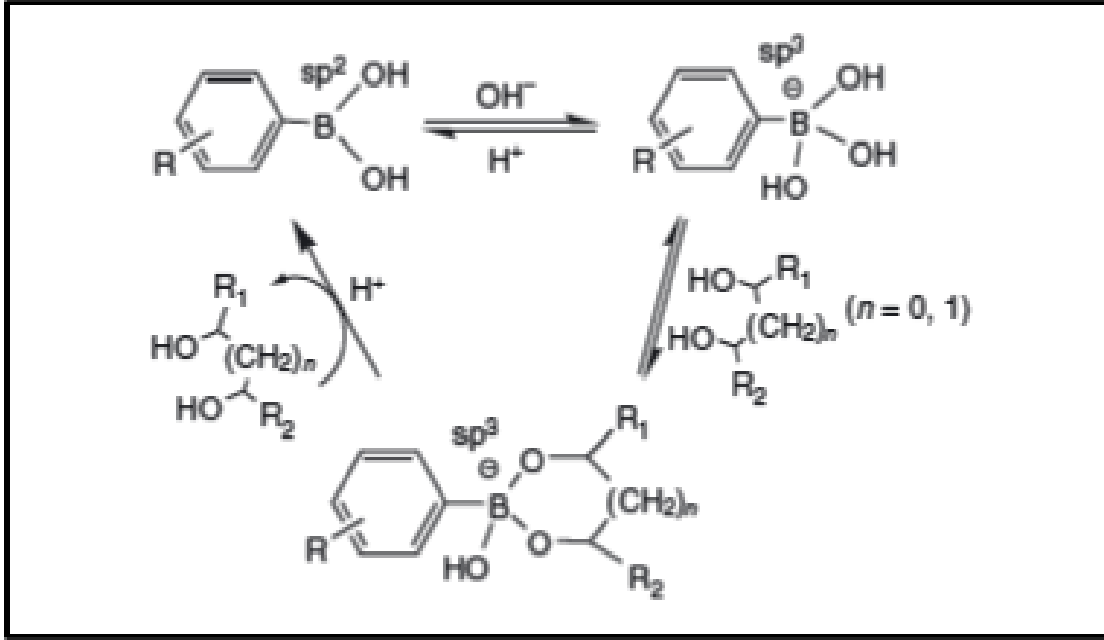


Şekil 2.3. Affinite kromatografi mekanizması [16].

2.2.3.1. Borat Affinite Kromatografisi (Borate affinity chromatography, BAC)

Borat affinite kromatografisi, sabit fazın oluşumunda borik asit grubu taşıyan ligand kullanımı ile cis-diol bileşiklerin ayırımında yüksek seçicilik gösteren affinite kromatografi türüdür. Buradaki mekanizma, cis-diol grupları, ligandın borik asit grubuna pH kontrolüyle geri dönüşümlü kovalent olarak bağlanmasına dayalıdır [11,17]. BAC diğer kromatografik affinite teknikleriyle kıyaslandığında, geniş

spektrumlu seçicilik, geri dönüşümlü kovalent bağlanma, pH kontrollü adsorpsiyon/desorpsiyon ve hızlı adsorpsiyon/desorpsiyon kinetiği gibi önemli özelliğe sahip olduğu söylenebilir. Bu nedenle son 10 yılda BAC hızlı gelişim göstererek affinite kromatografisinin en çok kullanılan tekniği haline gelmiştir. Cis-diol içeren biyomoleküller glikoproteinler, glikopeptitler, ribonükleozitler, ribonükleotidler, sakaritler ve katekolaminler dahil olmak üzere önemli bir bileşik sınıfıdır. Proteomik, metabolomik ve glikomik gibi önemli araştırmalarda cis-diol biyomolekülleri hedef bileşikler olmasıyla birçok biyolojik süreçte hayati rol oynamaktadırlar. Özellikle glikoproteinler bağışıklık sistemin hücre içi ve hücre dışı sinyalinde, sperm-yumurta etkileşimi, ayrıca a-fetoprotein (AFP), karsinoembriyonik antijen(CEA) ve prostata özgü antijen (PSA) gibi birçok glikoprotein biyomarker olarak rutin klinik hastalık teşhislerinde kullanılmaktadır [11,18-20].



Şekil 2.4. Borik asit ve cis-diol içeren bileşikler arasındaki etkileşimin şematik gösterimi [11].

Şekil 2.4.'te cis-diol içerikli bileşiklerin borik asit ile etkileşimi verilmiştir. Ortamın pH değeri borik asidin pKa değerinden yüksek olması durumunda borik asidin hidrolizine sebebiyet verir. Bunun sonucunda borik asit hibridizasyonu sp² (trigonal eş düzleminden)'den negatif yüklü borik asit sp³ (tetragonal) hibridizasyonuna geçiş yapar. Borat anyonu analitin cis-diol grubu ile reaksiyona girerek (genelde beş veya altı) halkalı ester oluşturmaktadır. Ortam çözeltisinin pH değerini düşürdüğümüzde asidik ortamda cis-diol ve borik asit arasındaki bağlar kopar ve cis-diol bileşiğinin

elüsyonu gerçekleşir. Analitin elüsyonunu sağlamanın bir diğer yolu desorpsiyon çözelti ortamına sorbitol gibi yüksek miktarda diol grubu içeren molekül eklenmesidir [11,20,21].

Borat affinite kromatografisi sisteminde borik asit taşıyıcı ligand olarak VPBA (pKa; 8.8) ve ABPA (pKa; 8.2) daha yaygın olarak kullanılmıştır. VPBA hidrofobik benzen halkasına ve hidrofilik/iyonize olabilen borik asit grubuna sahip olup cis-diol grubu barındıran sakaridler, RNA, nükleosidler, glikoproteinler ve glikopeptidler gibi molekülleri yakalamak için fonksiyonel monomer görevini üstlenmektedir [22-25]. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada poli(GMA-co-EDMA) ve poli(GMA-co-VPBA-co-EDMA) monolitleri karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda VPBA ligandı ile sentezlenen monolit protein ve küçük moleküller için daha iyi seçicilik ve daha büyük verimlilik gösterdiği gözlemlenmiştir[22]. Liu ve grubu tarafından yapılan çalışmalarda [22,23,25-27,] nükleosid ve glikoprotein yakalamak için borat affinite monolitler sentezlenmiştir. Analit ve borat fonksiyonel gruplu monolit arasında intermoleküler etkileşimler, affinite dışında ters fazda, katyon-değişimi ve hidrojen bağ etkileşimlerinde gözlenebilir [22,23,28-30].

2.3. Kolon Teknolojisi

Geçmişten bugüne, kromatografik verimliliği arttırmaya yönelik olarak, yeni seçici materyallerden daha küçük parçacık boyutuna sahip sorbent materyallerin sentezlenmesine kadar farklı alanlarda çok fazla yatırım yapılmıştır. Çok yüksek basınçlı pompalar ve bu basınca dayanabilen sabit fazların geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalar, kromatografik yöntemlerin gelişmesine büyük katkı sağlamıştır. Malzeme bilimi alanındaki çok sayıda önemli gelişmeler, hem partikül teknolojisi hem de monolitik sabit fazların geliştirilmesine ve düşük basınçlar kullanarak daha iyi ayırma verimliliği elde edilmesine imkan sağlamıştır [6].

2.3.1. Monolitik Kolon Tasarımı

Son yıllarda kapiler sıvı kromatografi (CLC) ve kapiler elektrokromatografi (CEC) monolitik sabit fazların göstermiş oldukları düşük geri basınç, hızlı kütle transfer kinetiği, yüksek yükleme kapasitesi ve kolay hazırlama yöntemi ile kromatografi alanında dikkatleri üzerine çekmiştir [22,31-33].

Monolitik kolonları kimyasal yapılarına bağlı olarak organik monolitik kolonlar ve silika bazlı monolitik kolonlar olarak sınıflandırılabilir. Organik polimerik monolitler, biyouyumluluk, pH ve kimyasal kararlılık gibi avantajlara dayalı olarak biyomoleküllerin ayırımında daha fazla kullanılmaktadır. Son yirmi yılda poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid ve polistiren bazlı monolitler geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır [22,34-39]. Ancak bu tür monolitik sabit fazlar kromatografik analiz sırasında mobil faz görevini üstlenen organik çözücüler ile temasa girdiğinde monolitte şişme ve/veya büzülme meydana gelmekte, bu da yapının gözenekliliğinin değişimine neden olmaktadır. Böyle bir durum bu tür monolitlerin zayıf mekanik dayanıklılığa sahip olduğunu gösterir ve beraberinde düşük kromatografik analiz tekrarlanabilirliğini sağlar [34,40].

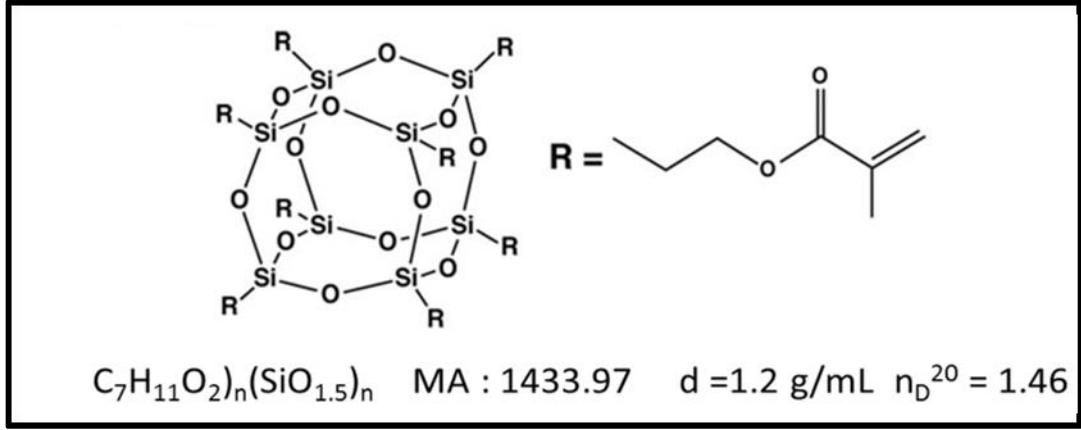
İnorganik silika-bazlı monolitik kolonlar kromatografik analiz sırasında mobil faza karşı iyi dayanıklılık ve iyi bir mekanik stabilite sergiler. Düzgün mezogözenekli yapıya sahip silikalı monolitlerde artan alıkonma faktörüne bağlı olarak kolon veriminin azalması problemi yoktur. Ancak buradaki dezavantaj silika-bazlı monolitlerin sentez yönteminin zor olması, yüzeyini fonksiyonalize etme işleminin uzun zaman gerektirmesi ve monolitin kuruması esnasında kolon çeperlerinden ayrılıp toplanma ve ayrılması veya çatlamasıdır [34,41]. Silika monolitik kolonlar düşük kimyasal dayanım ve kısa sürede monolitin kolon duvarından ayrılması gibi sorunlar oluşturmaktadır. Bu sorunların giderilmesi amacıyla araştırmacılar yeni çözümler arayışlarına yönelmiş ve organik polimer monolitler ve silika monolitlerin avantajlı yönlerinin birleştiği organosilikon bazlı hibrid monolitler geliştirilmiştir [44-44].

2.3.2. Monolitik Hibrid Kolon

Yapılmış olan birçok çalışmada organik-silika hibrid monolitler geniş pH (1-11) aralığındaki dayanıklılık, mekanik stabilite ve iyi geçirgenlik özellikleri sayesinde sabit faz kullanımında bilimsel araştırmacıların ilgi odağı olmuştur [31-33,46,47].

İlk kez 2010 yılında Hanfa Zou ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada, kapiler elektrokromatografi ve mikro-sıvı kromatografi sistemlerinde, POSS-MA, serbest radikal polimerizasyonu mekanizması ile organosilikon monolitik sabit fazlarda temel çıkış materyali olarak kullanılmıştır [32]. POSS (Polihedral Oligomeric

SilseSquioxan) $(R\text{SiO}_{3/2})_n$ ($n=8,9,10$) moleküler formülüyle nanoboyut mertebesinde kafes yapısına sahip hibrid (organik-silika) kimyasında bir moleküldür [33,47]. Monolitik çözelti içinde çözünebilir olması, geniş pH aralığına, yüksek sıcaklıklara ve oksidasyona karşı dayanıklı olması POSS'u hibrid monolitlerin sentezinde avantajlı kılmaktadır [32,33,48]. Tez çalışmasında ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan POSS-MA ise polihedral moleküler kafes yapısına sahip 10 metakrilat birimi içermektedir.



Şekil 2.5. Metakrilat bağlı polihedral oligomerik organosilikon kafes formu(silse-squioxane) (POSS-MA) ($n=8$ formu örneklenmiştir).

Termik proses ve hidroksilasyon gibi birçok reaksiyon prosesi ile malzeme yapımında POSS gözenek oluşturucu, monolitik hibrid çalışmalarında nanoboyutlu çapraz bağlayıcı görevini üstlenerek, gözenekli monolitik yapıların sentezinde kullanılmıştır [47,49,50]. POSS öncülüğünde yeni kimyasal çapraz bağlantı yollarının kullanılması kontrollü ve çok yönlü bir bağlanma şekli ile monolitik yapıda verimli bir bağlantı şekli elde etmemize imkân sağlamaktadır. Moleküler ve makroskopik düzeyde türevlendirilmiş gözenekli materyallerin sentezini mümkün kılan bu yapı, geniş tanımlı materyallere yönelik teknolojik ilerlemeler için, kataliz, kromatografi, membran filtrasyon yöntemleri, nanotıp, katı faz ekstraksiyonu gibi alanlarda çığır açması beklenmektedir [47]. Daha sonraları tekrar POSS varlığında serbest radikal polimerizasyonu [45,50-52], halka-açılım metatez polimerizasyon [33,48,54,55] mekanizması ile hibrid monolitler sentezlenmiştir.

Daha önce yapılmış olan birçok çalışmada gözenekli monolitik yapıların sentezinde, serbest radikal polimerizasyonu kullanıldığında POSS'taki vinil gruplarının düşük reaktivlik sergilediği görülmüştür [47]. Nishang'ın yapmış olduğu bir çalışmalarda,

serbest radikal polimerizasyonu kullanılarak sentezlenen polimerik monolitlerde çapraz bağ yoğunluğunun eşit dağılım göstermediği gözlenmiştir [2-4]. Monolitik yapı içerisinde düşük çapraz bağ yoğunluğu gözlenen bölgeler kromatografik analiz sırasında mobil faz ile temas geçmesi sonucunda jel formunda geçici mikrogözenekliliğe (gel type temporary microporosity) sahip mikro-yapıların oluştuğu ortaya konulmuştur. Bu bölgede, kütle transfer direnci artmakta ve bunun sonucunda yapıda durgun bölgeler (stagnant mass transfer zone) oluşmaktadır. Böyle bir durumda sabit fazdan analitlerin ayrılması (elüsyonu) zor olup, analiz süresinin uzamasına ve bant genişliğinin artmasına sebebiyet verir. Buda, kolon ayırma veriminin artan alıkonma süresine bağlı olarak düşmesine (retention-dependent column performance) neden olur. Bu problem ilk kez Nishang tarafından yapılan ters faz kromatografisi modundaki çalışmalarında ortaya konulmuştur [2,56]. TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında laboratuvarımızda yürütülen polimerik hidrofilik etkileşim kromatografisi modunda çalışılarak, polimerik monolitler sentezlenmiş ve sonuç itibariyle aynı davranış sergilendiği görülmüştür [5,56]. Bu sorunların giderilmesi amacıyla araştırmacılar yeni çözümlere yönelmiş ve organosilikon bazlı hibrid monolitler geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kolon tek basamakta serbest radikal polimerizasyonu kullanılarak ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kolon ise tiyol-en reaksiyonu ile tek basamaklı bir mekanizma ile sentezlenmiştir. POSS-MA'nın 10 metakrilat grubuna sahip olması çapraz bağlayıcı ajan görevini üstlenerek monolitin yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip olacak şekilde sentezlenmesini sağlamaktadır. Yüksek çapraz bağ yoğunluğu ile mikrogözenekli yapı oluşumu engellenerek, nano-sıvı kromatografi sisteminde "analit alıkonma süresinden bağımsız ayırma performansına" ulaşılması amaçlanmıştır.

2.3.3. Çok Modlu Monolitik Hibrid Kolon

Hidrofobik yapıya sahip monolitik sabit fazlarla ters faz kromatografisinde yüksek polariteye sahip analitlerin ayrımı ve polar monolitik sabit faz ile hidrofobik analitlerin ayrımının zor olmasıyla çok modlu monolitik hibrid monolitler geliştirilmiştir. Çoklu mod, hidrofilik/hidrofobik etkileşime ek olarak hidrojen bağı, π - π , elektrostatik etkileşime imkân vererek tek bir monolitik kolonda hidrofobik, polar ve hatta yüklü analitlerin ayrımını sağlayabilmektedir [46]. Bugüne kadar çoklu mod sabit fazların

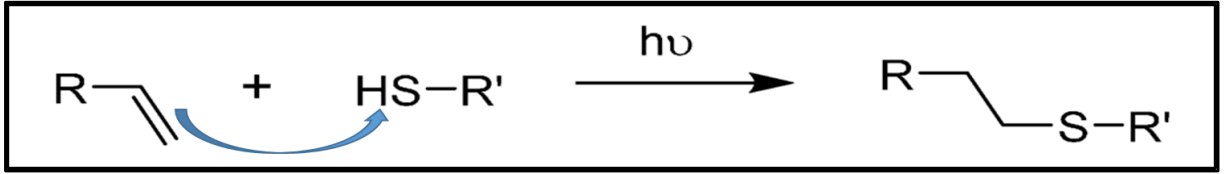
hazırlanmasında genelde iki polimerizasyon mekanizması kullanılmaktadır. Glisidil metakrilat içeren hibrid monolitler polimerizasyon sonrası fonksiyonel grupların bağlanabildiği yapılara örnektir. Buradaki epoksi grubu oldukça reaktif olması nedeniyle dietilamin, etilendiamin, poli(etilenimin), sodyum sülfat, sülfürik asit gibi bileşiklerle reaksiyona girerek yapıya hidrofobiklik/hidrofiliklik/iyon değişim özellikleri kazandırmaktadır [22]. Guanasena ve Rassi hidrofilik poli(gliserilmetakrilat-co-PETA) monolitik yüzey üzerine diol grupları sayesinde anti-haptoglobin antikorunu aşılama ve böylece hedef proteine karşı iyi bir seçicilik gösteren immunoafinite monolitik kolonu oluşturmuştur [42,57]. Polimerizasyon sonrası fonksiyon grupların bağlanması yöntemi monolitın gözenekliliğini ve yüzey kimyasının optimizasyonunda avantaj sağlasa da, çok aşamalı olması uzun zaman gerektirir, fonksiyonel grupların miktarının kontrolü zor olması nedeniyle düşük aşılama verimi verebilir ve aynı zamanda polimerin şişmesine ve monolitik geçirgenliğin düşmesine sebebiyet verir [22,46,59].

Çoklu-mod fonksiyonlu monolit oluşturmanın diğer bir yolu çok fonksiyonlu monomer ve çapraz bağlayıcının kopolimerizasyon yöntemidir. Xie'nin grubu kopolimerizasyon yöntemini kullanarak iyonize edilebilen değişik monomer ve hidrofilik çapraz bağlayıcı olan PETA ile bir dizi hidrofilik/katyon değişim görevi yapan polimerik monolitler sentezlemişlerdir [22,23,60], buna ek olarak hidrofilik/anyon değişim görevi yapan polimerik monolitler de sentezlenmiştir [59]. Bu monolitler polar-nötr ve yüklü çözeltilerin ayırımında yüksek performans göstermişlerdir. Ancak PETA'nın hidrofilik olmasına bağlı olarak yüksek hidrofobikliğe sahip moleküllerin ayırımında pek etkili olamadığı da ayrıca görülmüştür [22,35]. Bu nedenle hidrofobik, hidrofilik ve ion-değişim etkileşimi aynı anda gösterebilen başka çoklu-mod monolitlerin sentezlenmesine ihtiyaç duyulmuştur. Buna binaen bu tez çalışmada tiyol-en kimyasıyla tek basamaklı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon sentezlenerek kapiler kolon kromatografisinde sabit faz olarak kullanımı önerilmiştir.

2.3.4. Tiyol-En Kimyası

Birçok makalede monolitik kolonlara ait değişik hazırlama yöntemlerinin geliştirildiği, değişik özelliklerin keşfedildiği ve buna bağlı olarak değişik uygulamaların yayınlandığı görülmüştür [22,59,62]. Bu tez çalışması kapsamında serbest radikal

polimerizasyonuna ek olarak tiyol-en kimyası kullanılmıştır. “Click” kimyasının bir kolu olan tiyol-en kimyası 1905 yılından itibaren literatürde yer almıştır [63]. İlk kez Barry Sharpless tarafından öne sürülen “Click” kimyası elverişli reaksiyon koşullarında iyi bir seçicilik ve ikincil reaksiyonlara imkân vermeyerek yüksek verim sağlayan bir kimyasal bağlanma mekanizmasıdır. Ayrıca reaktantların kolayca bağlanmalarını sağlayıp reaksiyon süresinin düşmesine, çeşitli fonksiyonel gruplara olanak sağlamasına ve değişik çözücüler varlığında mekanizmanın etkilenmemesine imkân vermektedir [44,47,54]. Tiyol-en kimyası, tiyol grubu, karbon-karbon çift bağı ve uygun bir katalizör varlığında gerçekleşir. Katalizör serbest radikal üretebilen bir foto başlatıcı veya bir termal başlatıcı olabilir. Tiyol grubu karbon-karbon çift bağına atak yaparak olefinik hidrokarbonun tiyol bileşiğinin alkil grubuna bağlanmasını sağlar. [63,64].



Şekil 2.6. Tiyol-en kimyasının mekanizması.

Yapmış olduğum tez çalışmada tiyol grubunu içeren bileşik tarafımızca sentezlenen organosilikon kapiler monolitlerde kromatografik ligand görevi görmektedir.

Son yıllarda hibrid organosilikon formundaki kapiler monolitlerin sentezi üzerine tiyol-en kimyası kullanımı ile birçok çalışma yapılmıştır. Organik monomerlerin tiyol grubu içeren ligandlar ile bağlanması prensibiyle sentezlenen monolitlerde, çapraz bağ yoğunluğunun artmasıyla analistler ile sabit faz arasındaki kütle transfer direncine neden olan jel formundaki bölgelerin oluşumu engellenmektedir. Ayrıca laboratuvarımız tarafınca yürütülen 1001 Projesi'nde tiyol-en kimyası kullanılarak sentezlenen hibrid monolitik yapıya değişik fonksiyonel grupların takılmasının kolaylığı gözlemlenmiştir [56].

Bağlama birimine bağlı olarak çapraz bağlayıcı POSS varlığında tiyol-en kimyası ile değişik kimyasal (hidrofilik veya hidrofobik) ve fiziksel (jelimsi veya katı-sert malzeme) özelliklere sahip hibrid monolitlerin sentezinin mümkün olduğu görülmüştür [47].

2.4. Kromatografik Elüsyon Modları

Kromatografik analizde analitlerin elüsyonu hareketli ve sabit faz arasındaki etkileşime bağlı olmasıyla daha iyi bir analiz verimi için bu etkileşimlerin ayarlanması hareketli fazın farklı şekillerde uygulanmasıyla mümkün olabilir. Kromatografik analizlerde hareketli faz, izokratik ve gradient olarak kullanılabilir.

İzokratik Uygulama: Hareketli fazın bileşimi analiz boyunca değişmemekte, böylece bütün analitler tek bir çözücü ile aynı anda, farklı hızlarda sabit faz üzerinden sürüklenmektedir [13].

Gradient Uygulama: Gradient mod analiz süresinin tamamı içerisinde hareketli fazın bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değişir. Bunun sonucunda hareketli fazın pH değeri, kolon basıncı, kolon sıcaklığı gibi bazı elüsyon koşullarının da sürekli değişmesine neden olup daha verimli analit ayırımı elde etmemizi sağlar [12].

2.5. Kromatografik Performans Parametreleri

Kromatografik performans parametreleri kromatografik analiz sonucunda analitlerin alıkonma sürelerinin ve kromatografik kolon performansının değerlendirilmesi için kullanılan boyutlu ve boyutsuz faktörlerdir.

2.5.1. Alıkonma Faktörü

Alıkonma faktörü, kolon uzunluğu, akış hızı, partikül çap boyutu ve sabit faz gözenekliliğinden bağımsız olarak, sadece hareketli fazın kompozisyonuna ve sabit fazın polaritesine bağlı olarak, hareketli faz ile kolona ulaşan analitin sabit faz ile göstermiş olduğu etkileşim süresini ortaya koyan boyutsuz bir parametredir. Bundan yola çıkarak belirli analiz koşulları altında her analit için alıkonma zamanı (retention time t_R) belirlenmektedir. Aşağıda verilen Eşitlik 2.1 ile Alıkonma faktörü hesaplanmaktadır [66].

$$k=(t_R-t_0)/t_0 \quad (2.1)$$

t_R : herhangi bir analitin kolon içerisinde alıkonma süresi, t_0 : sabit faz ile etkileşime girmeyen referans olarak kullanılan analitin kolon içerisindeki alıkona süresi, aynı zamanda “kolonun ölü zamanı” olarak bilinir.

k'nin 1.5 ve 4 arası değerler alması iyi bir kromatografik performansı gösterir. 1.5' in altında olması pik çözünürlüğün kötü olması, 4'ün üstünde olması ise analitleri kolonu geç terk ettiği ve analiz süresinin uzadığı anlamına gelmektedir [9].

2.5.2. Teorik Kademe Yüksekliği (h) ve Teorik Kademe Sayısı (N)

Teorik kademe yüksekliği (h), teorik kademe sayısı (N) ters orantılı olup, iyi kolon verimi için teorik kademe yüksekliğini küçültmemiz gerekir, buda daha kısa sürede daha iyi ayırım anlamına gelir. Teorik kademe yüksekliği Eşitlik 2.4 ile ifade edilmiştir [9,66].

$$h = (L / N) \quad (2.3)$$

Burada h, kademe yüksekliği, L ise kolon boyudur.

Teorik kademe sayısı (N) kolon verimliliğini ve kromatografik analiz sisteminde kolonun performansını ifade eden bir parametredir. Aşağıda verilmiş olan Eşitlik 2.2 ile hesaplanmaktadır.

$$N=5.54 \times (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.2)$$

t_R : analitin alıkonma süresi, $W_{1/2}$ ise pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğidir.

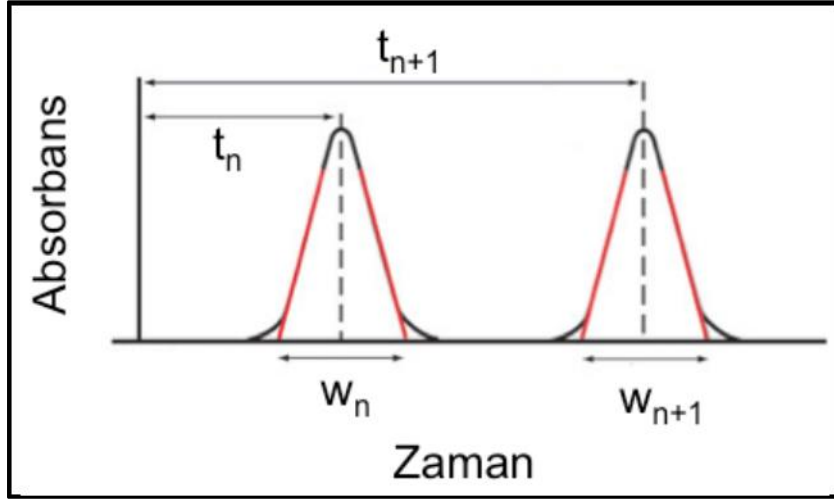
Kolonun teorik kademe sayısının yüksek oluşu kolon performansının iyi olduğunu gösterir, ayrıca kolon uzunluğunun artmasıyla teorik kademe sayısı da artmaktadır [66].

N ve h'nin değerleri kolon boyutu, partikül boyutu, analiz sıcaklığı ve basınç gibi kromatografik analiz koşullarına bağlıdır [66].

2.5.3. Pik çözünürlüğü

Kromatografik analiz sırasında ardışık gelen iki pikin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığını gösteren bir parametredir. Hesaplama şekli Eşitlik 2.4.' te gösterildiği gibidir.

$$R= 2 \times [(t_{n+1}) - (t_n)] / (W_{n+1} + W_n) \quad (2.4)$$



Şekil 2.7. Kromatografik analiz sırasında ardışık gelen iki pikin çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan parametrelerin gösterimi.

Burada n ve n+1 ardışık iki analite ait iki pik olup t_n ve t_{n+1} onların alıkonma süreleridir. W_n ve W_{n+1} ise n ve n+1 piklerin taban genişliğidir. İyi bir kromatografik pik çözünürlüğü için $R \geq 1.5$ olması istenmektedir [66].

2.5.4. Geçirgenlik

Kromatografik analiz sırasında sabit fazın akışa karşı göstermiş olduğu direnç kolon geçirgenliği olarak tanımlanabilir. Yüksek kolon basınçları geçirgenliğin düşük olduğunu gösterir.

$$v = \frac{\Delta P * K_0 * r^2}{\eta * L} \quad (2.5)$$

Burada v (m³/s); hareketli fazın akış hızı, K_0 (m²); kolon geçirgenliği, η (Pa.s); hareketli fazın viskozitesi, L (m); kolon uzunluğunu, ΔP (Pa); kolonun geri basıncı ve r (m); kolonun iç çapıdır [9,66].

2.5.5. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik kromatografik analiz çalışmalarında aynı şartlar altında alınmış olan verilerin değişimini gösteren bir parametredir. Kromatografik sistemin kendisine, dolgu materyallerin sentezine ve diğer analiz koşullarına bağlı olarak tekrarlanabilirlik analizlerinde farklı sonuçlara ulaşılabilir. Tekrarlanabilirlik, aynı koşullar altında sentezlenen kolondan kolona tekrarlanabilirlik ve analiz

tekrarlanabilirliği (aynı gün içerisinde veya günden güne tekrarlanabilirlik) farklı günlerde yapılabilir. Tekrarlanabilirlik Eşitlik 2.6, 2.7 ve 2.8 yardımıyla hesaplanabilmektedir [9].

$$RT_n = \frac{\sum N_i RT_i}{\sum N_i} \quad (2.6)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (RT_i - RT_n)^2}{(\sum N_i - 1)}} \quad (2.7)$$

$$\% \text{ BSS} = \frac{SD}{RT_n} \quad (2.8)$$

Bağıl Standart Sapma (BSS), tekrarlanabilirliği ifade eden bir terim olup, değerin %4'n altında olması durumunda iyi bir tekrarlanabilirliğin göstergesidir. Burada RT_n ; belirli bir analit ile farklı analizler için elde edilen sayıca ortalama alıkonma süresi, BSS; bağıl standart sapma, SD; standart sapma, RT_i ; i no'lu analitin alıkonma süresi, N_i ise analiz sayısıdır [9].

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında farklı kullanım amaçlı, 4-merkaptofenilboronik asit (MPBA) ve 4-vinilfenilboronik asit (VPBA) bağlı yeni oligomerik silseskuioksan bazlı monolitler sentezlenmiştir. Kolonların silanizasyon işlemi, polimerizasyon çözeltisinin hazırlanışı ve kolona doldurulması, polimerizasyonu, monolitik kolonun analiz performansının değerlendirilmesi ve monolitik kolonların karakterizasyonu olmak üzere çalışma beş aşamada gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler hibrid monolitik kolon nano-sıvı sisteminde çoklu ayırım için kullanılmış, kromatografik performansı değerlendirilmiştir. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hidrofobik organosilikon monolit sayesinde, tek kolon kullanımı ile nano-sıvı kromatografisi sisteminde apolar yapıya sahip PAH ve alkilbenzenlerin ters faz kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC) modunda ayırımı ve anilinlerin hidrofobik etkileşim/katyon değişimi kromatografisi modunda ayırımı yapılmıştır. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monoliti sentezlenerek affinite kromatografisi tekniği ile β -NAD ve ovalbumin izolasyonu yapılmıştır.

3.1. Materyal

Monolit sentezinde ana monomer ve aynı zamanda çapraz bağlayıcı görevini üstlenen monomer, 10 metakrilat birimi içeren polihedral oligomerik silseskuioksan (POSS-MA) Hybrid Plastics, ABD firmasından temin edilmiştir. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit sentezinde kullanılan 4-merkaptofenilboronik asit (MPBA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitin sentezinde ligand olarak kullanılan VPBA Sigma-Aldrich ABD firmasından alınmıştır. Termal polimerizasyonda başlatıcı görevini üstlenen 2,2'-Azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN) Glentham LSL. İngiltere firmasından, fotopolimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan 2,2-Dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPA) ise Aldrich Chem. Co. WI firmasından alınmıştır. Monolitik yapıda gözenek yapıcı sistem görevi gören makro gözenek yapıcı etilen glikol ve mikro gözenek yapıcı n-bütanol Sigma-Aldrich ABD, firmasından temin edilmiştir. Monolitik kolonların sentezinden sonra safsızlıklardan kurtarmak amacıyla kullanılan saf etanol (EtOH) Merck AG Almanya firmasından, kromatografik çalışmalarda mobil faz çözeltilerini hazırlamak için kullanılan asetonitril (ACN)

yüksek saflıkta (HPLC grade) ve formik asit Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışında kullanılan fosfat tampon tablet (PBS) ve affinite kromatografi tekniği için adsorpsiyon tampon çözeltisinde kullanılan HEPES Sigma-Aldrich ABD firmasından temin edilmiştir. Affinite kromatografisinde desorpsiyon tampon çözeltisini hazırlamada kullanılan di-sodyum tetraborat BDH, İngiltere firmasından alınmıştır. Nano-sıvı kromatografisi sisteminde ters faz kromatografisi analizlerinde kullanılan naftalin, floren, fenantren, floranten, benzen, toluen Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Etilbenzen, propilbenzen ve bütilbenzen ise Merck AG, Almanya firmasından temin edilmiştir. Hidrofobik/katyon değişimi kromatografisinde kullanılan o-fenilendiamin, n-metilanilin, 1-naftilamin ve n-etilamin ve affinite kromatografisinde kullanılan ovalbumin ve β -NAD Sigma-Aldrich ABD firmasından ithal edilmiştir. Silanizasyon işleminde monoliti kolon duvarına bağlama görevi gören 3-trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM), toluen ve hidroklorik asit (HCl) Sigma-Aldrich ABD firmasından, sodyum hidroksit (NaOH) ise Riedel de Haen, Almanya firmasından temin edilmiştir. İç çapı 100 μ m ultraviyole (UV) geçirgen kapiler kolonlar ve iç çapı 300 μ m olan poliimid termal kolonlar Polymicro Technologies, ABD firmasından alınmıştır. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun performans değerlendirilmesi, Ultimate 3000 Nano-LC kromatografi sisteminde (Dionex Technologies, Münih, Almanya) yapılmıştır.

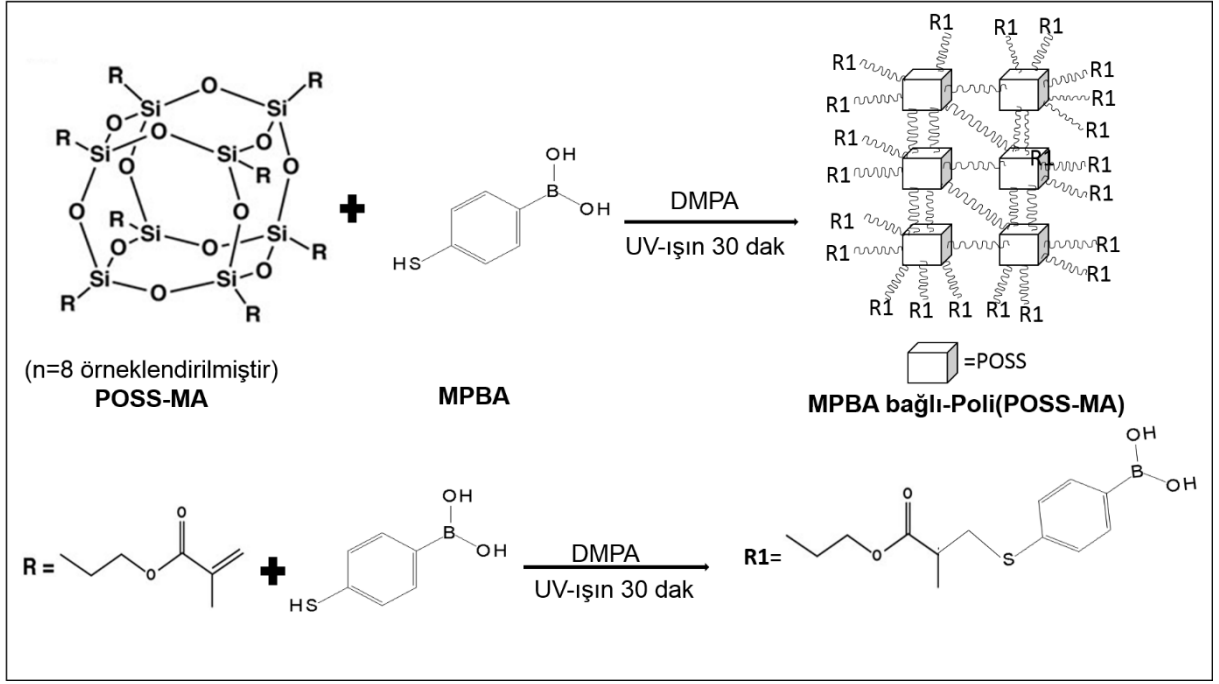
3.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Fotopolimerizasyon ve Tiyol-en Kimyası ile Sentezi

Tez çalışmasında “analit alıkonma süresinden bağımsız ayırma performansına” ulaşılması amaçlandığı için, mikrogözenekli formda jelimsi yapı oluşumunu engellemek için çapraz bağ yoğunluğunu artırma arayışıyla tiyol-en kimyasına başvurulmuştur. Böyle bir yapıya sırf “serbest radikal polimerizasyonu” ile ulaşmak mümkün olmadığından tiyol grubu içeren ligand (MPBA), çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA varlığında tiyol-en reaksiyonu ile monolitik yapıya bağlanmıştır. Böylece tek basamakta MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapı ilk kez bu tez çalışması kapsamında sentezlenmiştir.

Monolitik çözelti 10x75 mm'lik cam deney tüpü içerisinde hazırlanarak insülin şırıngası ile UV-geçirgen kolona basılmakta, ardından UV lambası altında monolitin kolon içerisinde polimerleşmesi sağlanmaktadır. Cam deney tüpü içine öncelikle gözenek yapıcı sistemi oluşturan bileşikler, n-bütanol (mikro gözenek yapıcı, 430 µL) ve etilen glikol (makro gözenek yapıcı, 70 µL) konulmakta ve çözelti homojen hale gelene kadar vortekslenmektedir. Kolon içerisinde homojen polimerleşme elde etmek amacıyla UV-başlatıcı, monolitik çözeltiye en son ilave edilmektedir. Gözenek yapıcı karışımından 100 µL alınmakta ikinci bir cam deney tüpüne konulup bu tüpte UV-başlatıcı olan dimetoksifenilasetofenon (DMPA, 7 mg) çözülmemektedir. DMPA'nın ışıktan etkilenmemesi için bu aşama ve sonraki aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirilmektedir.

İşlemden önce tüpe hem monomer hem çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA (150 mg) eklenir, çözünene kadar vortekslenir, sonra MPBA (50 mg) ilave edilir, tekrar homojen bir çözelti elde edene kadar vortekslenir. En sonunda, iki cam deney tüpünün içindeki karışımlar birleştirilir, karışım homojen hale gelene kadar vortekslenir ve sonuklenir. Monolitik çözelti insülin şırıngasına alınarak, iç çapı 100 µm olan UV-geçirgen kapiler kolon monolitik çözelti ile doldurulur. Kolonun uçları septum ile kapatılır ve sonrasında UV-lamba altında, homojen polimerleşmeyi sağlamak amacıyla ayarlanan bir döner mekanizma üzerinde 30 dakikada monolitik çözeltinin kolon içinde polimerleşmesi sağlanır. Böylece hem hibrid monolitin sentezi hem de monolitin üzerine ligandı bağlama işlemi tek basamakta, fotopolimerizasyon ve tiyol-en kimyası ile gerçekleşmiş olur.

Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitin sentezinde ana monomer ve aynı zamanda çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA'nın metakrilat gruplarındaki karbon-karbon çift bağının, ligand görevini üstlenen MPBA üzerindeki tiyol grubuna atak yapmasıyla (tiyo-en kimyası) yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip hibrid monolit sentezlenmiştir.



Şekil 3.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin fotopolimerizasyon ve tiyol- en kimyası ile sentezi.

Polimerizasyonu gerçekleştiren MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kolon nano-sıvı kromatografisi sisteminde çoklu modda performans değerlendirilmesine tabi tutulmadan önce, ışık mikroskobu ile kolonların monolitik yapısı incelenmiştir. Homojen polimerleşmeye sahip tek parça halinde bir yapı gözlenmesi amaçlanmıştır. Son olarak kolon içindeki kirliliği ve polimerleşmeyen yapıları uzaklaştırmak için kolon 2 saat saf etanol ile 1 $\mu\text{L}/\text{dak}$ akış hızında yıkanmıştır.

3.3. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Termal Etki Eşliğinde, Serbest Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi

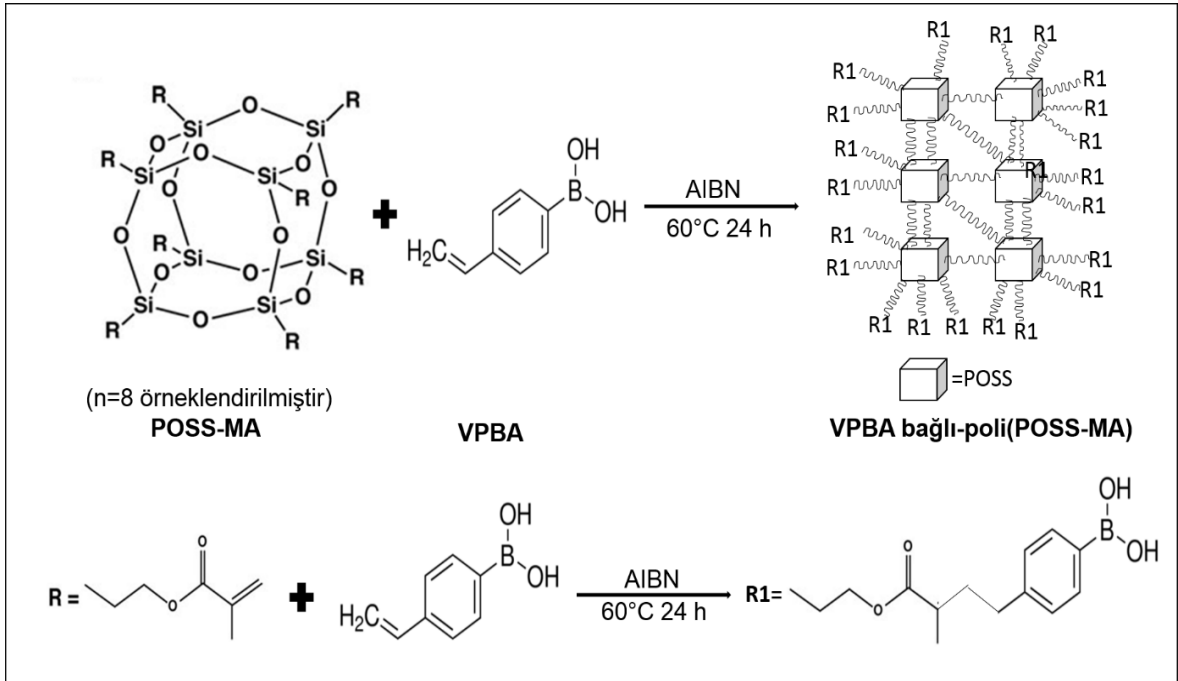
VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolit literatürde bulunmamaktadır, ilk kez bu tez çalışması kapsamında sentezlenmiştir. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin sentezinde ana monomer ve çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA'nın içerdiği 10 metakrilat grubu sayesinde termal etki eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile yüksek çapraz bağ yoğunluğuna ulaşılması ve affinite kromatografisi tekniği ile β -NAD ve ovalbuminin analizinde yüksek izolasyon verimi eldesi amaçlanmıştır. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin sentezinde olduğu gibi, VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolit sentezi de üç aşamada

gerçekleşmiştir. Monolit çözeltisi cam deney tüpü içinde hazırlanıp, şırınga ile termal kolona basılır ve su banyosunda 60°C, 24 saat polimerleşir. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolit sentezinde polimerizasyonun termal yolla gerçekleşmesine bağlı olarak ortam sıcaklığına dikkat edilmesi gerekmektedir. Monolit çözeltisi, gözenek yapıcı sistem bileşenlerini, n-bütanol (mikro gözenek yapıcı) ve etilen glikol'ü (makro gözenek yapıcı) 10x75 mm'lik cam deney tüpü içerisine konularak hazırlanmaya başlanır. Çözelti homojen oluncaya dek vortekslenir. Başlatıcıyı ayrı bir cam deney tüpünde çözmek için 100 µL gözenek yapıcı sistem bileşeni karışımından alıp ikinci bir cam deney tüpüne konulur. Bu tüpe termal başlatıcı olan AIBN eklenir ve vortekslenip çözünür. Birinci cam tüpe ana monomer ve aynı anda çapraz bağlayıcı görevinde olan POSS-MA eklenir, vorteks ve sonikasyon ile çözünür, ardından VPBA ligandı ilave edilir ve çözelti tekrar homojen hale getirilir. Son olarak birinci cam deney tüpünün içindeki monolitik karışım çözeltisi ikinci cam deney tüpüne alınır. İkisi beraber çözünür, ardından vakit kaybetmeden monolit çözeltisi insülin şırıngasına aktarılır ve iç çapı 300 µm olan kapiler termal kolona basılır. Monolit çözeltisi kolonun içinde kalacak şekilde kolonun iki ucu septum ile kapatılıp su banyosunda 60°C, 24 saat polimerleşmeye bırakılır.

Çizelge 3.1. Farklı VPBA derişimlerinde termal etki eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitlerinin sentez koşulları (Sıcaklık: 60°C, Polimerizasyon süresi: 24 saat).

Kolon Kodu	POSS-MA (mg)	VPBA (mg)	n-bütanol (µL)	Etilen Glikol (µL)	AIBN (mg)
VPBA 0	150	0	711	289	10
VPBA 20	150	20	711	289	10
VPBA 40	150	40	711	289	10
VPBA 50	150	50	711	289	10
VPBA 60	150	60	711	289	10
VPBA 80	150	80	711	289	10

VPBA'nın affinite kromatografisi tekniği ile β -NAD ve ovalbuminin izolasyonundaki etkisinin incelenmesi amacıyla Çizelge 3.1.' de belirtirildiği gibi değişik VPBA derişiminde VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonlar sentezlenmiştir. Monolitik yapının kolon içerisinde polimerleşmesinden sonra, kolonların iç yapısı ışık mikroskobu ile incelenir. Kolon içerisinde kirlilikleri uzaklaştırmak için kolonlar saf etanol ile 5 μ L/dak akış hızında 6 saat yıkanır. Şekil 3.2.' de termal başlatıcı AIBN varlığında ve uygun fiziksel koşullar altında (60°C, 24 saat) VPBA'daki fenil grubunun dördüncü pozisyonundaki karbonuna bağlı olan vinil grubu ve POSS-MA molekülündeki metakrilat grubu arasında gerçekleşen serbest radikal polimerizasyonu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin termal etki eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezi.

Şekil 3.3.'de VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin termal polimerizasyonunda kullanılan su banyosu ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid monolitinin polimerizasyonunda kullanılan UV kaynağı ve döner tabla mekanizması gösterilmektedir.



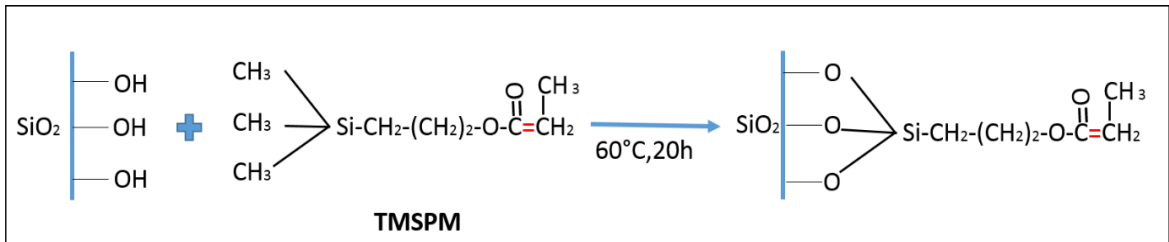
Şekil 3.3. Polimerizasyon sistemleri. (A) VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların su banyosunda polimerizasyonu. (B) MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun UV-ışını altında polimerizasyonu.

3.4. Kolonların Silanizasyon İşlemi

Kolona verilen akış hızının artmasına bağlı olarak kolonun geri basıncında artma olur. Yüksek basınçlar monolitik yapıda, mekanik zedelenmelere hatta monolitik yapının kapiler kolonun içinden çıkmasına sebebiyet verebilir. Bu tür problemleri ortadan kaldırmak amacıyla monolitik çözeltiyi kapiler kolona basmadan önce kolonlar silanizasyon adı verilen bir ön işlemde geçirilmektedir. Bu işlem monolitik çözeltinin kapiler kolonun çeperlerine iyice tutunmasını sağlamaktadır. Öncelikle kapiler kolon çeperleri üzerine -OH gruplarının oluşması sağlanır ve sonrasında -OH gruplarına karbon-karbon arası çift bağ bulunduran bir molekül takılır. Böylece, kolona doldurulan monolit çözeltisindeki monomerler bu çift bağ ile reaksiyona girerek kolon çeperlerine kovalent formda bağlanır ve yüksek basınçlara dayanıklı güçlü bir monolitik yapı elde edilir [67].

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların silanizasyon işleminde 36 saat süren bir prosedür uygulanmıştır. Silanizasyon işleminde monolit sentezi yapılacak uzunlukta kolon kesilerek uygun ara parçalar yardımıyla kolon şırıngaya bağlanır ve şırınga pompasına takılır. İlk basamakta kapiler kolon içerisinden 25 µL/dak akış hızında, 120 dakika 1 M NaOH çözeltisi

geçirilir. Ardından kolonun iki ucu septum ile kapatılarak NaOH çözeltisi kolon içerisinde 1 saat stabil kalacak şekilde bekletilir. Sonrasında 30 dakika, 25 µL/dak akış hızında distile-deiyonize su ile kolon yıkanır. Bu işlemden sonra kapiler kolon içerisinden 30 dakika azot gazı geçirilerek kolon içerisindeki kuruması sağlanır. Bu aşamaya kadar yapılan işlemlerin tümü bir kez daha tekrarlanır. Devamında 25 µL/dak akış hızında, 30 dakika 0,1 M HCl çözeltisi geçirilir, sonra yine içerisinden 20 dakika azot gazı geçirilerek kolon kurutulur. Bu aşamaya kadar yapılan işlemlerin hepsinde amaç kolon iç duvarına -OH gruplarının oluşturulmasını sağlamaktır. Sonraki aşamada kolondan 10 dakika, 25 µL/dak akış hızında toluen geçirilir, devamında 25 µL/dak akış hızında, 10 dk %40 TMSPM ve %60 toluen hacimsel orana sahip homojen bir çözelti kolondan geçirilir. TMSPM'li çözelti kolon içinde kalacak şekilde kolonun uçları septum ile kapatılıp, su dolu bir bebere koyularak su banyosunda 60°C sıcaklıkta, 20 saat süreyle TMSPM'nin 3-trimetoksisil grupları NaOH ile oluşturulan OH gruplarıyla reaksiyona girerek kolon çeperinde metakrilat gruplarının oluşması için bekletilir. Kapiler kolonun çeperlerine kovalent bağlı metakrilat gruplarının yerleştirilmesiyle monolit polimerizasyonu sırasında bu grupların da polimerizasyona katılarak, monolitin kovalent yolla kapiler kolon duvarına bağlanması sağlanacaktır. 20 saat sonunda kolon içindeki kirlilikleri ve polimerleşmeyen yapıları uzaklaştırmak amacıyla, kolon önce 25 µL/dak akış hızında 10 dakika toluen ile yıkanır ve sonrasında 5 dakika azot gazı geçirilerek kolon kurutulur. Bu aşamadan sonra kapiler kolon monolit sentezi için hazır duruma gelmiş olur.



Şekil 3.4. Kapiler kolonun iç çeperindeki hidroksil grupları ve TMSPM'nin metil grupları arasındaki bağlanma.

3.5. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonun Hidrofobik ve İyon Değişimi Modlarında Nano-Sıvı Kromatografisinde Performans Değerlendirilmesi

Tiyol-en kimyasıyla sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ok modlu özellikteki organosilikon monolitik kolonun ters faz kromatografisi modunda ve hidrofobik/katyon değişim kromatografik modlarında performans değerlendirilmesi Ultimate 3000 Nano-LC kromatografi sistemiyle (Dionex Technologies, Münih, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

MPBA hidrofilik bir yapı olmasına rağmen tez çalışmasında sentezlenen monolitik yapıdaki MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler kolonun nano-sıvı kromatografisi sisteminde ters faz kromatografisinde kullanımıyla apolar bileşiklerinin ayırımı yapılmıştır. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kapiler kolon alkilbenzen ve çok halkalı aromatik hidrokarbonların ayırımında kullanılmıştır.

3.5.1.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapı ile Alkilbenzenlerin Hidrofobik Etkileşimi

Hidrofobik etkileşim ile alkilbenzenlerin MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid kapiler kolon ile ayırımında hareketli faz olarak ACN/%0.1 formik asit, analit olarak ise benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen ve bütilbenzen'den oluşan beşli karışım kullanılmıştır. Analizler izokratik ve gradient olarak iki farklı hareketli faz kullanımı modunda yapılmıştır. İzokratik analizde hidrofobik etkileşim için uygun bulunan dalga boyundaki kromatogram dikkate alınarak kolona verilen akış hızının sabit tutulmasıyla, ACN/%0.1 formik asit çözeltisi hacim oranı değişiminin kromatografik performansa olan etkisi incelenmiştir. Sonrasında en iyi ayırmanın gerçekleştiği hareketli faz ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranı sabit tutularak farklı akış hızlarında analiz yapılmıştır. Böylece akış taraması ile akış hızının kromatografik performansa olan etkisi incelenmiştir. İzokratik analizlerin asetonitril taraması 1.0 μ L/dak akış hızında, 50/50 (mL/mL), 45/55 (mL/mL), 40/60 (mL/mL), 35/65 (mL/mL) ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranları ile yapılmıştır. Akış hızı taraması ise 40/60 (mL/mL)

ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranına sahip hareketli faz ile 1.25, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 µL/dak akış hızlarında yapılmıştır. Gradient modda çalışıldığı zaman ise süre taraması ve asetonitril oran taraması yapılmıştır. Gradient modda hareketli faz için iki farklı A ve B haznesi kullanılmıştır. A haznesinden asetonitril B haznesinden ise %0.1'lik formik asit çözeltisi çekilerek, asetonitril oranı farklı zaman diliminde %30'dan %75'e ulaşacak şekilde 20, 30, 35, 40, 45 dakika değerlerinde zaman taraması yapılmıştır. Sonrasında ise zaman sabit tutularak, 30 dakikada %30 ACN'den % 75 ACN'e, %30'dan %65'e, %30'dan %60 a varan asetonitril oranlarının denenmiştir.

3.5.1.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapı Kullanımıyla Çok Halkalı Aromatik Hidrokarbon Bileşiklerin Analizi

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kapiler kolon kullanımı ile toluen, naftalin, fluoren, fenantren ve fluoranten olmak üzere çok halkalı aromatik hidrokarbon (PAH) bileşiklerinin ayırımı hidrofobik etkileşim kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak ACN/%0.1 formik asit çözeltisi kullanılmıştır. İzokratik ve gradient olmak üzere ayırım iki farklı hareketli faz kullanımı modunda yapılmıştır. Alkilbenzenlerde olduğu gibi, burada da izokratik analizde ayırım için uygun dalga boyu seçilerek, aynı akış hızında, ACN/%0.1 formik asit çözeltisi hacimsel oran değişiminin kromatografik performansa etkisi incelenmiştir. En iyi ayırımın gerçekleştiği hareketli faz ele alınarak ACN/%0.1 formik asit çözeltisi hacim oranı sabit tutulmuş, akış hızını değiştirerek analiz yapılmıştır. Böylece akış hızının kromatografik performansa olan etkisi incelenmiştir. İzokratik analizde asetonitril taraması 1.0 µL/dak akış hızında, 50/50 (mL/mL), 45/55 (mL/mL), 40/60 (mL/mL), 35/65 (mL/mL), ACN/su + 50 µL formik asit ile gerçekleştirilmiştir. Akış hızı taraması analizleri ise 45/55 ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranına sahip hareketli faz ile 1.25, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 µL/dak akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Gradient modda ise süre taraması ve asetonitril değişim taraması yapılmıştır. Alkilbenzenlerde olduğu gibi burada gradient modda çalıştığımız zaman A ve B olmak üzere iki hareketli faz haznesi kullanılmıştır. A haznesinden saf asetonitril, B haznesinden ise %0.1'lik formik asit/su çözeltisi çekilerek, farklı zamanlarda asetonitril oranının değişimi %45'ten %60'a gelecek şekilde 20, 30, 40, dakika zaman taraması yapılmıştır. Asetonitril oran taraması ise zaman sabit tutarak, 30 dakikada %45

ACN'den % 60 ACN'e, %40'dan %60'e, %30'dan %55'e ulaşacak şekilde yapılmıştır.

3.5.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik/Katyon Değişim Etkileşim Kromatografisi

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonu, MPBA'nın borik asit grubuna bağlı olarak ve düşük ACN oranında hareketli faz kullanımı ile nano-sıvı kromatografisi sisteminde hidrofobik etkileşim/katyon etkileşim modunda anilinlerin ayırımında kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kapiler kolonu o-fenilendiamin, n-metilanilin, 1-naftilamin ve n-etilanilin' den oluşan dörtlü karışımın ayırımında kullanılmıştır. Analiz izokratik koşullarda gerçekleştirilerek asetonyril taraması, akış taraması ve pH taraması yapılmıştır. Kromatografik analizlerde hareketli faz olarak ACN/10 mM PBS çözeltisi kullanılmıştır. Asetonyril derişim değişiminin kromatografik performansla olan etkisinin incelenmesi için akış hızı 1.0 µL/dak'da sabit tutularak 35/65 (mL/mL), 30/70 (mL/mL), 27.5/72.5 (mL/mL), 25/75 (mL/mL) ACN/10 mM PBS taraması yapılmıştır. En iyi kromatografik ayırım veren hareketli faz belirlenerek bu defa akış taraması yapılmıştır. 30/70 (mL/mL) ACN/10 mM PBS hareketli faz kullanımı ile 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 µL/dak akış hızlarında anilin karışımının analizi yapılmıştır. Son olarak pH'ın kromatografik ayırma olan etkisinin incelenmesi için 1.0 µL/dak akış hızı sabit tutularak, 30/70 (mL/mL) ACN/10 mM PBS hareketli fazın pH değeri 4, 6, 7 ve 8'e sodyum hidroksit (NaOH) veya hidroklorik asit (HCl) ile ayarlanarak kromatografik analiz yapılmıştır.

3.6. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kolonların Borat Affinite Kromatografisinde Performansının Değerlendirilmesi

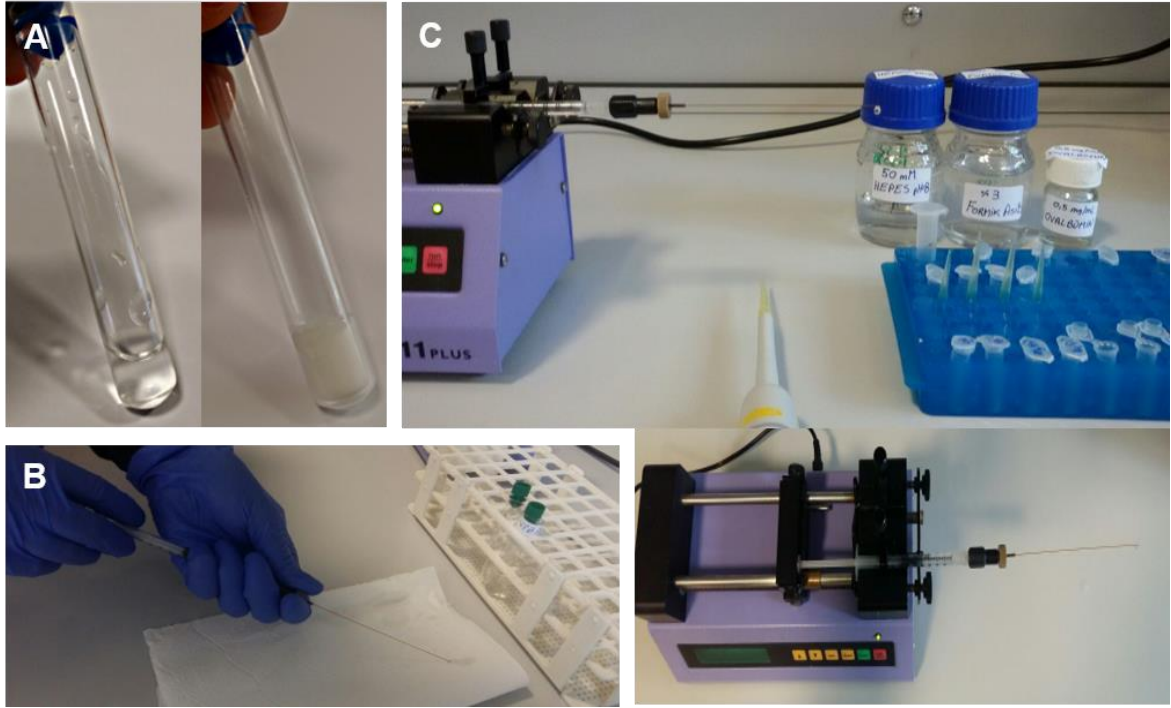
VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların affinite kromatografi performans değerlendirilmesi, seçilen bileşiklerin adsorpsiyonu/desorpsiyonu ile yapılmıştır. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik affinite kromatografisinde performans değerlendirilmesi için altı farklı monolitik kolon sentezlenmiştir. Çizelge 3.1.'de gösterildiği gibi beşi farklı VPBA miktarı içerirken bir tanesi VPBA katılmadan

sentezlenmiştir. VPBA 80 kodlu monolitik kolonun yüksek geri basınç vermesi nedeniyle bu kolon hariç diğer kolonların hepsiyle kromatografik analiz yapılmıştır.

3.6.1. β -NAD ve Ovalbumin Bileşiklerinin Borat Affinite Kromatografisi Tekniği ile İzolasyon İşlemi

Analiz işlemine geçmeden önce kolonlar şırınga pompası yardımıyla adsorpsiyon ve desorpsiyon tampon çözelti ile yıkanır. Bu işlem adsorpsiyon ve desorpsiyon tampon çözeltisi varlığında kolonun verebileceği kirliliklerden kolonu arındırmaya yönelik yapılır. Yıkama üç aşamada gerçekleşmektedir. Analizi yapılacak kolon öncelikle adsorpsiyon tampon çözelti ile 4 saat yıkanarak, BioDrop'ta kolonun kirlilik verip vermediğine bakılır. Kirlilik vermesi durumunda kolon içerisinden adsorpsiyon tampon çözelti (50 mM HEPES pH=8.5) geçirilmeye devam edilir. Yıkama işlemi BioDrop'ta kirlilik sıfır okununcaya kadar yapılır. Kolonun kirlilik vermemesi durumunda desorpsiyon tampon çözelti ile yıkamaya geçilir. β -NAD izolasyon analizlerinde desorpsiyon çözeltisi olarak 50 mM, pH=10.2 di-sodyum tetraborat kullanılmıştır. Ovalbuminin analizinde kullanılan kolonların yıkanması ise desorpsiyon ortamı olan %3'lük formik asit çözeltisi ile yapılmıştır. Bu aşama en az 4 saat sürüp, dördüncü saatin sonunda BioDrop'ta kirlilik okuması yapılır. Kolondan kirlilik gelmemesi durumunda tekrar 4 saat adsorpsiyon tampon çözelti geçirilir. Yapılan son yıkamanın sebebi β -NAD ve ovalbuminin, adsorpsiyon tampon çözelti içinde hazırlanmış olmasıdır. Son olarak monolitik kolondan 10 dakika azot gazı geçirilerek kolonun kuruması sağlanır, böylece kolon analize hazır duruma gelmiş olur. β -NAD okumaları 260 nm dalga boyunda gerçekleştirilirken ovalbümin okumaları BioDrop'un kendi kayıtlı protein okuma programı ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.5.'te VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik çözeltinin polimerleşmeden önceki ve sonraki görünümü, kolona doldurulma görüntüsü ve β -NAD ve Ovalbuminin izolasyon analizinde kurulan mekanizmanın görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.5. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitlerin hazırlanması ve borat affinite kromatografisi modunda sabit faz olarak kullanımı. (A) Monolitik çözeltinin hazırlanması ve cam deney tüpünde polimerleşmiş hali. (B) Hazırlanan çözeltinin insülin şiringası yardımıyla kolona basılması. (C) β -NAD ve ovalbumin'in izolasyon işlemi.

Şiringa pompası belli bir akış hızına ayarlayarak, VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolondan belli bir derişimde β -NAD/50mM HEPES pH=8.5 veya ovalbumin/50mM HEPES pH=8.5 çözeltisi geçirilerek izolasyonu amaçlanan molekülün adsorpsiyonu gerçekleştirilmektedir. Kolon doygunluk seviyesine ulaşana kadar kolona verilen akış hızına bağlı olarak belli bir zaman diliminde kolonun ucundan 10'ar μ L analit çözeltisi toplanır. Ardından kolon içerisinde bağlanmamış formdaki analitleri uzaklaştırmak için 15 dakika kolondan adsorpsiyon tampon çözeltisi geçirilir. Sonrasında desorpsiyon tampon çözeltisi geçirilerek adsorplanan bileşiklerin desorplanması sağlanır. Yine 10'ar μ L kolonun ucundan desorplanan analit çözeltisi toplanarak ependorflara alınır. Son olarak adsorpsiyon ve desorpsiyon aşamasında ependorflara alınan örneklerin BioDrop'ta absorbans okuması yapılarak, bileşiklerin adsorplanma miktarı Eşitlik.3.3, yüzdelik adsorplanma Eşitlik.3.4, desorplanma miktarı Eşitlik.3.6, yüzdelik desorpsiyon Eşitlik.3.7 ve izolasyon verimi Eşitlik.3.8 ile hesaplanmıştır.

$$C_v(\text{mg/mL}) = A_{f,a} / m_1 \quad (3.1)$$

C_v ; adsorplanmayan analitin derişimi (kolon dışına verilen analit derişimi mg/mL), $A_{f,a}$; Adsorplanmayan analitin absorbansı, m_1 ; adsorpsiyon çözelti içinde hazırlanan analitin kalibrasyon eğrisinin eğimi,

$$Q_v (\mu\text{g}) = (C_v * V)/1000 \quad (3.2)$$

Q_v ; adsorplanmayan analit miktarı (μg), V ; BioDrop'ta okunan hacim (μL)

$$Q_a(\mu\text{g}) = Q_y - Q_v \quad (3.3)$$

Q_a ; adsorplanan analit miktarı (adsorpsiyon μg), Q_y ; kolona yüklenen analit miktarı (μg),

$$\%A = (Q_a/Q_y) * 100 \quad (3.4)$$

$\%A$; analitin yüzdellik adsorpsiyonu,

$$C_d(\text{mg/mL}) = A_{f,d} / m_2 \quad (3.5)$$

C_d ; desorplanan analit derişimi (mg/mL), $A_{f,d}$; desorplanan analitin absorbansı, m_2 ; desorpsiyon çözelti içinde hazırlanan analitin kalibrasyon eğrisinin eğimi,

$$Q_d(\mu\text{g}) = (C_d * V)/1000 \quad (3.6)$$

Q_d ; desorplanan analit miktarı (desorpsiyon μg), C_d ; desorplanan analit derişimi (mg/mL), V ; BİO DROP' ta okunan hacim (μL),

$$\%D = (Q_d/Q_a) * 100 \quad (3.7)$$

$\% D$; analitin yüzdellik desorpsiyonu, Q_d ; desorplanan analit miktarı (μg), Q_a ; adsorplanan analit miktarı (μg),

$$\%İ = (Q_d/Q_y) * 100 \quad (3.8)$$

$\%İ$; izolasyon verimi.

3.6.1.1. β -NAD ve Ovalbumin Bileşiklerinin İzolasyonunda Uygun Desorpsiyon Tampon Çözeltisinin Belirlenmesi

Affinite kromatografisi spesifik bir bileşiğin adsorpsiyon tampon çözeltisi yardımıyla ligand tarafından tutulmasına ve sonrasında desorpsiyon tampon çözeltisi ile adsorplanan bileşiğin desorplanmasına dayalı bir kromatografik teknik türüdür. Tez çalışmasında β -NAD ve ovalbumin moleküllerinin affinite kromatografisi tekniği ile izolasyonu incelenmiştir. VPBA 40 kodlu kolon seçilerek, β -NAD elusyonu için 50 mM, pH 10.2 di-sodyum tetraborat, ovalbumin için ise %3'lük formik asit kullanımı uygun bulunmuştur. 50 mM pH 10.2 di-sodyum tetraborat çözeltisinin hazırlanışında, 100 mL deiyonize-distile su içerisinde 2.012 g di-sodyum tetraborat çözünür, ardından 0.5844 g sodyum klorür eklenerek çözelti soniklenerek tuzun çözünmesi sağlanır. 50 mM HEPES pH 8.5 adsorpsiyon tampon çözelti hazırlanmasında ise 100 mL deionize-distile su içine 1.192 g HEPES ve ardından 1.0166 g magnezyum klorür çözünür. Sonrasında sodyum hidroksit çözelti ile pH 8.5' e ayarlanır.

3.6.2. Analiz Koşullarının Değişimine Bağlı Olarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Kapiler Kolonun Performans İncelenmesi

Kolona verilen akışta, izolasyonu amaçlanan analitlerin derişiminde ve monolitik kolonun VPBA miktarında değişiklik yapılarak, VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonun performans incelenmesi yapılmıştır.

1. Kolona verilen akış hızı ve β -NAD ve ovalbuminin derişimleri sabit tutularak, aynı analiz koşullarında farklı VPBA miktarı içeren monolitik kolonlar kullanılmasıyla, monolitik yapıda VPBA miktarına bağlı olarak bileşiklerin izolasyon verimi incelenmiştir.
2. Kolona verilen akış hızı ile monolitik hibrid kolonda VPBA miktarı ve analiz koşulları sabit tutularak, β -NAD ve ovalbuminin derişimlerinin değişmesine bağlı olarak kolon verimi incelenmiştir.
3. Son olarak β -NAD ve ovalbumin derişimi sabit ve monolitik kolondaki VPBA miktarı sabit olacak şekilde, aynı analiz koşullarında kolona verilen akış hızının değişmesiyle kolonun izolasyon verimi incelenmiştir.

3.7. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Kapiler Kolonların Akış Hızına Bağlı Geri-Basınç Değerlendirilmesi

Tiyol-en kimyası ile sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonlar için hareketli faz akış hızının değişimine bağlı olarak geri basınç değişimi incelenmiştir. Daha sonra her bir monolitik kapiler kolonun Eşitlik 2.5'de belirtildiği üzere geçirgenliği hesaplanmıştır.

3.8.MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapıların Karakterizasyonu

3.8.1. Monolitik Kolonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonların morfolojisi, monolitın kapiler kolon çeperine sağlıklı bir biçimde tutunup tutunmadığı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) ile incelenmiştir. Kolon uçlarından yaklaşık 1 cm kesilerek, dik bir şekilde numune diskiye yerleştirilmesiyle SEM örnekleri hazırlanmıştır. Daha iyi görüntü alabilmek için vakumda 150 Å kalınlığında altın tabakası ile kaplanarak SEM cihazında 5000X, 200X, 650X ve 500X büyütme oranlarında kolonların kesit görüntüsü alınmıştır.



Şekil 3.6. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler kolonların karakterizasyonunda kullanılan taramalı elektron mikroskobu, Quanta 200 FEG SEM cihazı [9].

3.8.2. Monolitik Yapıların BET Cihazı ile Karakterizasyonu

Cam deney tüpünde hazırlanan VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapı termal yolla polimerleşirken, MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik ozelti bir cam lam üzerine alınarak UV-ışını altında polimerleşmesi sağlandıktan sonra, monolitik yapılar toz haline getirilir. Sonrasında saf etanol ile yıkanır ve 24 saat etüvde 60 C kurutulduktan sonra BET ubuklarına alınarak BET cihazında (Quantachrome Nova 2200, ABD)  zg l yüzey alanının ölçümü yapılır.  l m için azot adsorpsiyon desorpsiyon yönteminden faydalanılmıştır. 80 C'de 6 saat vakum yapılmıştır.



Şekil 3.7. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler monolitik yapıların özgül yüzey alanı ölçümünde kullanılan BET (Quantachrome Nova 2200) cihazı.

3.8.3. Monolitik Yapıların XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) Cihazı ile Karakterizasyonu

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid yapıların ligand ve POSS-MA içeriklerinin belirlenmesi XPS (Thermo-Scientific, K-Alpha-Monochromated high-performance XPS Spectrometer) cihazı kullanılarak yapılmıştır. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının ligand ve POSS-MA içeriğinin tayini için C, O, B, S, Si elementlerinin miktarına bakılırken, VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının ligand ve POSS-MA içeriğinin tayini için C, O, B, Si elementlerinin miktarına bakılmıştır. XPS analizi için toz haline getirilen numuneler BET çekiminde olduğu gibi hazırlanmıştır.

3.8.4. Monolitik Yapıların Cıvalı Porozimetre Cihazı ile Karakterizasyonu

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların gözenek boy dağılım ölçümü yüksek basınçta “Quantachrome Corporation Poremaster 60” cıva porozimetre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Monolitik yapılar cam deney tüpünde hazırlanarak, tüp içerisinde polimerleştirildikten sonra cam deney tüpü kırılarak monolitik yapı çıkartılmış ve cıvalı porozimetre cihazı için uygun büyüklükte kesilerek pelet haline getirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında farklı kullanım amacıyla, farklı kimyasal yapıya sahip değişik polimerizasyon mekanizmaları ile iki farklı monolitik hibrid kapiler kolon sentezlenmiştir. Ana monomer ve çapraz bağlayıcı olarak 10 metakrilat grubu içeren POSS-MA' nın kullanımı ile monolitik yapının çapraz bağ yoğunluğunun artırılması ve farklı ligand türleri kullanımı ile polimerizasyon işleminin tek basamakta gerçekleştirilip monolitik yapının kolayca türevlendirilmesi çalışmanın en önemli kısmıdır. Tiyol-en kimyasından faydalanarak MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon ve serbest radikal polimerizasyonu ile VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon sentezlenmiştir. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının hidrofobik ve hidrofobik etkileşim/katyon değişimi kromatografik modlarında ayırım için kullanılabileceği gösterilmiştir. Böylelikle tek sabit faz kullanımı ile çok modlu kromatografi sisteminde çalışılması mümkün olmuştur. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kapiler hibrid kolon ise borat affinite kromatografisi sisteminde biyolojik moleküllerin izolasyonunda kullanılmıştır. Sentezlenen kolonların kromatografik performansları incelenmiş ve sonrasında karakterizasyonu yapılmıştır.

4.1. Nano-Sıvı Kromatografi Sistemi için Çok Modlu Monolitik Hibrid, Kapiler Kolon Geliştirilmesi

4.1.1. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Yapının Tiyol-en Kimyası ile Sentezi

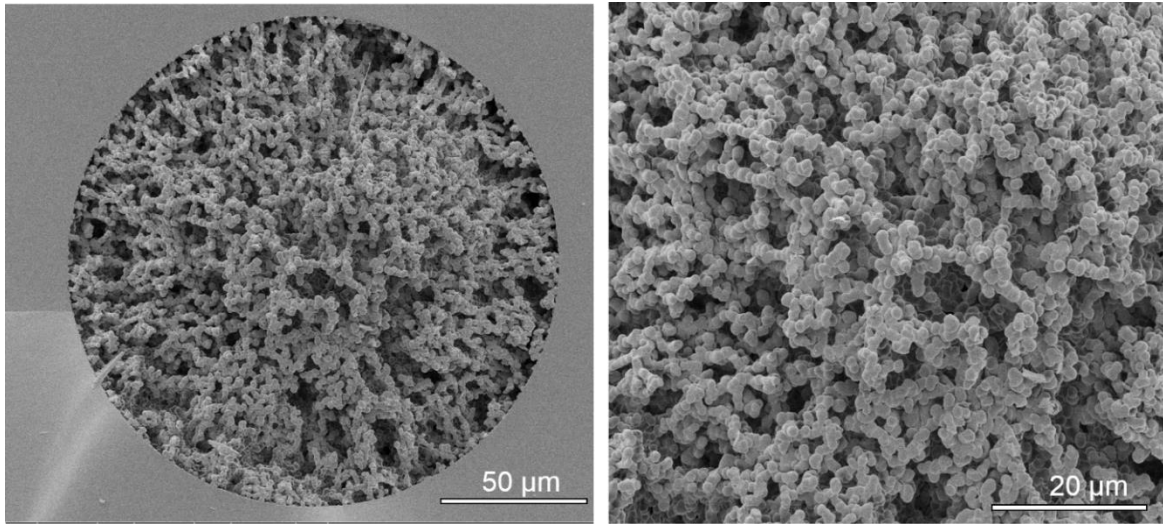
Ana monomer ve çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA ve tek tiyol grubu içeren MPBA ligandı varlığında fotopolimerizasyon ve tiyol-en kimyası ile çapı 100 µm olan MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon sentezlenmiştir. Gözenek yapıcı sistem olarak n-bütanol (mikrogözenek yapıcı) ve etilen glikol (makrogözenek yapıcı) kullanılmıştır. UV başlatıcı olarak ise DMPA kullanılmıştır. UV ışını kullanılarak farklı sürelerde monolitik yapının polimerizasyonu yapılmıştır. Polimerizasyon sonrası oluşan polimerik yapılar ışık mikroskobu altında incelenmiş ve 30 dakikalık sürede polimerleşme ile istenen özelliklere en uygun yapının elde edildiği görülmüştür. Monolitik çözeltinin hazırlanma işlemi sadece birkaç dakika alması, polimerizasyon işleminin tek basamaklı kolon içerisinde yarım saatte

gerçekleştirilmesi, yapının monolitik, hibrid ve aynı zamanda çok modlu kromatografik sistemde kullanılabilir olması, MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler kolon çalışmasını ayrıcalıklı kılmaktadır.

4.1.2. MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Kapiler Kolonun Karakterizasyonu

Monolitik yapılu MPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler hibrid kolonun SEM görüntüleri, Civa Porozimetresi (CPM) ile gözenek boy dağılımı, XPS ile monomer ve ligand içeriği tayini yapılmıştır. Ayrıca BET cihazında yapılan analiz ile monolitik yapının özgül yüzey alanı tayin edilmiş, hareketli faz varlığında akış hızı değişimine bağlı geri basınç değişimi ve geçirgenlik hesabıyla monolitik kolonun karakterizasyonu yapılmıştır.

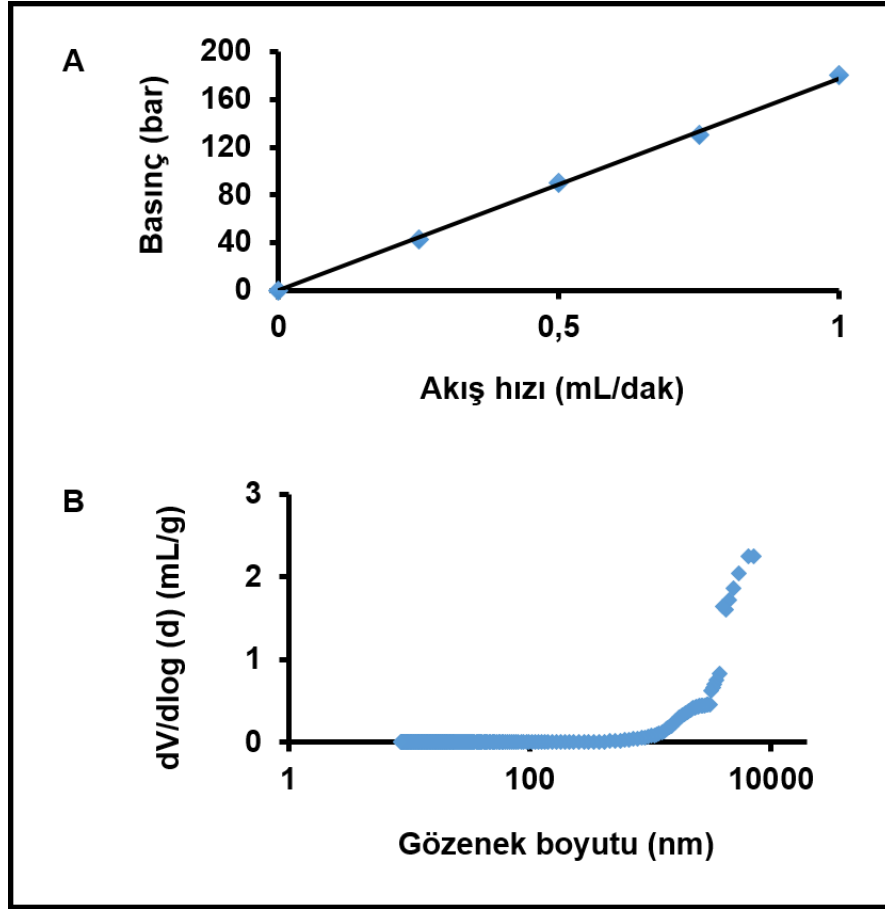
Şekil 4.1' de verilmiş olan SEM görüntülerinde, iç çapı 100 µm olan UV geçirgen kapiler kolon içinde tiyol-en kimyasıyla sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının düzgün ve homojen olduğu, ayrıca kolon çeperine yapışmış olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç kapiler kolonlara monolitik çözeltiyi basmadan önce uygulanan silanlama işleminin başarılı sonuç verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. UV-başlatıcı varlığında tiyol-en polimerizasyonu ile sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti için SEM fotoğrafları.

Şekil 4.2.'de MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun akış hızına karşı geri basınç grafiği ve gözenek boy dağılım grafiği verilmiştir. Akış hızının artmasına bağlı olarak geri basınç değerlerinde yükselme gözlenmektedir. BET analizi sonucunda,

MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının yüzey alanı $4.2 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Geri basınç değerleri kullanılmasıyla Eşitlik 2.5.'ten yararlanarak monolitik yapının geçirgenliği hesaplanmış ve $3.3 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. MPBA bağı-poli(POSS-MA) monoliti için (A) geri basınç değerinin akış hızıyla değişimi. Mobil faz: 40/60 mL/mL ACN/ %0.1 formik asit tamponu, kolon: 100 μm iç çap x 300 mm uzunluk, (B) gözenek boy dağılım eğrisi.

XPS analiz sonuçlarına göre monolitik yapının yüzde atom içeriği belirlenmiştir. Monolitik yapı içinde karbon (C) ve oksijen (O) içeriğine bakılmıştır. POSS-MA içeriği için silisyum (Si) tayini, MPBA içeriği için ise kükürt (S) ve bor (B) tayini yapılmıştır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü üzere monolitik yapıda $\text{C} (1s) > \text{O} (1s) > \text{Si} (2p) > \text{B} (1s) > \text{S} (2p)$ sırasına tabi olacak şekilde element içeriği bulunmaktadır. Monolitik yapıda kullanılan POSS-MA ve MPBA'nın moleküler yapıları incelendiğinde XPS sonuçlarının monolitik yapı bileşenleriyle uyum içinde olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.1. XPS analiz sonuçlarına göre MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının yüzde atom içeriği.

	Si (2p)	S (2p)	B (1s)	C(1s)	O (1s)
% Atom içeriği	5.74	1.65	3.25	62.29	27.07

4.1.3. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun Çok Modlu Sistemde Uygulanması

MPBA ligandı benzen halkası, borik asit grubu ve borik asit üzerindeki hidroksil grupları sayesinde hidrofobik ligand, iyon-değişim sitesi ve hidrofilik ligand olarak kromatografik analizlerde görev alabilir. MPBA'nın bu özelliğinden faydalanarak ilk kez bu tez kapsamında sentezlenen MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid yapı, alkilbenzenlerin, çok halkalı aromatik hidrokarbonların ve aminlerin kromatografik ayırımında sabit faz olarak kullanılmıştır.

4.1.3.1. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Yukarıda belirtildiği üzere, MPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid kapiler kolonu ile MPBA' daki benzen halkası sayesinde ve düşük ACN içerikli hareketli faz kullanımı ile kromatografik analizde hidrofobik etkileşim sağlanabilir.

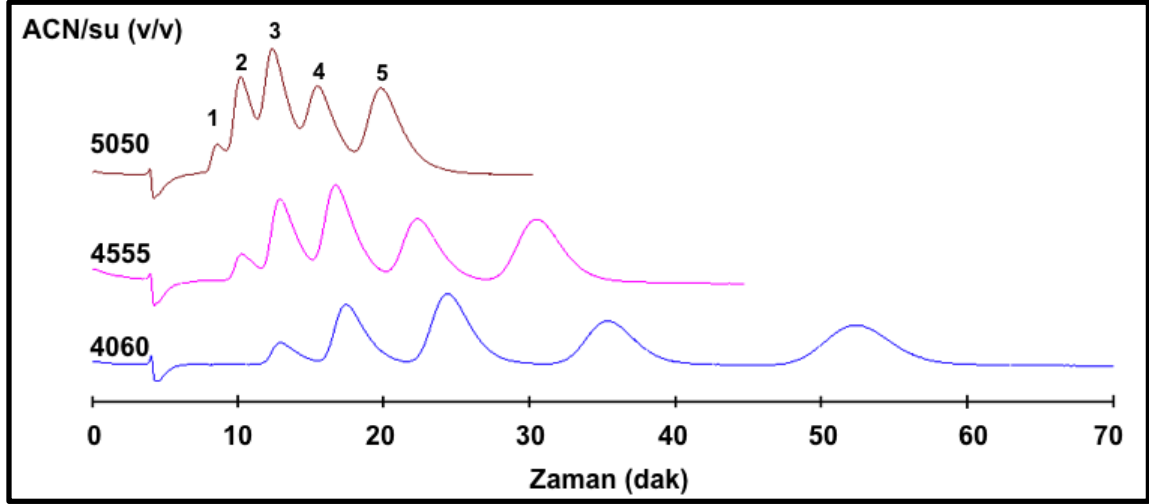
4.1.3.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Alkilbenzen Ayırımı

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik hibrid kolon izokratik ve gradient ters faz kromatografisi modunda alkilbenzen homologlarının ayırımında kullanılmış ve kromatografik performansı incelenmiştir.

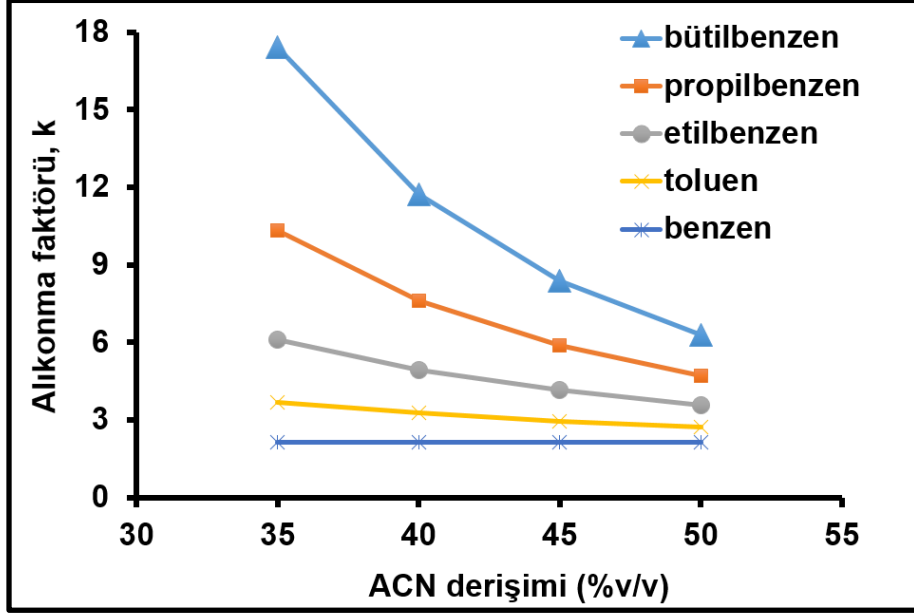
4.1.3.2.1. İzokratik Modda Alkilbenzenlerin Kromatografik Analizi

Şekil 4.3.'te 1.0 µL/dak akış hızında, hareketli fazın ACN derişiminin değişimi ile alkilbenzenlerin kromatografik ayırımı verilmiştir. Analitlerin elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen ve 5. bütilbenzen olmak üzere hidrofobisite ile uyum içerisinde ters faz mekanizması ile gerçekleşmiştir.

Hareketli fazda asetonitril oranının kromatografik performansa etkisini incelediğimizde Şekil 4.4.'te gösterildiği üzere, ters faz kromatografisi ile uyum içinde olduğu, hareketli fazda asetonitril oranının artmasıyla alkilbenzenlerin alıkonma faktörü (k)'nde düşüş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yine Şekil 4.4.'te gösterildiği üzere sabit bir asetonitril/su oranını ele aldığımızda alıkonma faktörünün, hidrofilitesi en yüksek olan analitten en hidrofobik analite doğru artmakta olduğu görülmektedir.

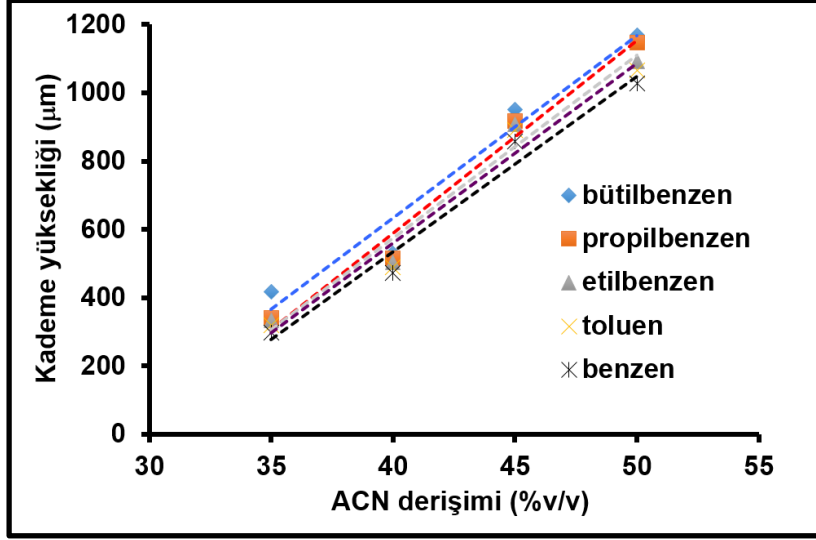


Şekil 4.3. Alkilbenzenlerin hidroforbik kromatografik analizinde MPBA bağı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (ACN/su oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı (µL/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.



Şekil 4.4. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.3.'te verilmektedir.

Sabit fazın kromatografik performansını ortaya koyan teorik kademe sayısı ve teorik kademe yüksekliğinin değerlendirilmesi amacıyla, Şekil 4.5.'te asetonitril/su oranının değişimine bağlı olarak teorik kademe yüksekliği değerleri grafiğe geçirilmiştir. Teorik kademe sayısı, kolonun ayırma verimiyle ve kolon uzunluğu ile doğru orantılı, teorik kademe yüksekliği ile ise ters orantılıdır. Şekilde asetonitril oranının artmasıyla teorik kademe yüksekliğinin artışı gözlenmektedir. Bu da, asetonitril oranının artmasına bağlı olarak kolon performansının düştüğünü göstermektedir.



şekil 4.5. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kolon kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar şekil 4.3.'te verilmektedir.

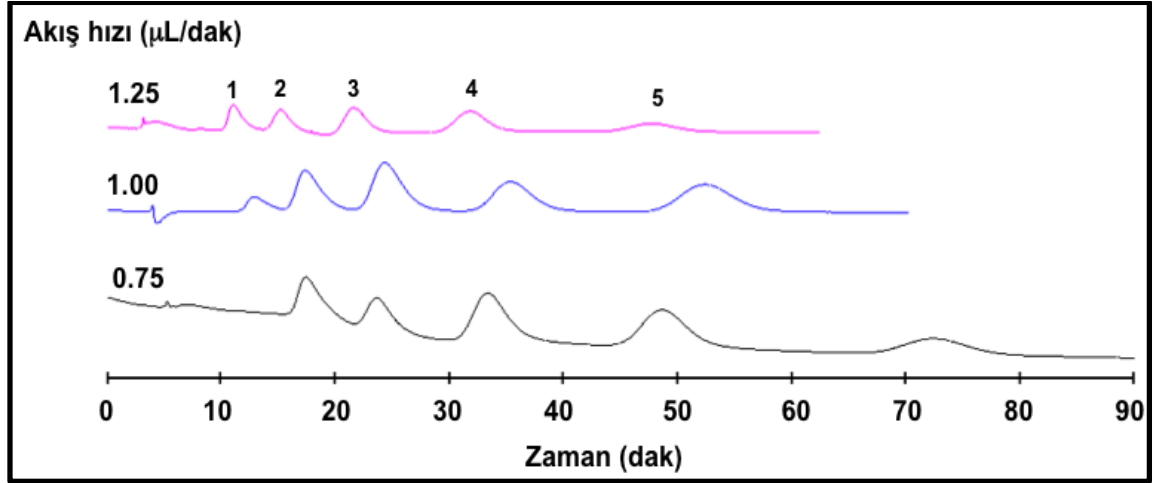
Asetonitril/su oranına bağlı olarak, ardışık iki pikin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığına dair bilgi veren pik çözünürlükleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Uygun asetonitril/su oranı kullanımı ile yüksek pik çözünürlüğüne ulaşmak mümkündür. Ancak, bunun sonucunda toplam analiz süresi de uzatılmış olur. Asıl hedef kısa analiz süresinde etkili ayırım elde etmektir. Çizelge 4.2.'ye bakıldığında alkil benzenlerin kromatografik ayırımında izokratik modda gerçekteşen analizde en iyi pik çözünürlüğü 35/65 (mL/mL) ACN/%0.1 formik asit oranı için elde edildiği görülmüştür. Ancak, burada analiz süresinin çok uzun olması nedeniyle akış hızı taramasında 40/60 (mL/mL) ACN/%0.1 formik asit oranı seçilerek analizler yapılmıştır.

Çizelge 4.2. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile hareketli fazda ACN derişiminin değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

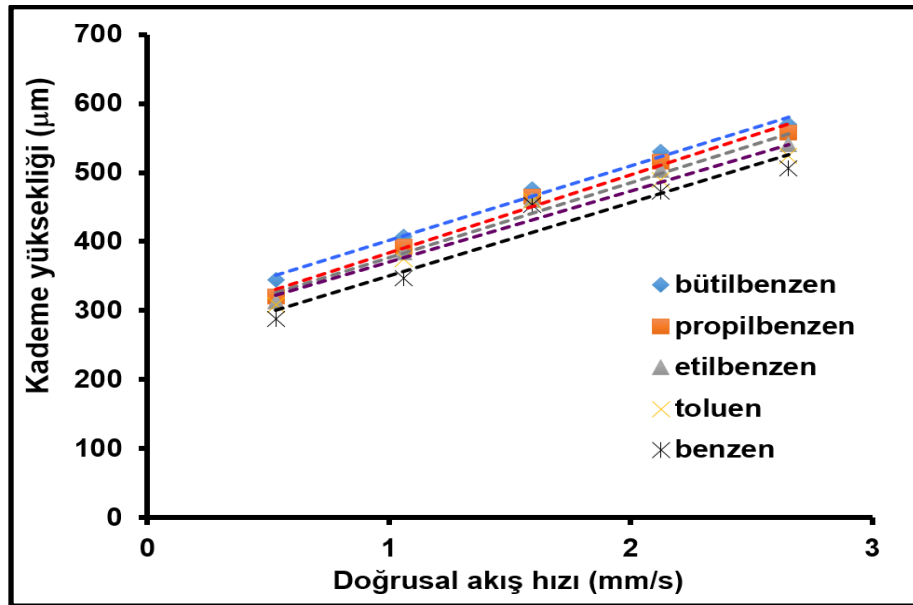
ACN/su (%v/v)	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
35/65	1.83	2.61	2.85	3.85
40/60	1.15	1.45	1.85	2.19
45/55	0.84	1.02	1.22	1.46
50/50	1.32	0.64	0.76	0.94

Kromatografik koşullar Şekil 4.3.'te verilmektedir.

40/60 (mL/mL) ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranının alkilbenzenlerin ayırımında optimum olarak belirlenmesinden sonra Şekil.4.6.'da görüldüğü üzere kolonda akış hızı taraması yapılmıştır. Farklı akış hızlarında yapılan kromatografik analiz sonucunda pik çözünürlük değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Akış hızının artmasıyla analitlerin kolondan elüsyonu daha hızlı gerçekleşeceğinden pikler birbirine daha yakın hatta iç içe gelecektir. Akış hızının düşmesiyle pik çözünürlüğünde iyileşme gözlenmiştir. Ancak burada yine uzun analiz süresi gözlenmektedir. 0.25 µL/dak akış hızında en iyi pik çözünürlüğü elde edilirken, analiz süresi de göz önünde bulundurularak, en iyi kromatografik analizin 1.0 µL/dak akış hızında gerçekleştiği söylenebilir. Ayrıca doğrusal akış hızının (mm/s) artmasıyla teorik kademe yüksekliğinde hafif bir artış gözlenmektedir. Bunun sonucunda teorik kademe sayısı düşmekte bu da akış hızının artmasıyla kolonun kromatografik performansının azaldığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile hareketli faz akış hızının değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 40/60 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızları ($\mu\text{L}/\text{dk}$) kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.



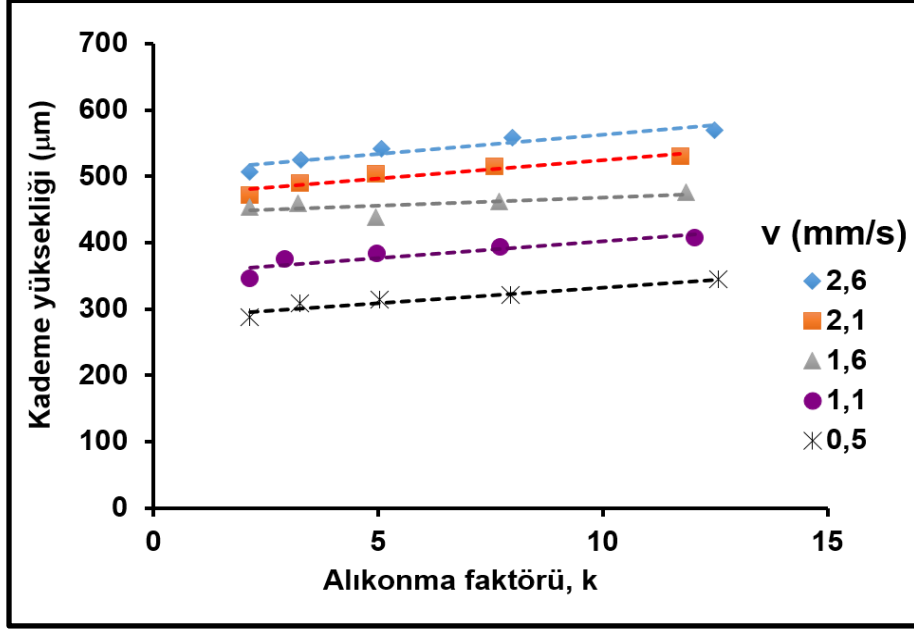
Şekil 4.7. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.6.'da verilmektedir.

Çizelge 4.3. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$)	R₂₁	R₃₂	R₄₃	R₅₄
0.25	1.94	2.38	2.82	3.16
0.50	1.20	2.34	2.36	2.76
0.75	1.18	1.82	2.25	2.35
1.00	1.15	1.45	1.85	2.19
1.25	1.10	1.55	1.70	2.13

Kromatografik koşullar Şekil 4.6.'da verilmektedir.

Şekil 4.8.'de Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün kademe yüksekliği ile değişimi verilmiştir. Alıkonma faktörünün artmasıyla kademe yüksekliğinde kayda değer bir değişiklik gözlenmemesi kolonun alıkonma süresinden bağımsız kolon verimi davranışı sergilediğini gösterir. Bu durum monolitik yapının sentezinde kullanılan 10 metakrilat grup içerikli POSS-MA molekülünün monomer ve aynı zamanda çapraz bağlayıcı olarak görev almasıyla çapraz bağ yoğunluğunu artırılmasına dayandırılmaktadır.



Şekil 4.8. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün kademe yüksekliği ile değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.6.'da verilmektedir.

Alkilbenzenlerin gün içerisinde ve günden güne kromatografik analizi yapılmıştır ve analitlerin bağıl standart sapma (BSS) tekrarlanabilirlik değerleri hesaplanarak Çizelge 4.4.'te verilmiştir. BSS değerinin %4'ten düşük olması analizlerde güçlü tekrarlanabilirlik elde edildiğini göstermektedir [9]. Günden güne yapılan analizlerde en iyi tekrarlanabilirlik değeri % 6.13 ile benzen için elde edilirken en iyi analizden analize tekrarlanabilirlik değeri ise % 0.70 ile etilbenzen için elde edilmiştir.

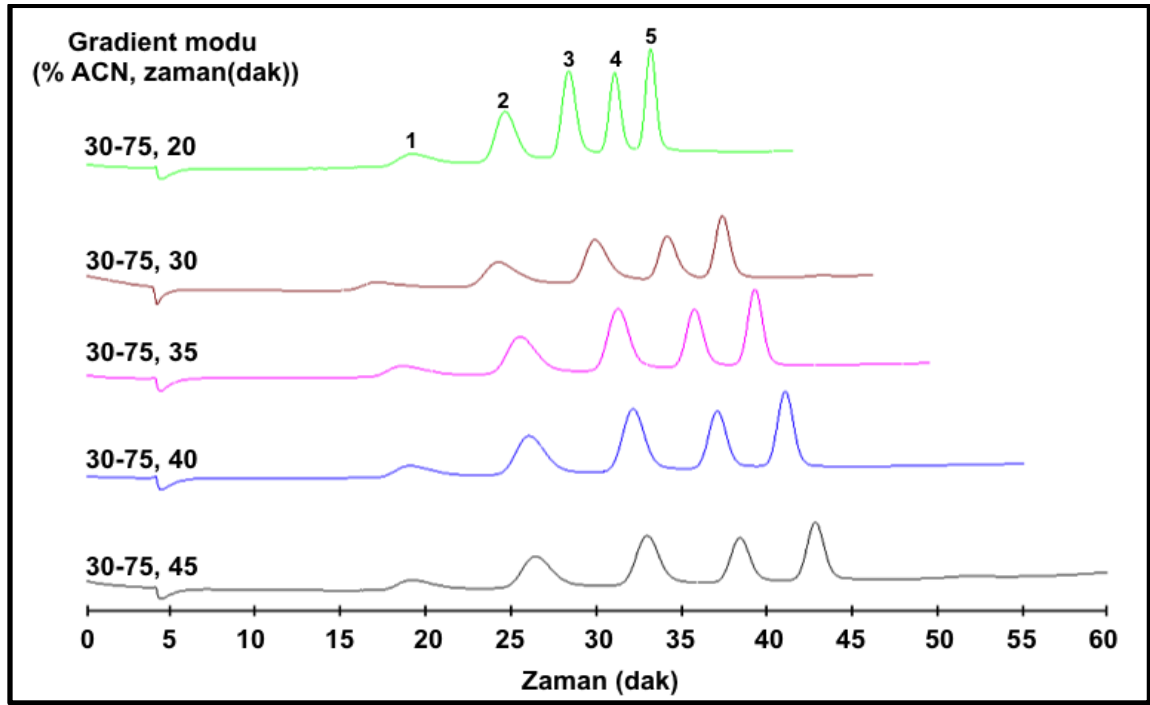
Çizelge 4.4. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile “Analizden analize” ve “Günden güne” tekrarlanabilirlik değerleri.

Analit	Analizden analize tekrarlanabilirlik BSS (%)	Günden güne tekrarlanabilirlik BSS (%)
Benzen	1.30	6.13
Toluen	2.27	8.26
Etilbenzen	0.70	9.21
Propilbenzen	1.12	9.32
Bütilbenzen	2.18	9.77

Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 40/60 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızları (μ L/dk): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μ m iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

4.1.3.2.2.Gradient Modda Alkilbenzenlerin Kromatografik Analizi

Kromatografik analizde daha etkili ayırım ve daha kısa analiz süresine ulaşmak için MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik sabit faz ile alkilbenzen bileşiklerinin gradient modda analizi yapılmıştır. Alkilbenzenlerin gradient modda asetonitril oranının farklı zaman dilimi içinde 30’dan 75’e çıkarılmasıyla elde edilen kromatogramlar Şekil 4.9.’da verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere 20 dakika içerisinde hareketli fazın %30’dan %75 asetonitril oranına ulaşmasıyla toplam analiz süresinin 35 dakika olduğu ve beş alkilbenzen bileşiğinin ayırımının 15 dakikalık bir zaman diliminde gerçekleştiği görülmektedir. Çizelge 4.5.’te ise Şekil 4.9.’da verilen kromatogramların pik çözünürlükleri verilmiştir. Hareketli fazın asetonitril bileşeninin %30’dan %75’e çıkarılmasındaki sürenin artmasıyla pik çözünürlüklerinde hafif bir artış gözlenmektedir. Aynı şekilde toplam analiz süresinde de kayda değer bir değişiklik olmamasıyla kolon performansının gradient modda alıkonma süresinden bağımsız davranış sergilediği söylenebilmektedir.



Şekil 4.9. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L/dk}$): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Çizelge 4.5. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
30-75, 20	1.65	1.91	1.67	1.63
30-75, 30	1.60	1.78	1.82	1.68
30-75, 40	1.94	2.23	2.30	2.22
30-75, 45	1.98	2.07	2.12	2.14

Kromatografik koşullar Şekil 4.9.'da verilmektedir.

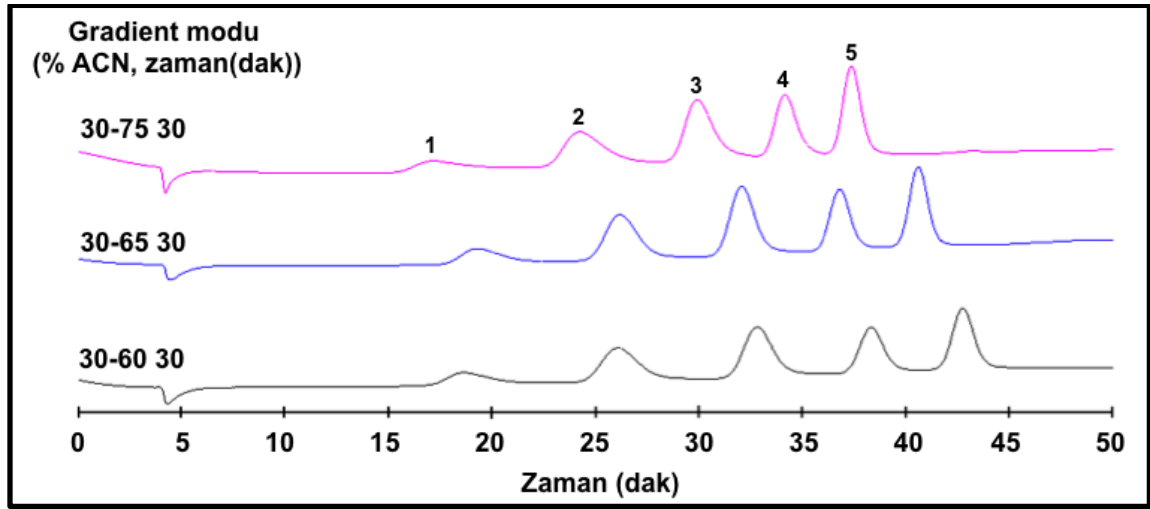
Gradient modda zaman taramasında elde edilen kromatogramlar üzerinde yapılan teorik kademe yüksekliği hesaplamalarından, zaman değişimine bağlı olarak teorik kademe yüksekliğinde belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Bu durum yukarıda belirttiğimiz alıkonma süresinden bağımsız kolon performansı olayını teyit etmektedir. Çizelge 4.6.'da zaman değişimine bağlı alkilbenzen bileşiklerinin teorik kademe yükseklikleri verilmiştir. Bileşiklerin teorik kademe yüksekliği sırasıyla bütilbenzen<propilbenzen<etilbenzen<toluen<benzen olarak gösterilebilir. Bu durum MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik sabit faz ile daha yüksek hidrofobik özelliğe sahip analitlerinin ayırımının daha iyi gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.6 Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	benzen	Tolüen	etilbenzen	propilbenzen	bütilbenzen
30-75, 20	481.39	104.98	45.64	28.83	13.90
30-75, 30	491.17	188.96	84.30	37.14	25.60
30-75, 40	496.41	195.96	86.10	39.25	26.87
30-75, 45	501.73	197.98	88.20	40.06	30.70

Kromatografik koşullar Şekil 4.9.'da verilmektedir.

Pik çözünürlükleri ve toplam analiz süresi göz önünde bulundurularak gradient modda yapılmış olan zaman taramasında en iyi kromatogram 30 dakika içerisinde hareketli fazın asetonitril oranının %30'dan %75'e ulaşmasıyla elde edilmiştir. Optimum süre 30 dakika seçilerek, sürenin sabit tutulmasıyla asetonitril taramasında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.7.'de ise sabit sürede, asetonitril değişimine bağlı pik çözünürlükleri verilmiştir. Şekil 4.10 ve Çizelge 4.7.'den görüldüğü üzere sabit sürede asetonitril oranının düşmesiyle toplam analiz süresinde ve analitlerin pik çözünürlüklerinde kayda değer görülmeyen düşük bir artış vardır.



Şekil 4.10. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. benzen, 2. toluen, 3. etilbenzen, 4. propilbenzen, 5. bütilbenzen. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L/dk}$): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Çizelge 4.7. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
30-75, 30	1.60	1.78	1.82	1.68
30-65, 30	1.94	2.08	2.30	2.11
30-60, 30	2.00	2.20	2.25	2.03

Kromatografik koşullar Şekil 4.10.'da verilmektedir.

Çizelge 4.8.'de gradient modda alkilbenzen bileşiklerinin kromatografik ayırımında MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun kademe yükseklik değerleri

verilmiştir. Zaman taramasında olduğu gibi, asetonitril oran taramasında teorik kademe yüksekliği asetonitril oran değişimi ile büyük bir değişim sergilememektedir.

Çizelge 4.8. Alkilbenzenlerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	benzen	toluen	etilbenzen	propilbenzen	bütilbenzen
30-75, 30	491.17	188.96	84.30	37.14	25.60
30-65, 30	496.41	195.96	88.31	40.12	27.70
30-60, 30	506.40	209.54	92.14	46.84	30.99

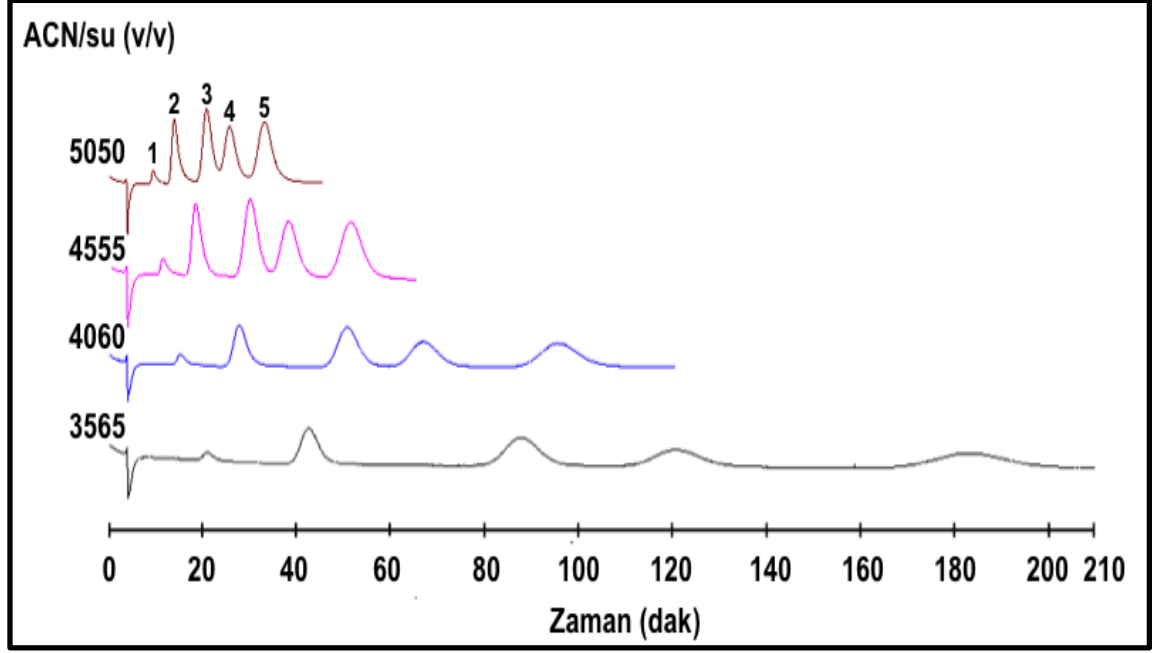
Kromatografik koşullar Şekil 4.10.'da verilmektedir.

4.1.3.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Çok Halkalı Aromatik Bileşik Ayırımı

Monolitik yapılu MPBA bağlı-poli(POSS-MA), ters faz kromatografisi modunda alkil benzenlerin dışında, beşli PAH karışımından oluşan numunenin analizinde sabit faz olarak uygulanmıştır. Alkilbenzenlerde olduğu gibi analiz izokratik ve gradient modlarında yapılmıştır.

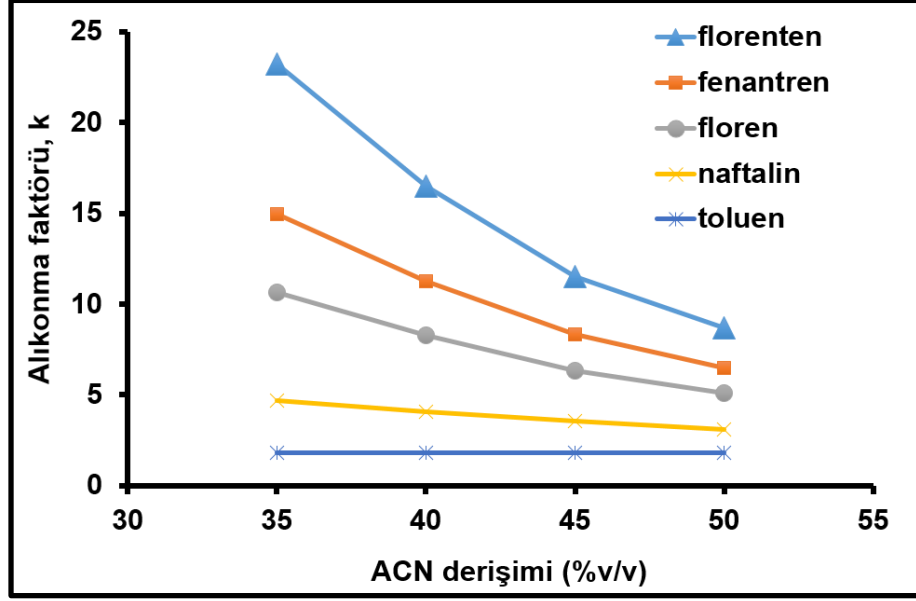
4.1.3.3.1. İzokratik Modda Çok Halkalı Bileşiklerin Kromatografik Analizi

İzokratik koşullarda sabit akış hızında ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranının hareketli faz içerisindeki değişimi ve sabit ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranında akış hızının kromatografik performansa olan etkisi incelenmiştir. Şekil 4.11'de izokratik koşullarda çok halkalı bileşiklerin 1.0 $\mu\text{L}/\text{dak}$ akış hızında ACN derişiminin değişimi ile elde edilen kromatogramları verilmiştir. Analit elüsyon sırası 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren ve 5. florenten olmak üzere hidrofobisite ile uyumlu olarak gerçekleşmiştir. Asetonitril/su oranı hareketli faz içinde düşmesiyle toplam analiz süresi uzamaktadır.



Şekil 4.11. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (ACN/su oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L/dk}$): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Asetonitril derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişim grafiği Şekil 4.12.'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere asetonitril derişiminin artmasıyla çok halkalı aromatik bileşiklerin alıkonma faktörü, ters faz kromatografisi moduna uygun düşüş göstermektedir. Sabit bir asetonitril oranını ele aldığımızda ise alıkonma faktörünün değeri, hidrofilik özelliği en yüksek olan bileşikten, hidrofilik özelliği en düşük olan bileşiğe doğru artış göstermektedir.



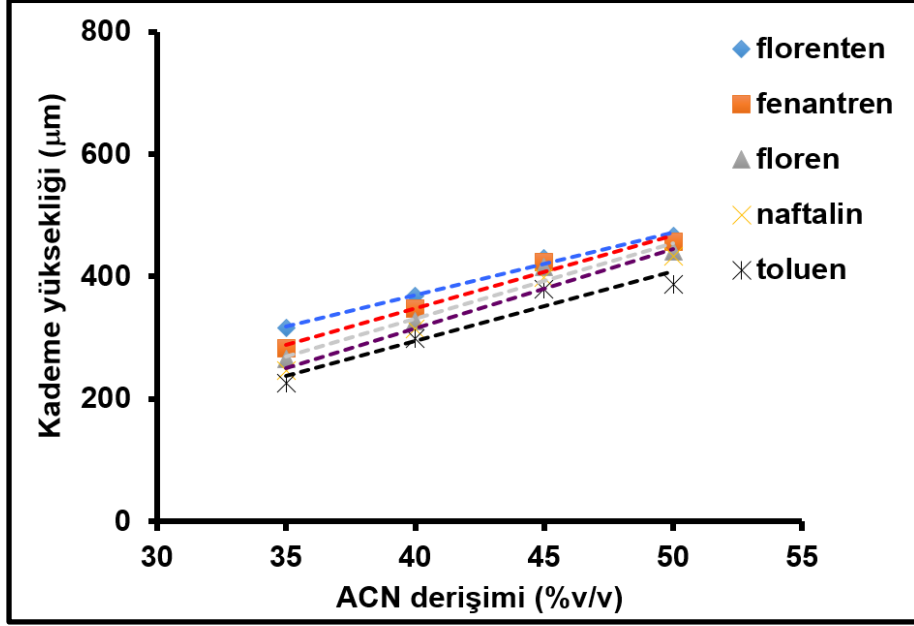
Şekil 4.12. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.11.'de verilmektedir.

Şekil 4.11.'de izokratik koşullarda, sabit akış hızında, asetonitril/su oranının değişimine karşı verilen kromatogramların pik çözünürlükleri hesaplanarak Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Tabloda görüleceği üzere asetonitril oranının düşmesiyle pik çözünürlüklerinde artış gözlenmektedir. Şekil 4.13.'te ise asetonitril oran değişimine karşı kolonun teorik kademe yüksekliği verilmiştir.

Çizelge 4.9. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak pik çözünürlük değerlerinin değişimi.

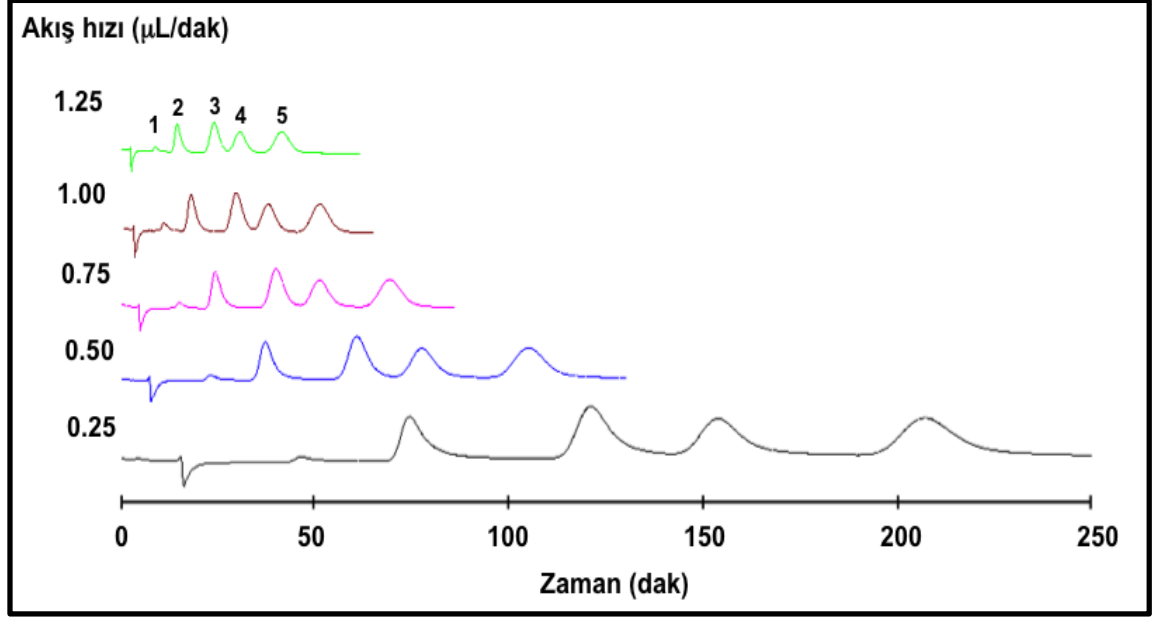
ACN/su (%v/v)	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
35/65	3.81	4.23	1.96	2.46
40/60	3.01	3.33	1.65	2.03
45/55	2.08	2.45	1.29	1.65
50/50	1.94	2.08	1.13	1.40

Kromatografik koşullar Şekil 4.11'de verilmektedir.

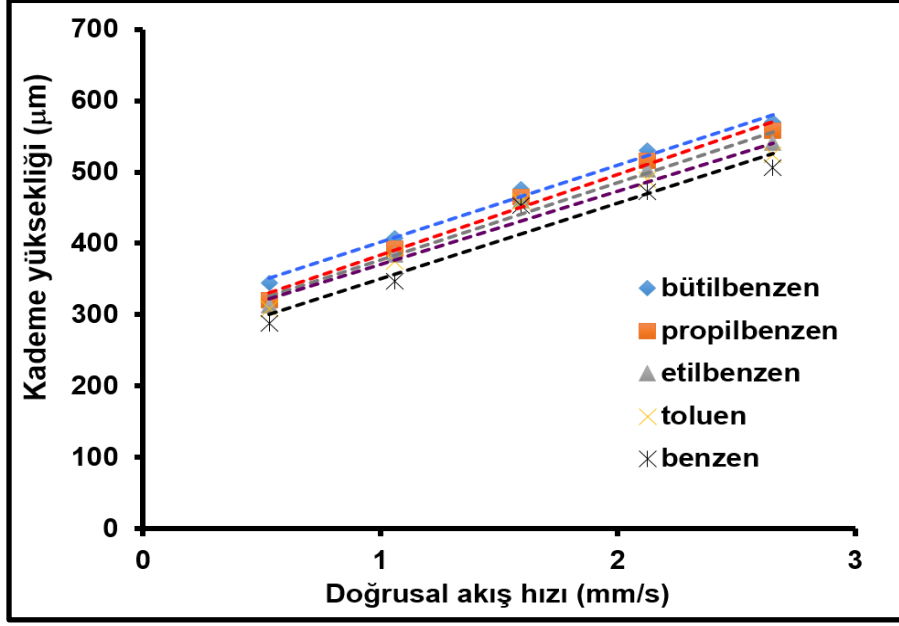


Şekil 4.13. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.11.'de verilmektedir.

Çok halkalı aromatik bileşiklerinin sabit akış hızında yapılan asetonitril taramasında, hareketli faz bileşeninde optimum oranı 45/55 (mL/mL) ACN/%0.1 formik asit çözeltisi olarak bulunmuştur. Optimum ACN/%0.1 formik asit çözeltisi oranı kullanılarak Şekil 4.14.'te akış hızı taramasının yapıldığı kromatogramlar verilmiştir. Farklı akış hızlarında yapılan kromatografik analiz sonucunda pik çözünürlükleri hesaplanmış ve Çizelge 4.10.'da verilmiştir. Akış hızının artması bileşiklerin detektöre daha hızlı ulaşmasına ve piklerin daha bitişik gelmelerine sebep olmaktadır. Düşük akış hızı yüksek pik çözünürlüğü demektir. Kolon performansını inceleyebilmek amacıyla Şekil.4.15.'te doğrusal akış hızına karşı kademe yüksekliği ve Şekil 4.16'da teorik kademe yüksekliğinin alıkonma faktörüne bağlı değişimi verilmiştir. Şekil.4.15.'te verilen kademe yüksekliğinin doğrusal akış hızına bağlı değişimi grafiğinden doğrusal akış hızının artmasına bağlı olarak kolonun teorik kademe yüksekliğinde hafif bir artış gözlenmektedir. Ancak, Şekil 4.16.'dan görüleceği üzere alıkonma faktörünün artmasıyla kolonun teorik kademe yüksekliğinde sabitlik gözlenmektedir. Bu durum kolonun alıkonma faktöründen bağımsız performans sergilediğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile hareketli faz akış hızının değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 45/55 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızı (µL/dk) akış hızları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

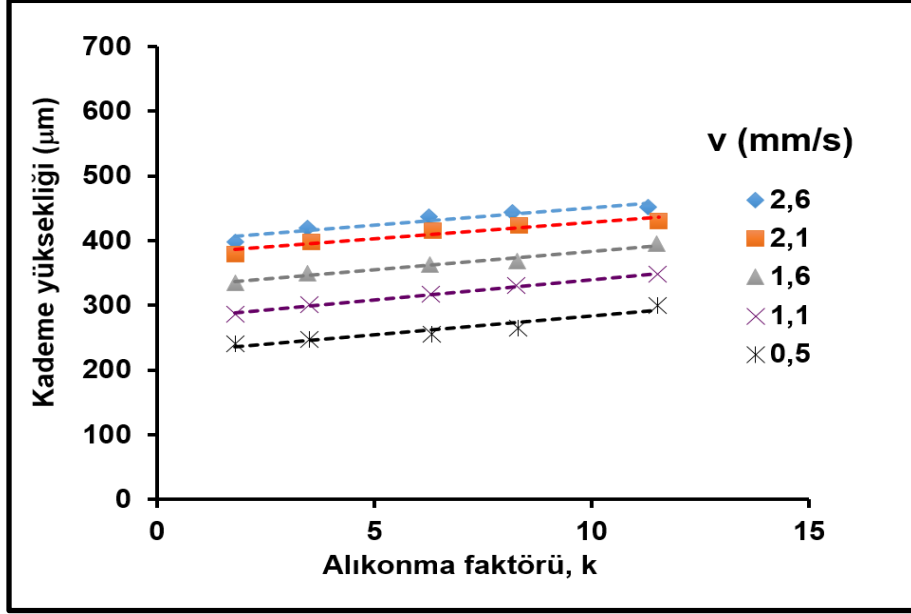


Şekil 4.15. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidroforbik kromatografik analizinde MPBA bağılı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.

Çizelge 4.10. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidroforbik kromatografik analizinde MPBA bağılı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak pik çözünürlük değerlerinin değişimi.

Akış hızı (µL/dak)	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
0.25	3.14	4.00	2.04	2.31
0.50	2.58	3.16	1.68	2.04
0.75	2.23	2.65	1.45	1.82
1.00	2.08	2.45	1.29	1.65
1.25	1.98	2.40	1.25	1.63

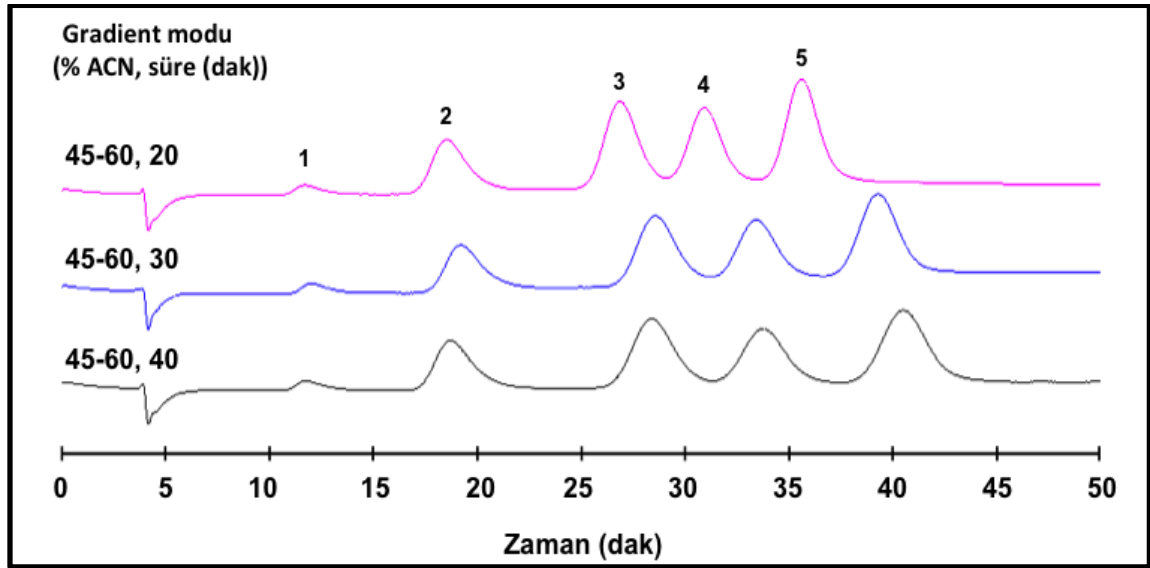
Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.



Şekil 4.16. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün değişimi ile kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.

4.1.3.3.2. Gradient Modda Çok Halkalı Aromatik Hidrokarbon Bileşiklerin Kromatografik Analizi

Çok halkalı aromatik hidrokarbon bileşiklerinin ayırımını daha etkili ve kısa analiz süresinde gerçekleştirmek amacıyla MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik sabit faz ile gradient modda analiz yapılmıştır. Çok halkalı aromatik bileşiklerin gradient modda süre taraması ve asetonitril taraması yapılmıştır. Farklı zaman dilimi içinde asetonitril oranının %45'ten %60'a çıkarılmasıyla elde edilen kromatogramlar Şekil 4.17.'de verilmiştir. Sürenin artışına bağlı olarak toplam analiz süresinde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Çizelge 4.11.'de ise Şekil 4.17.' de verilen kromatogramların pik çözünürlükleri verilmiştir. Gradient modda süre taramasında elde edilen kromatogramlardan kolonun teorik kademe yüksekliği hesaplanmış, Çizelge 4.12.'de sunulmuştur. Sürenin değişimine bağlı olarak teorik kademe yüksekliğinde de kayda değer bir değişikliğin olmaması izokratik modda olduğu gibi gradient modda da kolonun performansının alıkonma süresinden bağımsız davranış sergilediğini göstermiştir.



Şekil 4.17. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L/dk}$): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Çizelge 4.11. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃	R ₅₄
45-60, 20	2.11	4.18	2.61	3.40
45-60, 30	1.60	2.84	2.04	3.00
45-60, 40	2.22	2.64	1.32	1.55

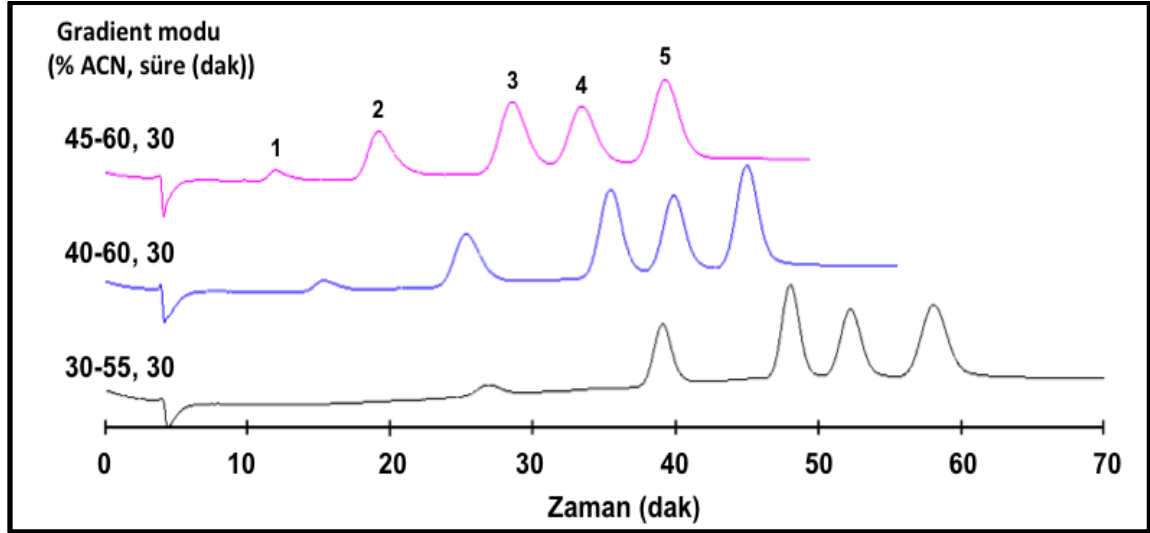
Kromatografik koşullar Şekil 4.17'de verilmektedir.

Çizelge 4.12. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	toluen	naftalin	floren	fenantren	florenten
45-60, 20	288.70	265.45	170.81	96.72	93.04
45-60, 30	315.01	303.52	179.38	155.21	125.63
45-60, 40	442.38	367.90	212.88	173.89	136.89

Kromatografik koşullar Şekil 4.17.'de verilmektedir.

Çok halkalı bileşiklerin gradient modda yapılan süre taramasında 30 dakikalık süre içerisinde asetonitril oranının %45'ten % 60' a çıkarıldığı kromatogram optimum ayırımı veren kromatogram olarak seçilmiştir. Bu sebeple gradient modda yapılacak olan sabit sürede asetonitril taramasında zaman olarak 30 dakika seçilmiştir. Şekil 4.18.'de çok halkalı bileşiklerin gradient modla asetonitril taramasında elde edilen kromatogramları verilmiştir. Şekilde hareketli faz içerisinde asetonitril oranının düşmesiyle toplam analiz süresinin uzamakta olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient modda elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. toluen, 2. naftalin, 3. floren, 4. fenantren, 5. florenten. UV detektör 214 nm, hareketli faz: ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA (gradient mod değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L/dk}$): 1.0, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Şekil 4.18.'de çok halkalı aromatik bileşiklerin gradient modda yapılan asetonitril taramasında verilen kromatogramların pik çözünürlükleri Çizelge 4.13.'te verilmiştir. Çizelge 4.13.'ten görüleceği üzere daha düşük asetonitril oranıyla analize başlandığı takdirde benzen-naftalin ve naftalin-floren pik çözünürlükleri daha belirgin bir şekilde artmaktadır. Ancak floren-fenantren ve fenantren-florenten pik çözünürlükleri düşmektedir. Çizelge 4.14.'te ise asetonitril oranının değişimine bağlı olarak kolonun teorik kademe yüksekliği verilmiştir. Asetonitril oranının hareketli faz içerisinde düşmesiyle kolonun teorik kademe yüksekliğinde düşüş gözlenmektedir. Ayrıca bileşiklerde aromatik halka sayısının artmasına bağlı bir kolon teorik kademe yükseklik düşüşü mevcuttur.

Çizelge 4.13. Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	R₂₁	R₃₂	R₄₃	R₅₄
45-60, 30	1.60	2.84	2.04	3.00
40-60, 30	2.85	3.02	1.40	1.61
30-55, 30	4.08	3.51	1.47	1.83

Kromatografik koşullar Şekil 4.18'de verilmektedir.

Çizelge 4.14 Çok halkalı aromatik bileşiklerin hidrofobik kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile gradient mod değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin (μm) değişimi.

Gradient modu (%ACN, zaman(dak))	toluen	naftalin	floren	fenantren	florenten
45-60, 30	315.01	303.52	179.38	155.21	125.63
40-60, 30	292.77	199.62	87.20	82.77	67.00
30-55, 30	147.15	46.50	38.85	34.60	33.18

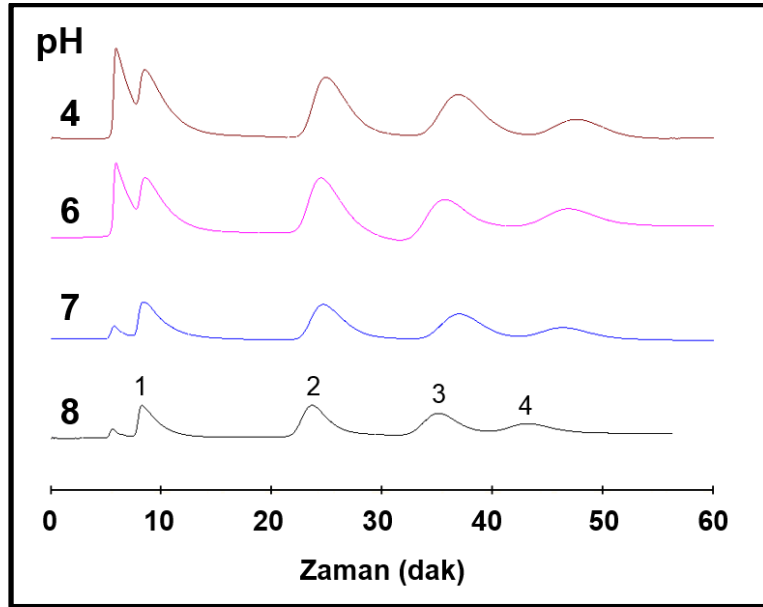
Kromatografik koşullar Şekil 4.18.'de verilmektedir.

4.1.3.4. Monolitik Yapılı MPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonun

Hidrofobik/Katyon Değişimi Etkileşim Kromatografisi

MPBA'daki borik asit grubu sayesinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti, yüklü analitlerle elektrostatik etkileşime girerek dörtlü anilin bileşiğinden oluşan karışımın analizinde sabit faz olarak kullanılmıştır. Lewis asidi davranışı gösteren borik asit hidrasyon yoluyla iyonize olup tetrahedral formda borik anyonu oluşturmaktadır. Böylece analitlerin kolondan elüsyonu asitlik özelliklerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. İyon değişimi kromatografisinde analitlerin elüsyonunu etkileyen

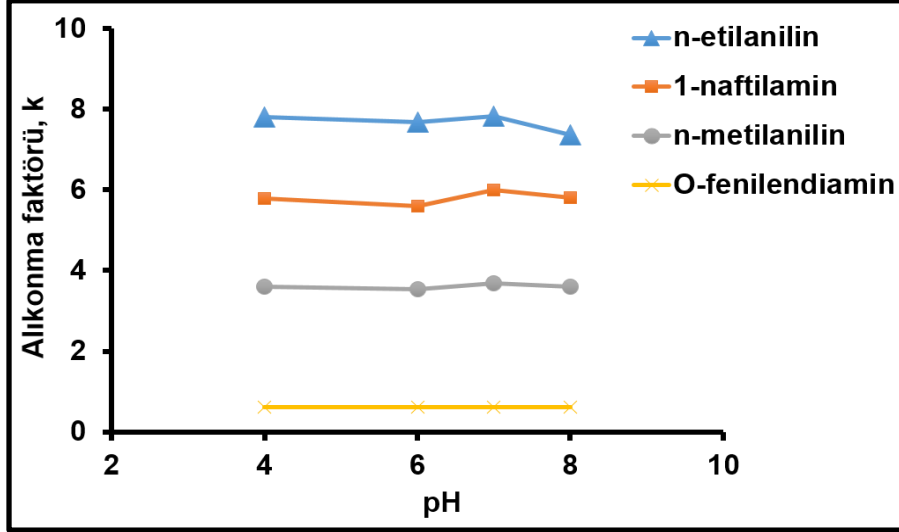
bir diğ er faktör ortamın pH değeridir. Burada hareketli faz olarak ACN/10 mM PBS çözeltisi kullanılmıştır. İzokratik koşullarda sabit akış hızında hareketli faz içerisinde farklı asetonitril/PBS oranlarında, sabit asetonitril/PBS oranında farklı akış hızlarında ve hareketli fazın farklı pH değerlerinde analizler yapılarak asetonitril/PBS oranının, akış hızının ve pH değerlerinin kromatografik performansa olan etkisi incelenmiştir. Şekil.4.19.'da izokratik koşullarda anilinlerin 1.0 µL/dak akış hızında, farklı pH değerlerinde 70/30 (mL/mL) ACN/PBS oranında nano-sıvı kromatografisinde yapılan analizlerinden elde edilen kromatogramlar verilmiştir. Analitler 1. Oo-fenilendiamin, 2. n-metilnilin, 3. 1-naftilamin ve 4. n-etilanilin sırasıyla kolonu terketmişlerdir.



Şekil 4.19. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilnilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: 30/70 ACN/Su (mL/mL) + % 0.1 FA, akış hızı (µL/dk): 0.75, pH değerleri kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Şekil 4.20.'de hareketli fazın pH değerinin değişmesine bağlı olarak analitlerin alıkonma faktörü verilmiştir. Çizelge 4.15.'te ise pH değerine bağlı olarak analitlerin pik çözünürlükleri verilmiştir. Ortamın pH değerinin değişimine bağlı olarak analitlerin alıkonma faktöründe kayda değer bir değişiklik olmadığı, ancak pH

değerinin artmasıyla pik çözünürlüğünde küçük bir artış meydana geldiği söylenebilir. Şekil 4.21.'de ise ortamın pH değişimine bağlı olarak kolonun kademe yüksekliği verilmiştir. Şekilde ortamın pH değerinin değişmesine bağlı olarak, o-fenilendiamin dışındaki diğer analitlerin kolon kademe yüksekliğinin değişimine sebebiyet vermediği görülmüştür.

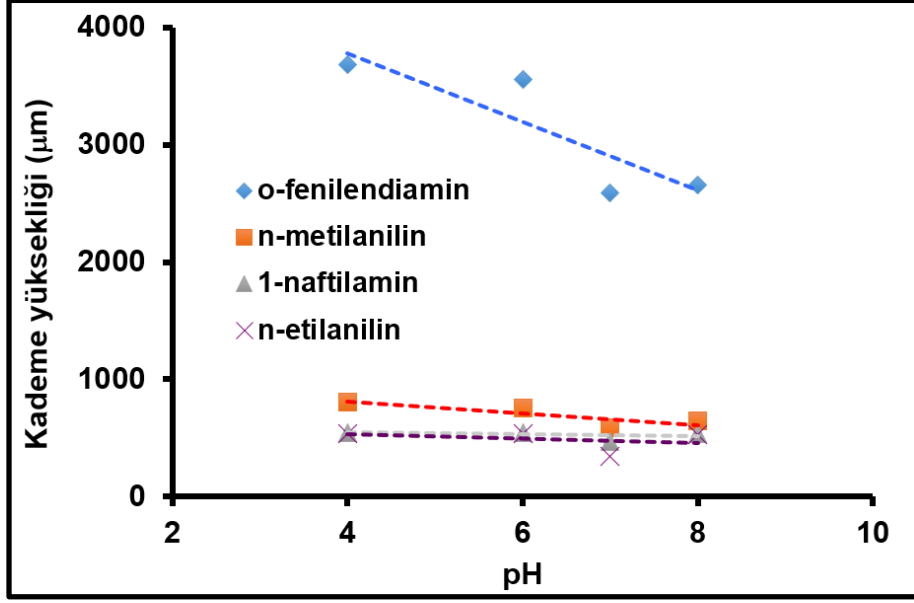


Şekil 4.20. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.19.'da verilmektedir.

Çizelge 4.15. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

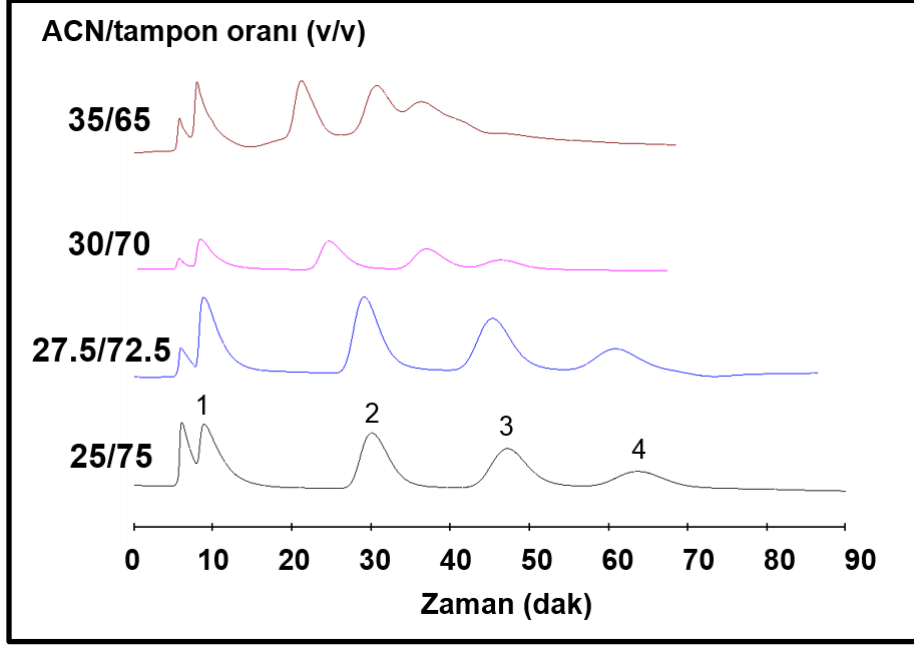
pH	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃
4	2.97	1.73	1.32
6	2.99	1.82	1.46
7	3.31	1.85	1.09
8	3.87	2.03	1.03

Kromatografik koşullar Şekil 4.19.'da verilmektedir.



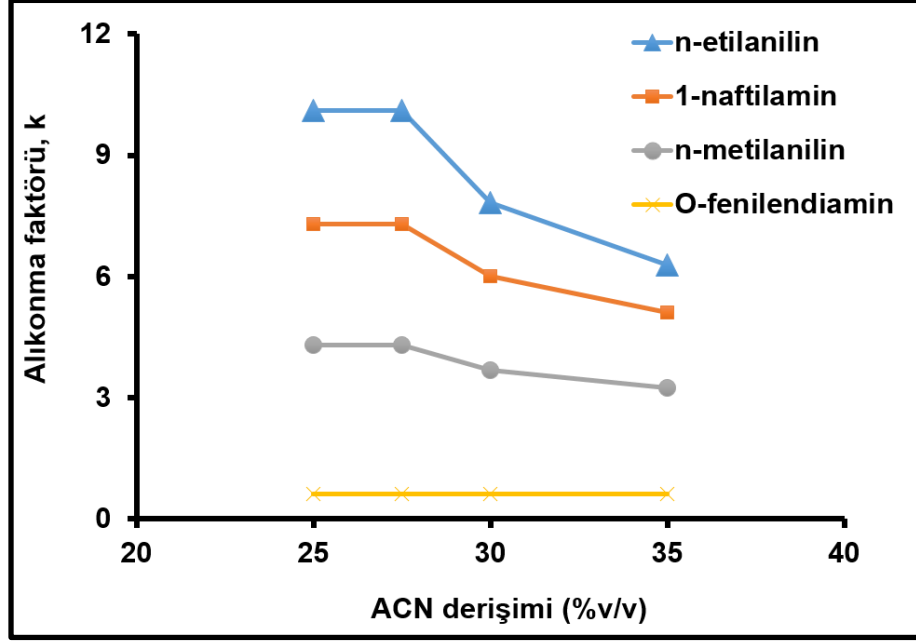
Şekil 4.21. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile pH değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.19.'da verilmektedir.

MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit ile izokratik koşullarda yapılan anilin türevleri ayırımında hareketli fazdaki ACN içeriğinin önemli etkiye sahip olduğu Şekil 4.22.'de görülmektedir. Asetonitril içeriğinin düşmesiyle, hidrofobik etkileşimler güçlenmekte ve bunun sonucunda daha başarılı bir anilin ayırımı gerçekleşmektedir. Aynı şekilde Çizelge 4.16.' dan hareketli faz içerisinde asetonitril derişiminin düşmesiyle analitlerin pik çözünürlüklerinde yükselme olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç, anilinlerin ayırımının sabit faz ve analitler arasında hidrofobik etkileşime dayalı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilanilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: pH 7 ACN/10 mM PBS tamponu (mL/mL) (oranlar kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir), akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$): 0.75, kolon: 300 mm x 100 μm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.

Asetonitril/PBS oranının değişimine bağlı olarak analitlerin alıkonma faktörünü (Şekil 4.23) ve kolonun teorik kademe yüksekliğini (Şekil 4.24) incelediğimizde, hareketli fazda asetonitril içeriğinin artmasıyla n-metilanilin, 1-naftilamin ve n-etilanilin'in alıkonma faktörlerinin düştüğü, o-fenilendiamin'in ise alıkonma faktöründe bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Asetonitril içeriğinin değişimine bağlı olarak ise kolonun teorik kademe yüksekliği n-metilanilin, 1-naftilamin ve n-etilanilin için değişiklik göstermezken, o-fenilendiamin için asetonitril içeriğinin düşmesiyle kolonun teorik kademe yüksekliği artmaktadır.

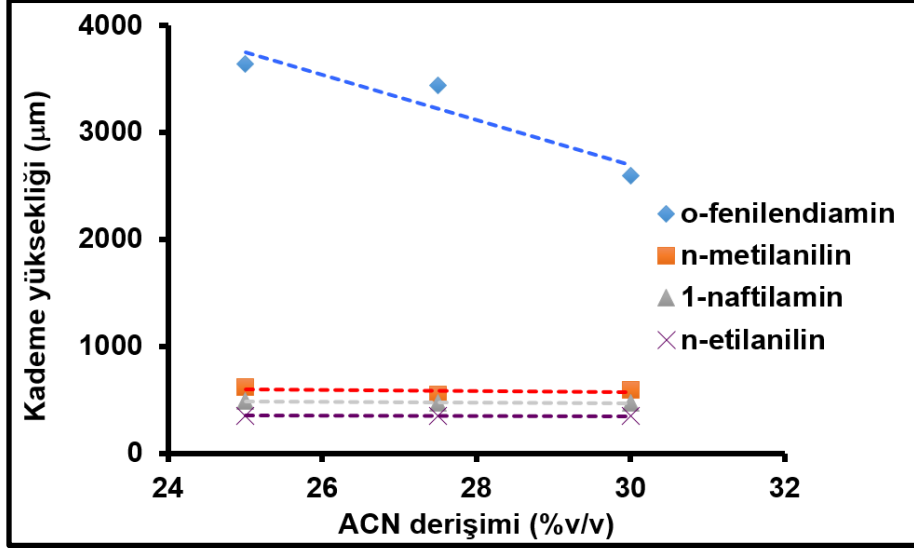


Şekil 4.23. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak alıkonma faktörünün değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.22.'de verilmektedir.

Çizelge 4.16. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

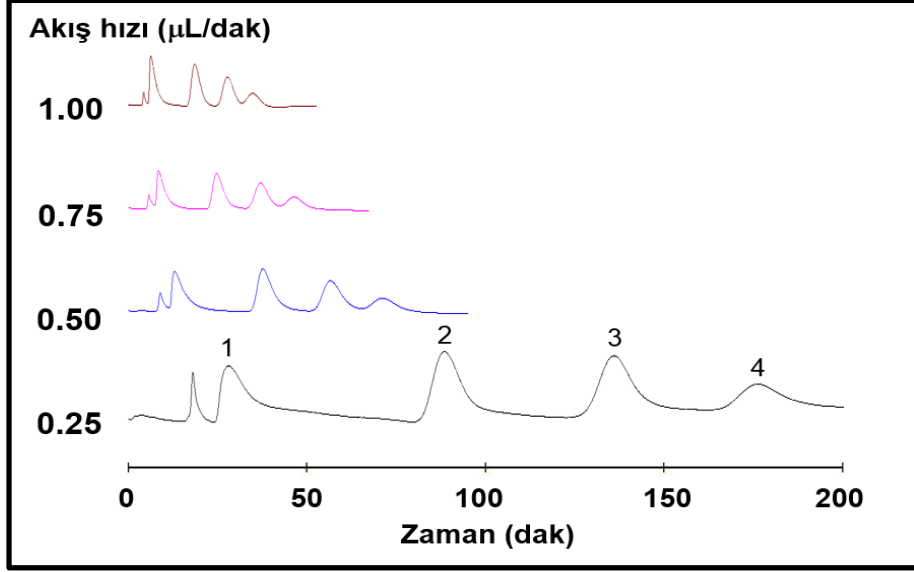
ACN/su (%v/v)	R ₂₁	R ₃₂	R ₄₃
25/75	3.55	2.21	1.68
27.5/77.5	3.53	2.17	1.64
30/70	3.31	1.80	1.09
35/65	3.07	1.64	0.85

Kromatografik koşullar Şekil 4.22.'de verilmektedir.

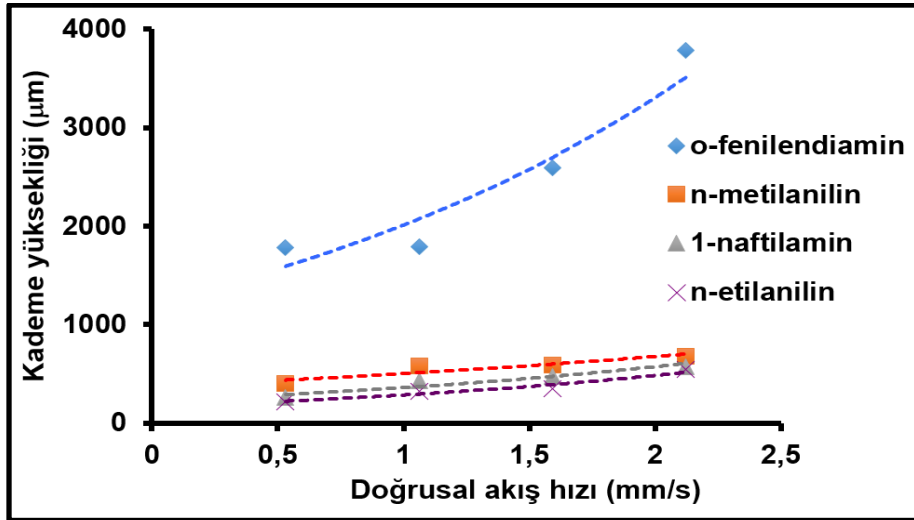


Şekil 4.24. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile ACN derişiminin değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.22.'de verilmektedir.

Anilin ayırımında akış hızının, MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolon performansına etkisinin incelenmesi amacıyla, farklı akış hızlarında yapılan analizlerin kromatogramları Şekil 4.25.'te verilmiştir. Akış hızının düşmesiyle daha başarılı bir ayırımın gerçekleştiği, ancak toplam analiz süresinin de uzadığı görülmektedir. Çizelge 4.17.'de akış hızına karşı verilen analitlerin pik çözünürlüklerinden de görüldüğü gibi akış hızının artmasıyla analit pik çözünürlüklerinde düşüş oluşmaktadır. Şekil 4.26.'da analiz akış hızının değişimine bağlı olarak kolonun kademe yüksekliği verilmiştir. Akış hızının değişimine bağlı olarak o-fenilendiamin dışında diğer analitler için kolonun teorik kademe yüksekliği sabit kalmaktadır.



Şekil 4.25. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak elde edilen kromatogramlar. Analitlerin kolondan elüsyon sırası: 1. o-fenilendiamin, 2. n-metilanilin, 3. 1-naftilamin, 4. n-etilanilin. UV detektör 214 nm, hareketli faz: pH 7 30/70 ACN/10 mM PBS tamponu (mL/mL), akış hızı (µL/dk) oranları kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir, kolon: 300 mm x 100 µm iç çap. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer.



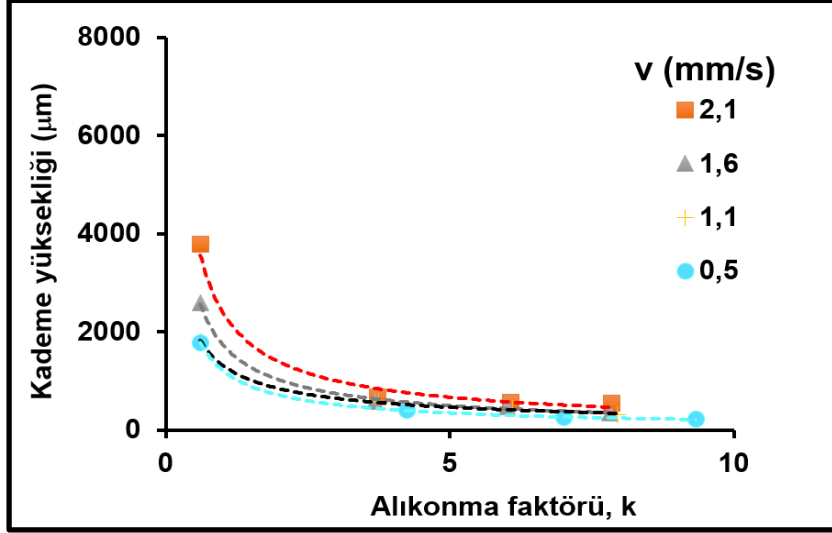
Şekil 4.26. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile doğrusal akış hızının değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.25.'te verilmektedir.

Çizelge 4.17. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile akış hızının değişimine bağlı olarak pik çözünürlüğünün değişimi.

Akış hızı (μL/dak)	R₂₁	R₃₂	R₄₃
0.25	4.25	2.69	1.46
0.50	3.47	1.98	1.19
0.75	3.31	1.80	1.09
1.00	3.16	1.76	1.07

Kromatografik koşullar Şekil 4.25.'te verilmektedir.

Alıkonma süresinden bağımsız kolon performansı incelenmesi ve daha doğru bir değerlendirme için Şekil 4.27.'de değişik doğrusal akış hızlarında kolonun teorik kademe yüksekliğinin alıkonma faktörü ile değişimi verilmiştir. Alıkonma faktörünün büyümesiyle kolonun teorik kademe yüksekliğinde sabitlik gözlenmektedir. Ayrıca daha yüksek alıkonma faktörleri için kolonun kademe yüksekliği daha düşüktür, bu da daha yüksek teorik kademe sayısı demektir. Böylece hidrofobik modda olduğu gibi hidrofobik/katyon değişim kromatografisi modunda da çalışılarak MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitin alıkonma faktöründen bağımsız kromatografik performans sergilediği gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Anilinlerin kromatografik analizinde MPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının kullanımı ile alıkonma faktörünün değişimine bağlı olarak kademe yüksekliğinin değişimi. Monomer/gözenek yapıcı sistem oranı derişimi: 0.35 mg/mg, MPBA derişimi: 406.5 mg MPBA/mL monomer. Kromatografik koşullar Şekil 4.25.'te verilmektedir.

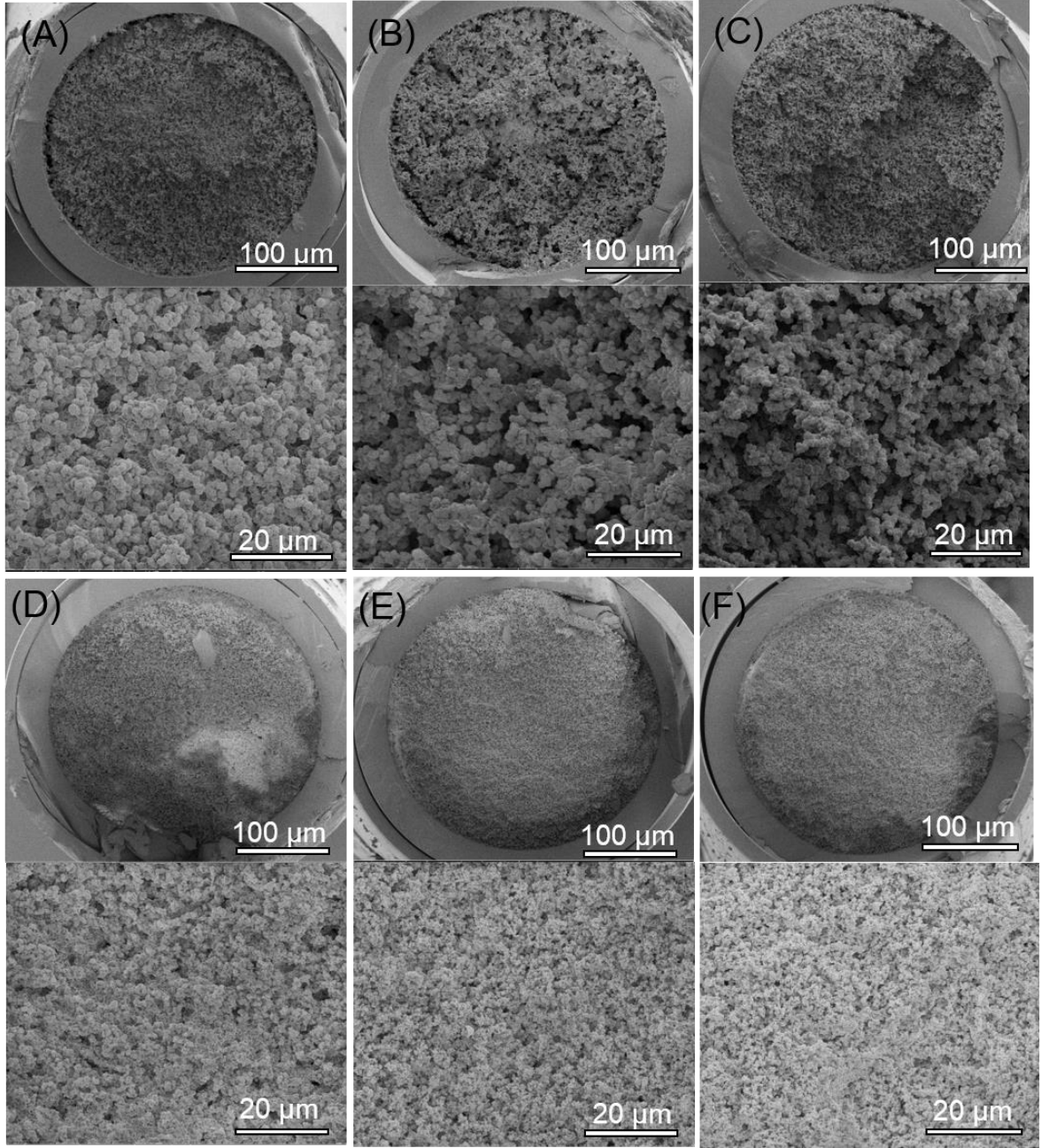
4.2. Serbest Radikal Polimerizasyonu ile VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik, Hibrid Kapiler Kolonların Sentezi.

Ana monomer ve çapraz bağlayıcı görevini üstlenen POSS-MA ve VPBA ligandı varlığında termal polimerizasyon eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu yöntemiyle iç çapı 300 µm, VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıli kapiler hibrid kolonlar sentezlenmiştir. Gözenek yapıcı sistem olarak n-bütanol (mikro gözenek yapıcı) ve etilen glikol (makro gözenek yapıcı), termal başlatıcı olarak AIBN kullanılmıştır. Literatürde termal polimerizasyon için 75°C ve üstü sıcaklıklar [22] tercih edilirken, tez çalışması kapsamında sentezlenen VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların zarar görmemesi amacıyla polimerizasyonu 60°C'lik su banyosunda 24 saat ile gerçekleştirilmiştir. Işık mikroskobu ile monolitik yapı incelenerek düzgün polimerleşmiş monolitik yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) yapının monolitik hibrid olması özellikle POSS-MA varlığında sentezlenmiş olması ve biyolojik moleküllerin izolasyonunda borat affinite kromatografisi modunda kullanılabilir olması çalışmayı ayrıcalıklı kılmaktadır.

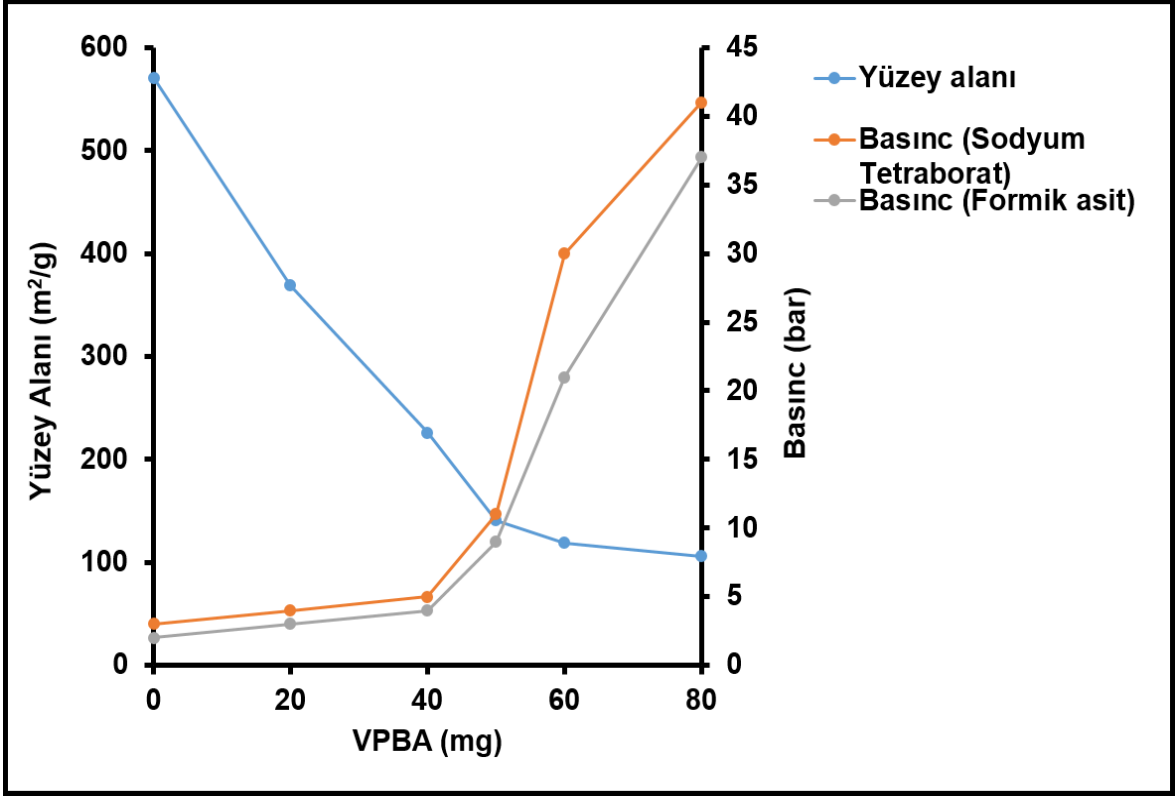
4.2.1. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Kapiler Kolonların Karakterizasyonu

VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların SEM görüntüleri alınarak, Cıva Porozimetresi (CPM) ile gözenek boy dağılımı, XPS ile element içeriği ve BET analizi ile monolitik yapının özgül yüzey alanının tayini ile monolitik yapıların karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca desorpsiyon çözeltisi varlığında akış hızı değişimine bağlı geri basınç değişimi gözlemlenmiş ve kolon geçirgenliği hesaplanmıştır.

Şekil 4.28.'de verilmiş olan SEM fotoğraflarında görüldüğü üzere iç çapı 300 µm termal kapiler kolonlar içinde serbest radikal polimerizasyonu mekanizması ile sentezlenen monolitik yapılı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) kapiler hibrid kolonların düzgün ve homojen morfolojik özellikte oldukları görülmektedir. Ayrıca monolitik yapı içinde VPBA miktarının artmasıyla monolitik yapının sıklaştığı gözlemlenmektedir. Bu durum, Şekil 4.29.'da gösterildiği üzere monolitik yapıda VPBA miktarının artmasıyla kolonların geri basıncının artışı ile de uyum içindedir. Artan VPBA miktarı ile özgül yüzey alanı düşmektedir.



Şekil 4.28. Termal-başlatıcı eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit için SEM fotoğrafları. (A) 0 mg VPBA, (B) 20 mg VPBA, (C) 40 mg VPBA, (D) 50 mg VPBA, (E) 60 mg VPBA ve (F) 80 mg VPBA.



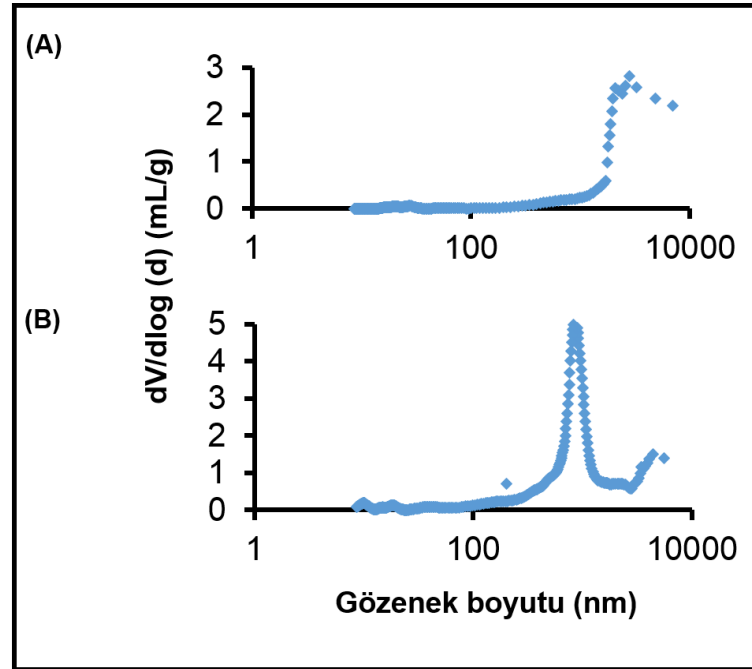
Şekil 4.29. Farklı VPBA derişimindeki VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapılar için yüzey alanı ve geri basınç karşılaştırılması. Hareketli faz: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat ve %3'lük formik asit çözeltisi: Akış hızı: 5 µL/dak, 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.

Şekil 4.29.'da, VPBA miktarının artmasıyla kolonun geri basıncının artışı ve yüzey alanının azalması dışında, %3'lük formik asitte alınan geri basınçların, 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraboratta alınan basınçlara göre daha düşük olduğu söylenebilir. Bu durum yine Çizelge 4.18.'de verilen formik asit ve di-sodyum tetraborattaki geçirgenlik verileri ile uyum içindedir.

Çizelge 4.18. Farklı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların özgül yüzey alanı ve geçirgenlik değerleri.

VPBA miktarı (mg)	Basınc ^a (bar)	^d K0 (m ²)x10 ¹⁴	Basınc ^b (bar)	^e K0 (m ²)x10 ¹⁴	ÖYA ^c (m ² /g)
0	3	65.2	2	77.9	571
20	4	38.8	3	44.4	369
40	5	18.7	4	22.2	226
50	11	13.9	9	15.9	141
60	30	5.8	21	6.5	119
80	41	3.4	37	3.7	106

a: Sodyum tetraboratta alınan basınç (5 µL/dak), b: %3 Formik asitte alınan basınç (5 µL/dak), c: Özgül yüzey alanı, d: Sodyum tetraborat'taki Geçirgenlik, e: %3 Formik asit'teki geçirgenlik.



Şekil 4.30. Termal başlatıcı eşliğinde serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapı için gözenek boy dağılım eğrisi. (A) 0 mg VPBA, (B) 50 mg VPBA.

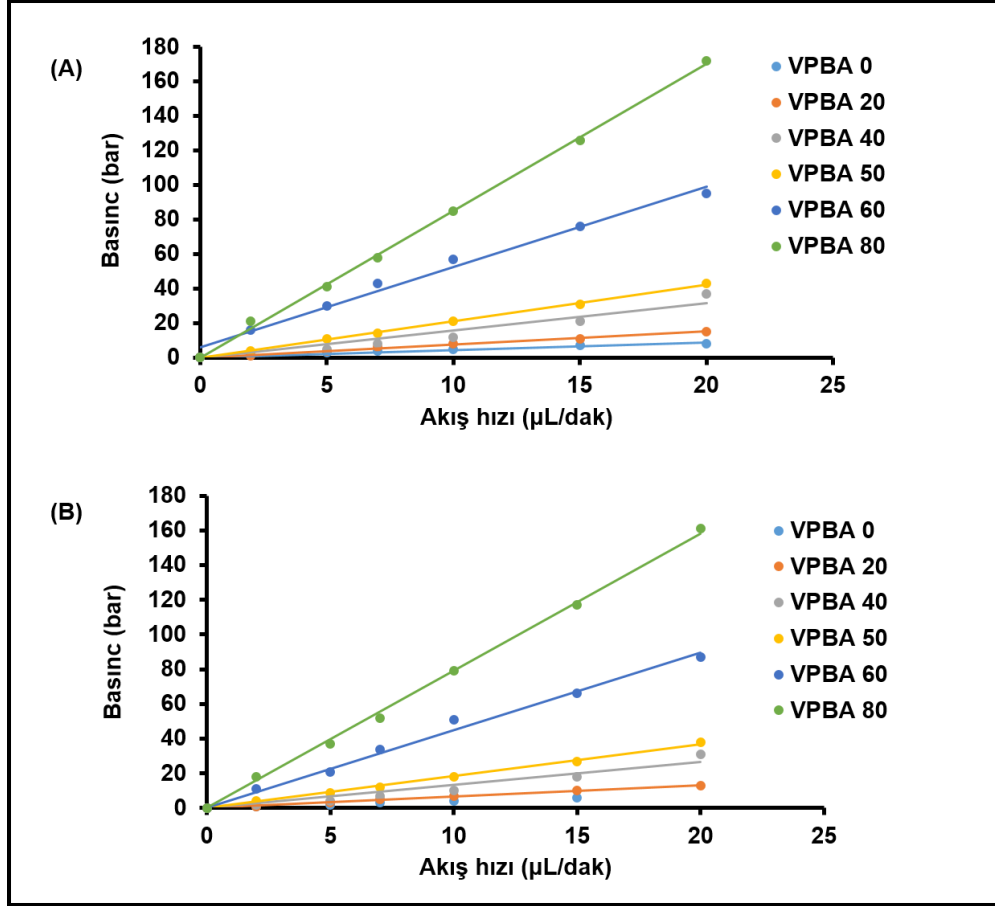
XPS cihazında yapılmış olan element analizinde VPBA 50 kodlu VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının yüzde atom içeriği belirlenerek POSS-MA ve VPBA tayini yapılmıştır. Monolitik yapı içinde genel bileşen tayini için karbon (C) ve oksijen (O) içeriğine, POSS-MA tayini için silisyum (Si) içeriğine ve VPBA içeriği için Bor (B) içeriğine bakılmıştır. Çizelge 4.19.'dan görüldüğü üzere monolitik yapı içinde element içeriği C (1s) > O (1s) > Si (2p) > B (1s) olarak sıralanabilir. POSS-MA ve MPBA'nın moleküler yapıları incelendiğinde XPS analiz sonuçlarının monolitik yapı bileşenleriyle uyum içinde olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.19. XPS analiz sonuçlarına göre VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun yüzde atom içeriği.

	Si (2p)	B (1s)	C (1s)	O (1s)
% Atom içeriği (VPBA 50)	6.76	2.65	64.88	25.71

VPBA 50 kodlu monolitik yapının bileşiği Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Şekil 4.31'de farklı VPBA derişimine sahip VPBA bağlı poli(POSS-MA) monolitik yapıların desorpsiyon çözeltisi varlığında akış hızının değişimine bağlı olarak kolon geri basınç grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.31. Farklı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapılar için geri basınç değerlerinin akış hızı ile değişimi. (A) 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, (B) %3 formik asit, Kolon: 300 μm iç çap x 140 mm uzunluk. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez şartları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

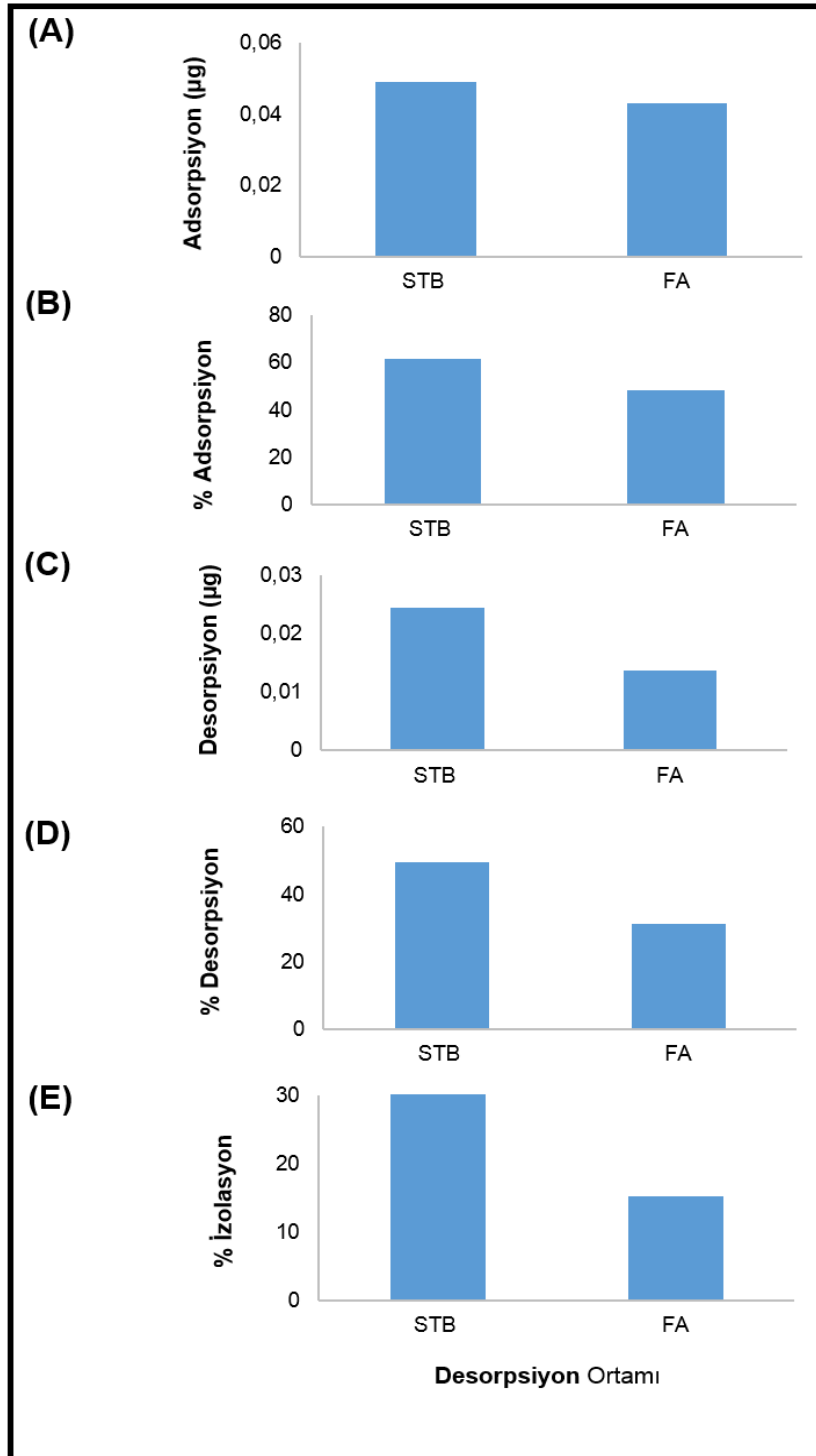
4.2.2. Monolitik Yapılı VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Hibrid Kapiler Kolonların Borat Affinite Kromatografi Sisteminde Kullanımı

VPBA molekülü iyon-değişim sitesi, hidrofilik ligand, hidrofobik ligand ve affinite sitesi olarak iş görmektedir. VPBA'daki borik asit grubundan faydalanarak tez çalışması kapsamında sentezlenen VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapı borat affinite kromatografisinde ovalbumin ve β-NAD izolasyonunda sabit faz olarak kullanılmıştır. Buradaki, borik asit grubu hedef moleküllerin cis-diol grubuyla reaksiyona girerek halkalı ester oluşturmaktadır. Desorpsiyon tampon çözeltisi varlığında borik asit ve hedef moleküllerin cis-diol grubu arasındaki kovalent bağ kopar ve hedef molekülün izolasyonu gerçekleşir. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) hibrid kapiler kolon kullanımıyla adsorpsiyon tampon çözeltisi varlığında ovalbumin/β-

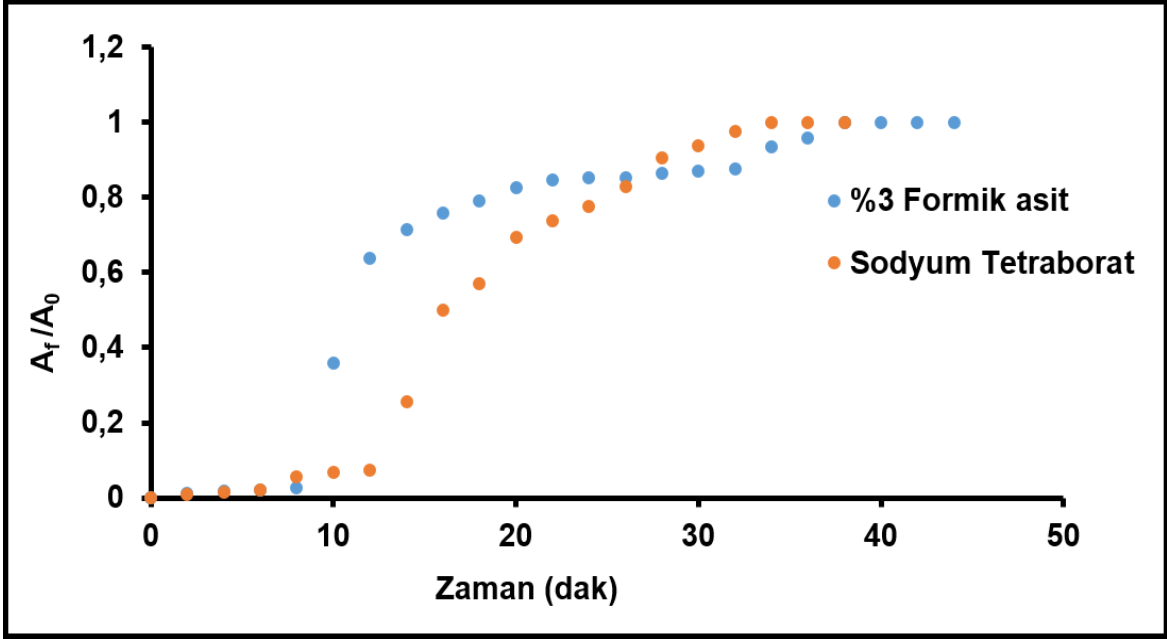
NAD'ın monolitik yapıya tutunması sağlanmış sonrasında ise desorpsiyon tampon çözelti kullanımı ile kolondan elüsyonu sağlanmıştır. Adsorpsiyon tampon çözeltisi olarak 50 mM, pH=8.5 HEPES çözeltisi, desorpsiyon tampon çözelti olarak β -NAD'ın analizinde 50 mM, pH=10.2 di-sodyum tetraborat, ovalbumin analizinde ise %3'lük formik asit kullanılmıştır.

4.2.2.1. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Yapı ile β -NAD İzolasyonu

β -NAD izolasyon analizleri uygun kolonu saptama, optimum β -NAD derişimi ve akış hızını bulmak için farklı VPBA derişimine sahip VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonlar kullanılarak kolon taraması, β -NAD derişim taraması ve akış hızı taraması yapılmıştır. Ancak öncesinde uygun desorpsiyon tampon çözeltisini belirlemek amacıyla VPBA 40 kodlu kolonda desorpsiyon çözeltisi olarak %3'lük formik asit ve 50 mM, pH=10.2 di-sodyum tetraborat kullanımı ile analiz yapılmıştır. Şekil 4.32.'de iki farklı desorpsiyon çözeltisi kullanımı sonucunda kolonun adsorpsiyon miktarı (μ g), % adsorpsiyon verimi, desorpsiyon miktarı (μ g), % desorpsiyon verimi ve % izolasyon verimi gösterilmektedir. Şekil 4.33.'te ise farklı desorpsiyon tampon çözeltisi kullanımıyla gerçekleştirilen analizler için kolon uygunluğunun zamana karşı değişim grafiği verilmiştir. Kolonun β -NAD adsorpsiyon miktarı ve % adsorpsiyon verimi iki farklı desorpsiyon çözeltisinin kullanımıyla beklendiği gibi birbirine yakın değerlerde çıkmıştır. Ancak desorpsiyon miktarı, % desorpsiyon ve % izolasyon verimi formik asitte daha düşük çıkmıştır. Bu durumda uygun desorpsiyon tampon çözeltisi olarak 50 mM, pH=10.2 di-sodyum tetraborat seçilmiştir.

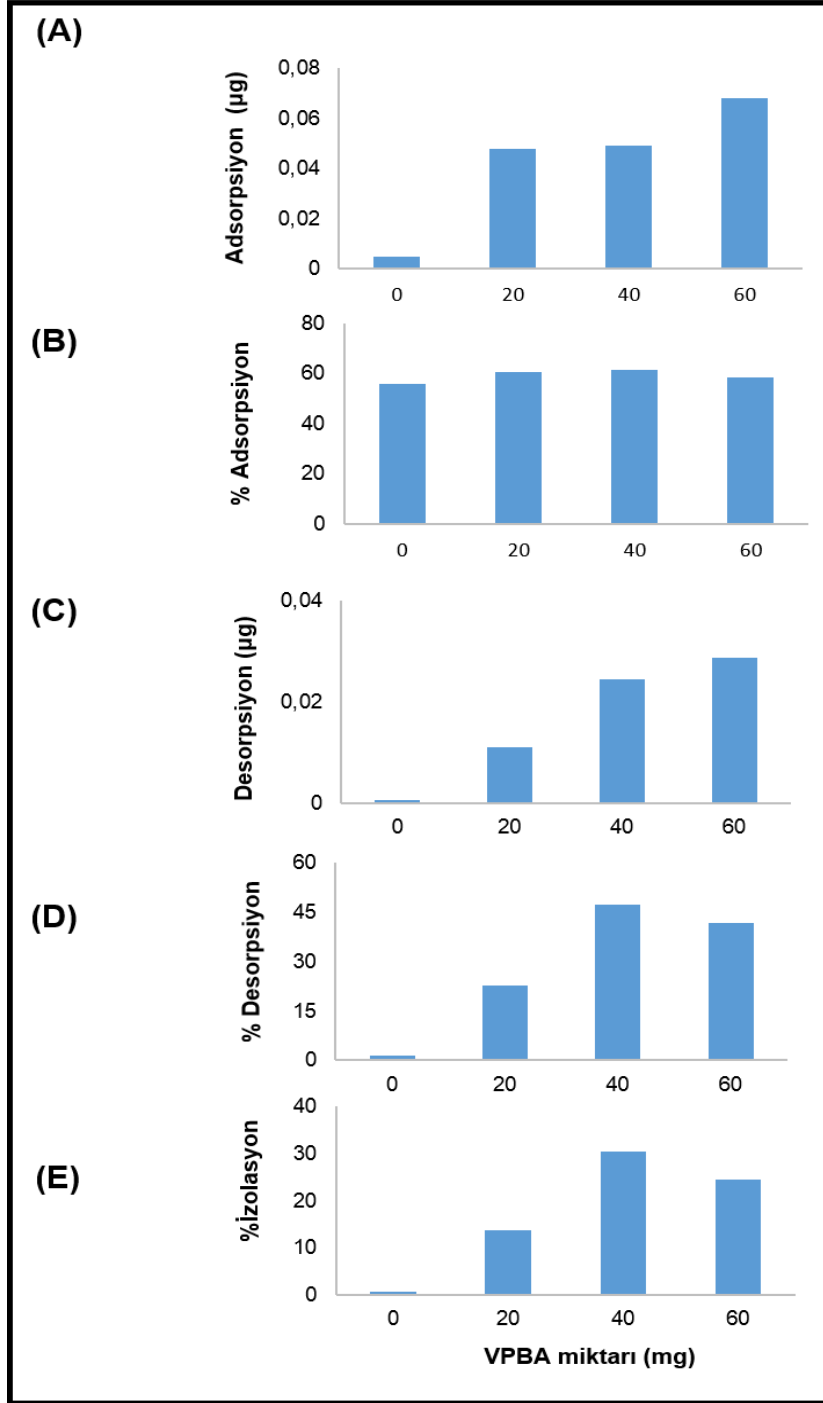


Şekil 4.32. Farklı desorpsiyon çözeltileri kullanılarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; Adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 $\mu\text{L}/\text{dak}$.



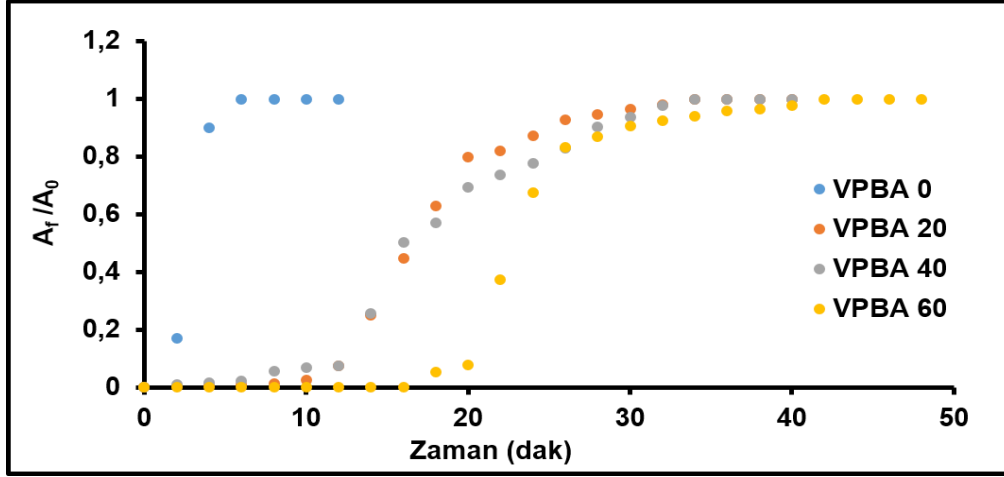
Şekil 4.33. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β -NAD'ın %3 formik asit ve 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat desorpsiyon çözeltileri kullanılarak zaman içerisinde kolonun doygunluğa ulaşımı. Analiz koşulları: adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, monolitik yapının VPBA içeriği: 40 mg, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.

Farklı VPBA derişimine sahip VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların kullanımı ile monolitik yapıda VPBA miktarının artmasına bağlı β -NAD izolasyonu incelenmiştir. Şekil 4.34.'te verilmiş olan grafikler incelendiğinde VPBA miktarının monolitik yapı içerisinde artmasıyla kolonun β -NAD adsoplama kapasitesinin arttığı görülmektedir. VPBA ligandı içermeyen monolitik yapıda β -NAD adsorpsiyonu gerçekleşmemiş denecek kadar düşük (0.005 μ g) miktarda olduğu gözlenmektedir. Ayrıca eşitlik 3.4'te belirtildiği gibi % adsorpsiyon veriminin kolona yüklenen β -NAD miktarına bağlı olarak hesaplanmasıyla elde edilen değerlerin bütün monolitik kolonlarda yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Adsorpsiyonda olduğu gibi monolitik yapıda VPBA miktarının artmasıyla desorpsiyon miktarı ve % desorpsiyon verimi artmıştır. Bu durumda beklenildiği gibi izolasyon veriminde de artış gözlenmektedir. Kolon taramasında en yüksek % adsorpsiyon verimi %62 ile, en yüksek desorpsiyon verimi % 47 ile ve en yüksek izolasyon verimi % 31 ile VPBA 40 kodlu kolon için elde edilmiştir.



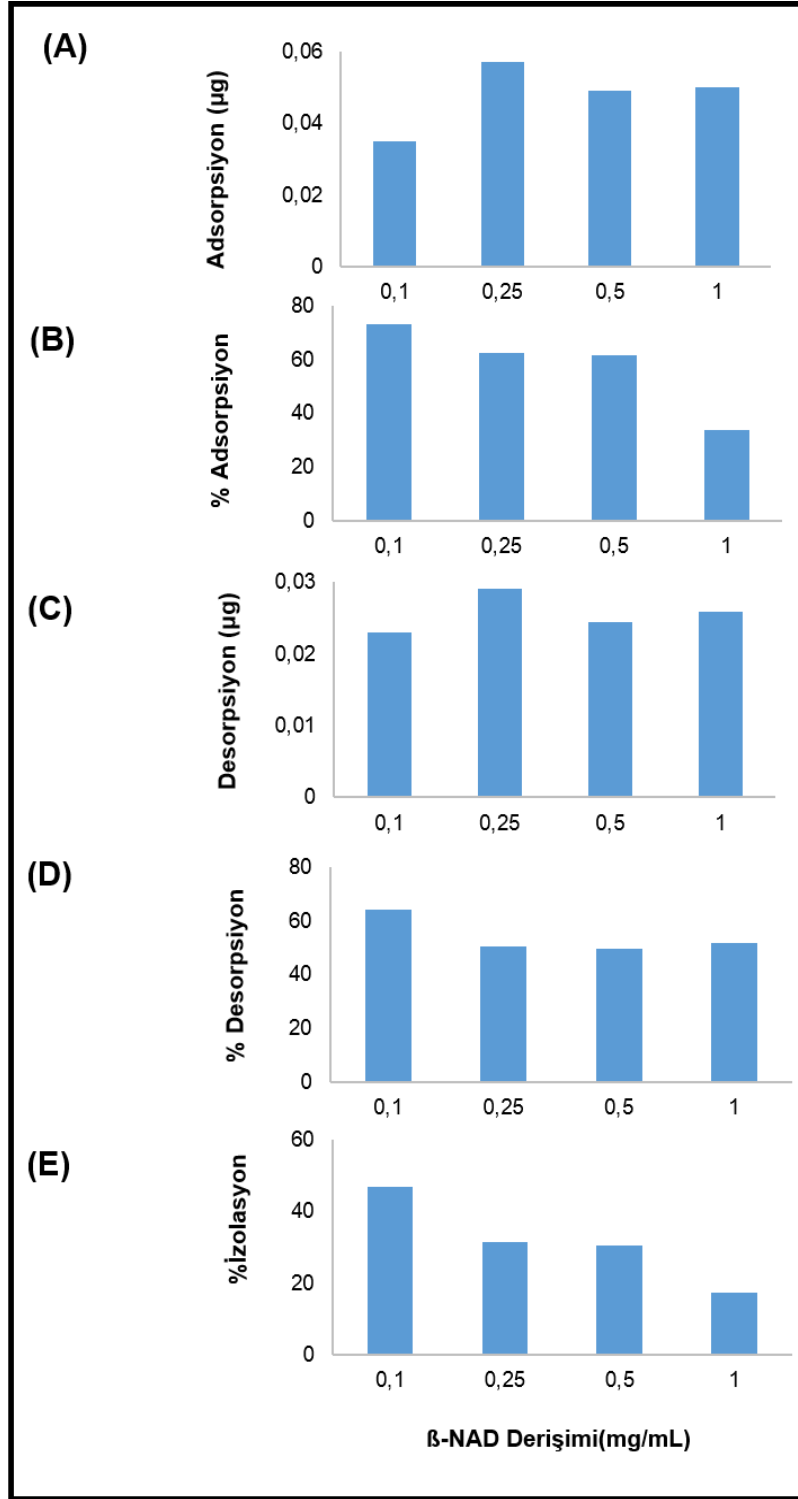
Şekil 4.34. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μ g), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μ g), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların sentez koşulları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Farklı VPBA derişimi içeren VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların zamana karşı kolonun doygunluk grafiği Şekil 4.35.'te verilmiştir. VPBA içermeyen monolitik kolonun dördüncü dakikada doygunluğa ulaştığı ve sonrasında VPBA içeliklerine göre sırasıyla VPBA 20, VPBA 40 ve en geç VPBA 60 kodlu kolonların doygunluğa ulaştığı görölmektedir.



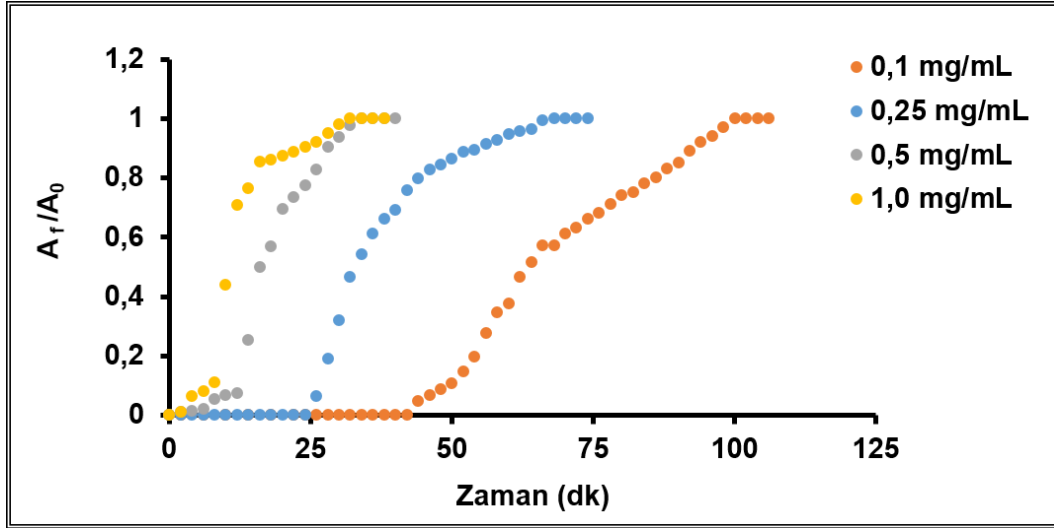
Şekil 4.35. Farklı VPBA miktar içelikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltilisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltilisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların sentez Şartları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Farklı β -NAD derişimlerinde borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile β -NAD'ın adsorpsiyon miktarı (μ g), % adsorpsiyon verimi, desorpsiyon miktarı (μ g), % desorpsiyon ve % izolasyon verimlerini gösteren grafikler Şekil 4.36.'da verilmiştir. β -NAD derişiminin artmasıyla adsorpsiyon değerlerinde birbirine yakınlık gözlenmektedir. Bu durum, kullanılan kolonunun β -NAD derişiminden bağımsız olarak belli bir adsorplama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Desorpsiyon miktarları incelendiğinde burada da bir sabitlik gözlenmektedir β -NAD derişiminin artmasıyla kolona yüklenen β -NAD miktarı da artar. Dolayısıyla Eşitlik 3.8'de olduğu gibi izolasyon verimi yüklenen miktara bağlı olduğundan β -NAD derişiminin artmasıyla izolasyon verimi düşmektedir. β -NAD derişimi taramasında en yüksek % adsorpsiyon verimi %73 ile en yüksek desorpsiyon verimi % 64 ile ve en yüksek izolasyon verimi % 47 ile 0.1mg/mL β -NAD derişiminde gerçeleştirilen analiz için elde edilmiştir.



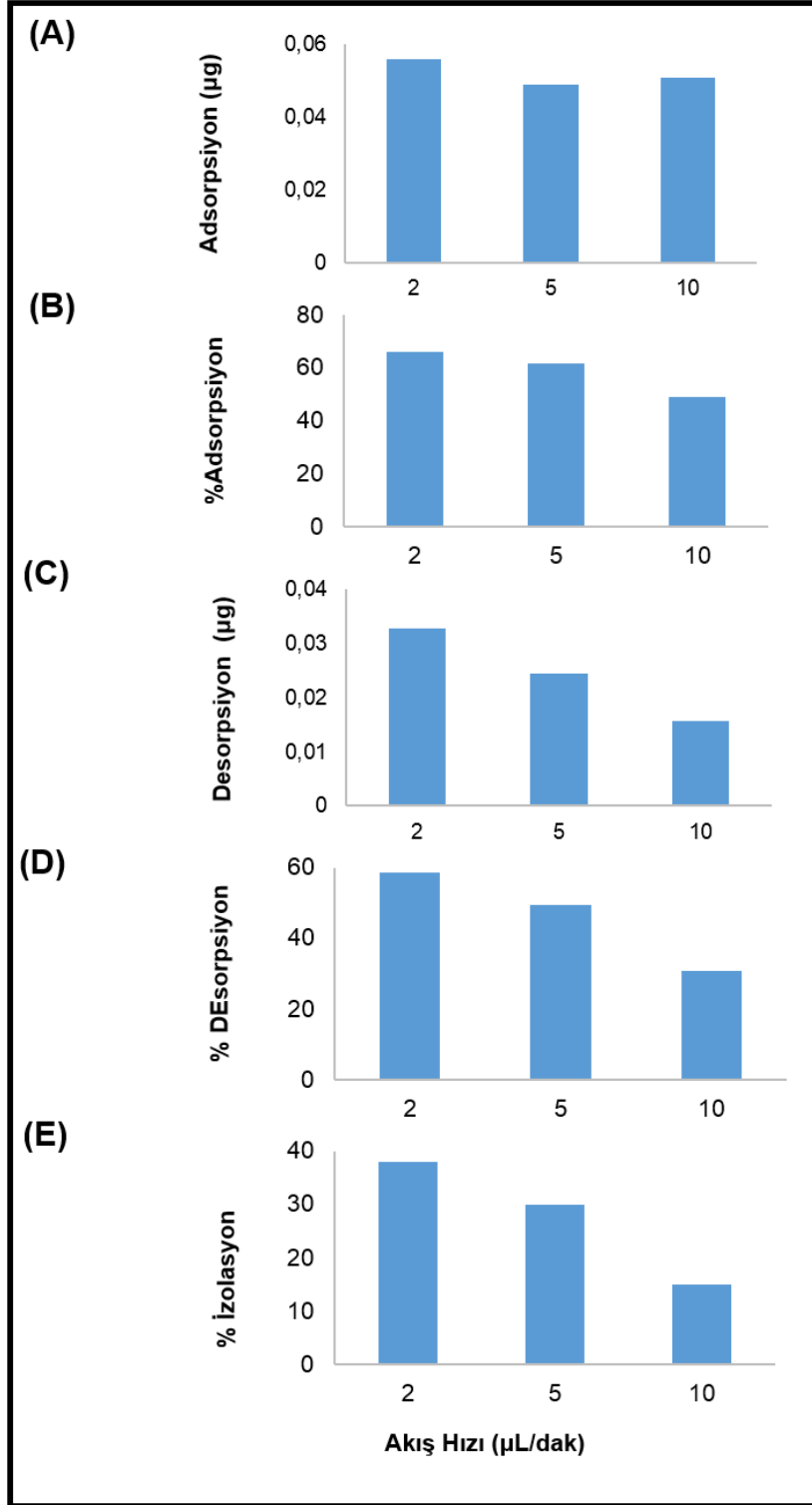
Şekil 4.36. Farklı β -NAD derişimi kullanılarak borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μ g), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μ g), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltilisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltilisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.

Şekil 4.37.'de farklı β -NAD derişimlerinde VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun zamana karşı doğunluk grafiği verilmiştir. şekilde görüldüğü üzere kolona yüklenen β -NAD derişiminin artmasıyla kolonun doğunluğa ulaşması daha kısa sürede gerçekleşmektedir.



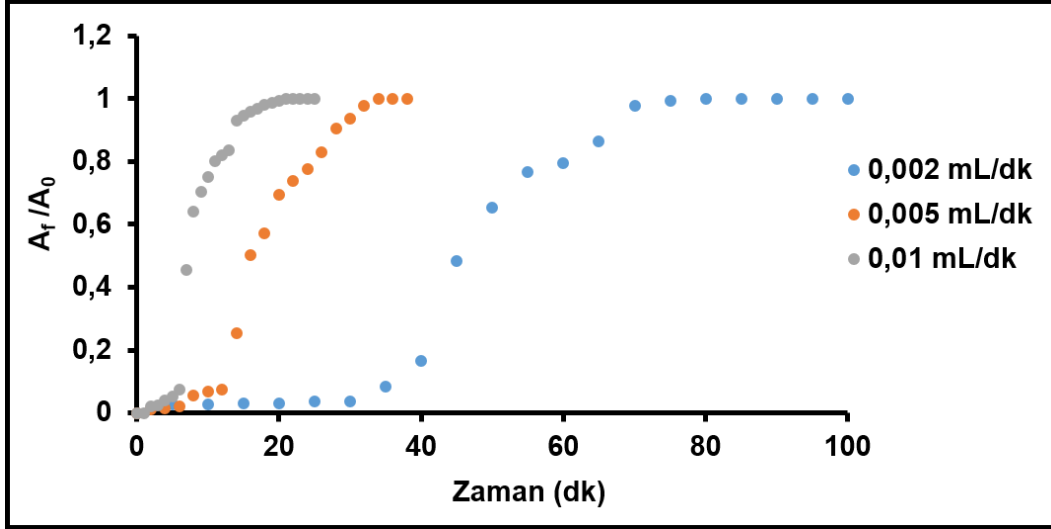
Şekil 4.37. Farklı β -NAD derişimi kullanılarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doğunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.

Kolona verilen farklı akış hızlarında borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile β -NAD'ın, adsorpsiyon miktarı (μ g), % adsorpsiyonu, desorpsiyon miktarı (μ g), % desorpsiyon ve % izolasyon verimlerini gösteren grafikler Şekil 4.38.'de verilmiştir. Akış hızının artmasına bağlı olarak adsorpsiyon değerlerinde kayda değer farklılık gözlenmemektedir. Bu durum VPBA bağlı-poli(POSS-MA) kolonunun akış hızından bağımsız olarak belli bir adsorplama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Desorpsiyon miktarlarını incelediğimizde akış hızının artmasıyla hafif bir düşüklük gözlenmektedir. Daha önce belirttiğimiz gibi izolasyon verimi kolona yüklenen analit miktarıyla ters orantılıdır. Akış hızının artmasına bağlı olarak yüklenen β -NAD miktarı da artmaktadır ve sonuç olarak akış hızının artmasıyla izolasyonda düşüş gözlenmektedir. β -NAD analizinin akış hızı taramasında en yüksek adsorpsiyon verimi %66 ile en yüksek desorpsiyon verimi % 59 ile ve en yüksek izolasyon verimi % 38 ile 2 μ L/dak akış hızında gerçekleştirilen analiz için elde edilmiştir.



Şekil 4.38. Farklı akış hızlarında borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit ile β -NAD'ın, (A) Adsorpsiyonu (μg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μm iç çap x 140 mm uzunluk.

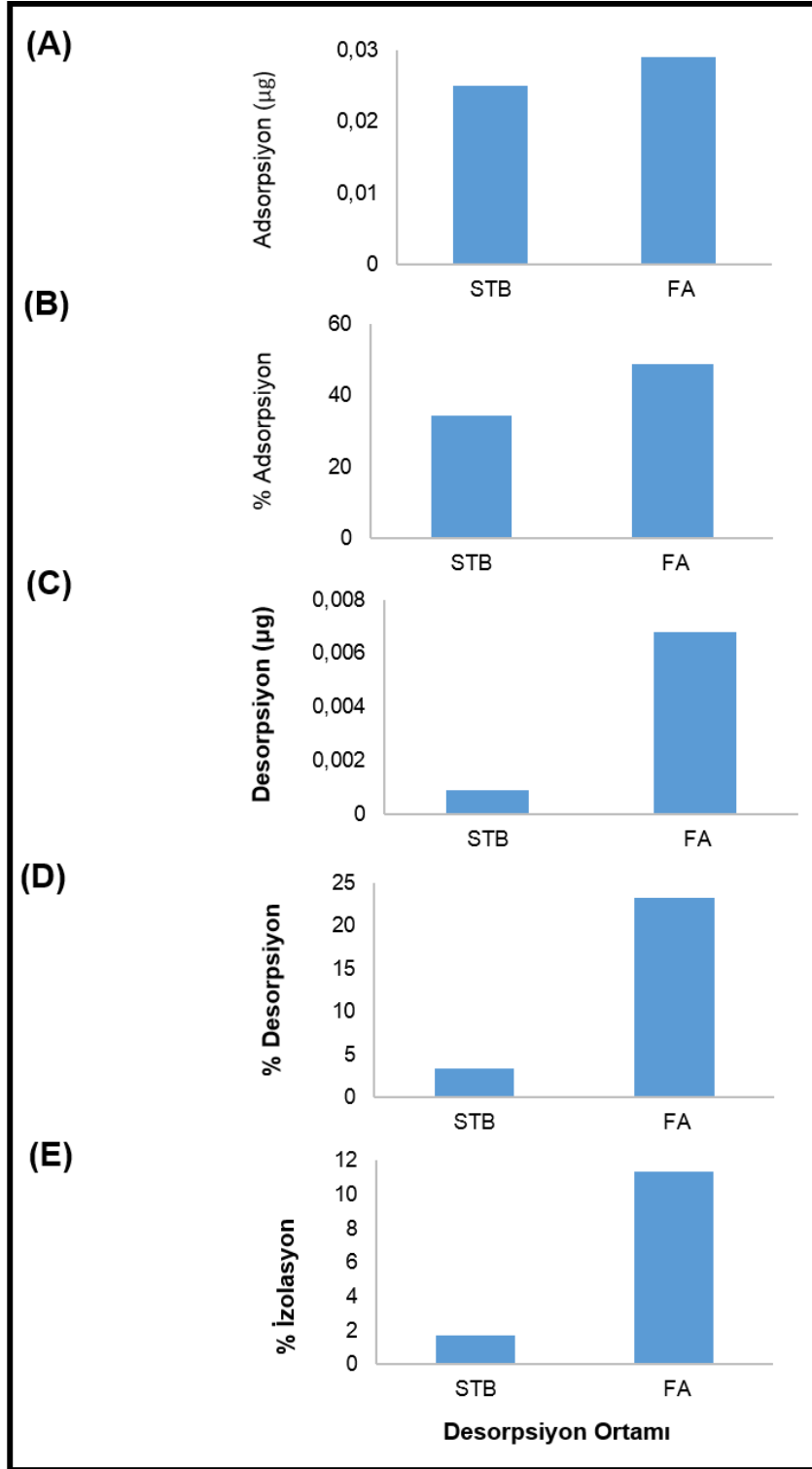
Şekil 4.39.'da farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun zamana karşı doygunluk grafiği verilmiştir. Kolona verilen akış hızının artmasıyla kolona yüklenen β -NAD miktarı artmaktadır, böylece şekilde görüldüğü gibi kolonun doygunluğa ulaşması daha kısa sürede gerçekleşmektedir.



Şekil 4.39. Farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözelti: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat, monolit VPBA içeriği: 40 mg, β -NAD derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk.

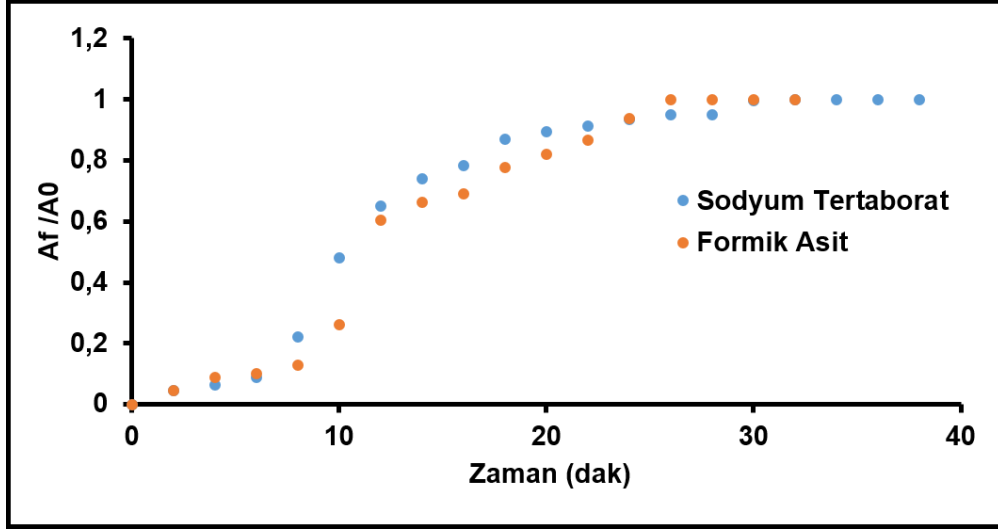
4.2.2.2. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) Monolitik Hibrid Yapı ile Ovalbumin İzolasyonu

Ovalbumin izolasyon analizlerinde uygun kolonu saptama, optimum ovalbumin derişimini ve optimum analiz akış hızını belirlemek amacıyla farklı VPBA derişimine sahip VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonlar kullanılarak kolon taraması, farklı ovalbumin derişiminde numunelerin kullanımı ile ovalbumin derişim taraması ve farklı akış hızlarında analizin gerçekleştirilmesiyle akış hızı taramaları yapılmıştır. β -NAD analizlerinde olduğu gibi burada da öncesinde ovalbumin için uygun desorpsiyon tampon çözeltisinin belirlenmesi için analizler yapılmıştır. %3'lük formik asit ve 50 mM, pH=10.2 di-sodyum tetraborat desorpsiyon çözeltileri kullanılarak, adsorpsiyon miktarı (μ g), % adsorpsiyon verimi, desorpsiyon miktarı (μ g), % desorpsiyon ve % izolasyon verimlerini gösteren grafikler Şekil 4.40.'ta verilmiştir.



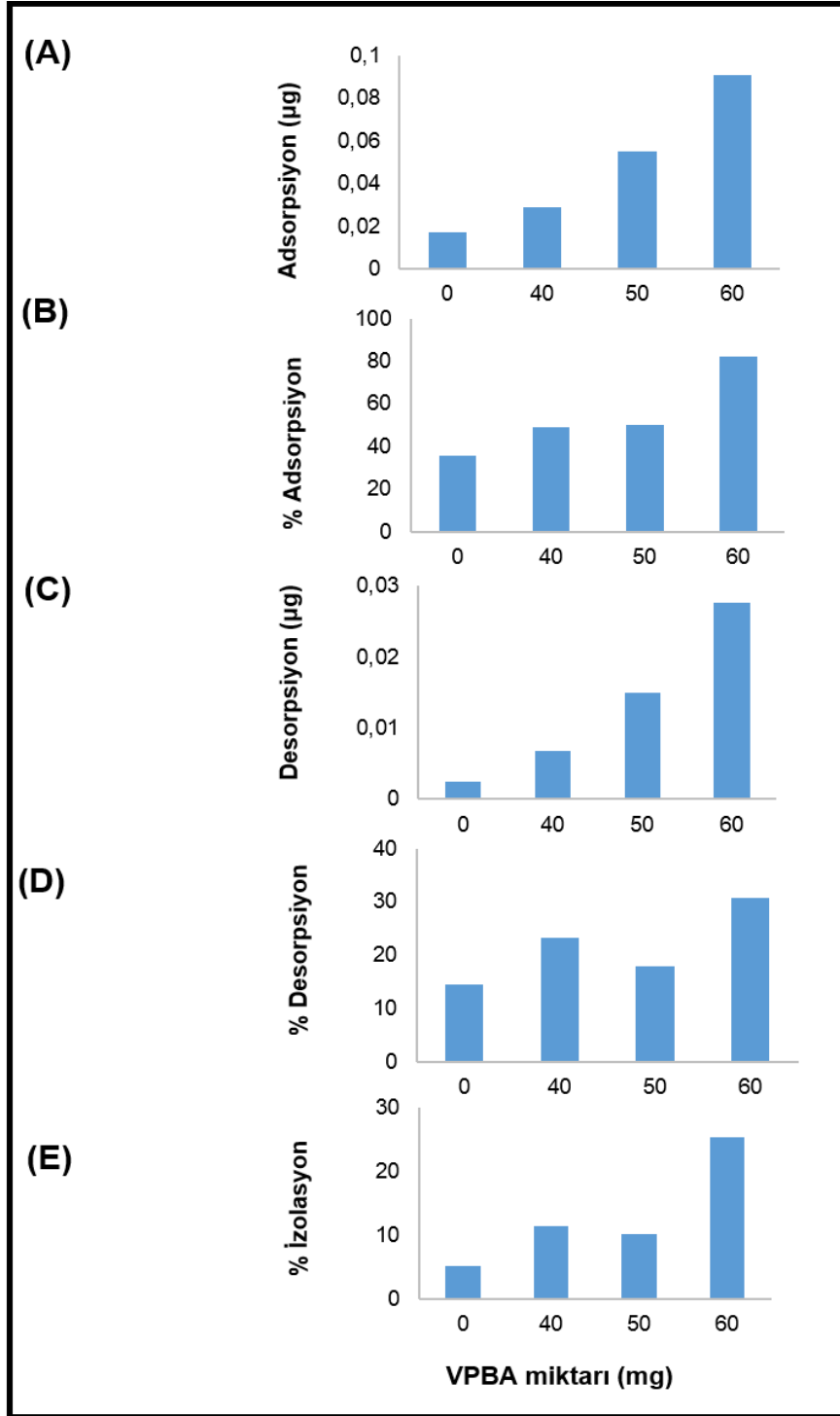
Şekil 4.40. Desorpsiyon çözelti kullanımı ile VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolit ile borat affinite kromatografisi modunda ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (μg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (μg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük Formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 μm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μL /dak.

Şekil 4.40.'ta elde edilen verilere göre iki farklı desorpsiyon tampon çözeltisinin kullanımı ile yapılan analizlerde ovalbumin adsorpsiyon miktarları birbirine yakındır. Ancak desorpsiyon miktarı, % desorpsiyon ve izolasyon verimleri değerlerinde farklılık gözlenmiştir. Bunun sonucunda Ovalbumin analizleri için %3'lük formik asit uygun desorpsiyon tampon çözeltisi olarak belirlenmiştir. Şekil 4.41.'de ise farklı desorpsiyon tampon çözeltisi kullanımıyla gerçekleştirilen analizler için kolonun doygunluğunun zamana karşı değişimini ifade eden grafik verilmiştir.



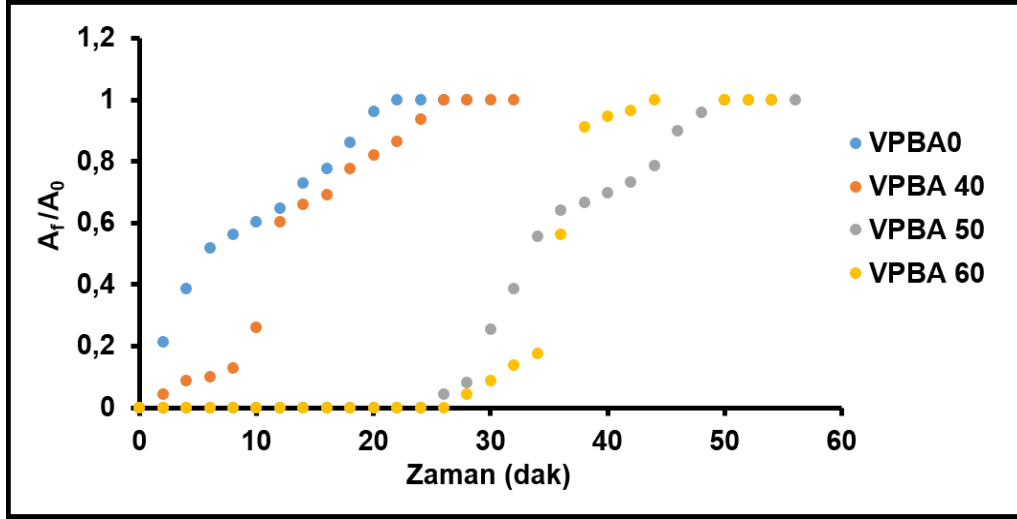
Şekil 4.41. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda ovalbumin'in %3'lük formik asit ve 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat desorpsiyon çözeltileri kullanılarak zaman içerisinde kolonun doygunluğa ulaşımı. Analiz koşulları: adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, monolitik yapının VPBA içeriği: 40 mg, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı 5 µL/dak.

Farklı VPBA derişimine sahip VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların kullanımı ile monolitik yapıda VPBA miktarın artmasına bağlı olarak ovalbumin izolasyonu incelenmiştir. Analiz sonuçlarının grafikleri Şekil 4.42.'de verilmiştir. Monolitik yapıda VPBA içeriğinin artmasıyla kolonun ovalbumin adsorplama kapasitesinin artmakta olduğu görülmektedir. Aynı zamanda monolitik yapıda VPBA miktarının artmasıyla desorpsiyon miktarı, % desorpsiyon ve % izolasyon verimi artmıştır. Sonuçlar, VPBA miktarının polimerizasyon çözeltisi içerisinde artmasıyla kolon seçiciliğinin arttığını göstermektedir. Kolon taramasında en yüksek adsorpsiyon verimi %80 ile, en yüksek desorpsiyon verimi % 31 ile ve en yüksek izolasyon verimi %25 ile VPBA 60 kodlu kolon için elde edilmiştir.



Şekil 4.42. Farklı VPBA miktar içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile borat affinite kromatografisi modunda ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük Formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez koşulları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

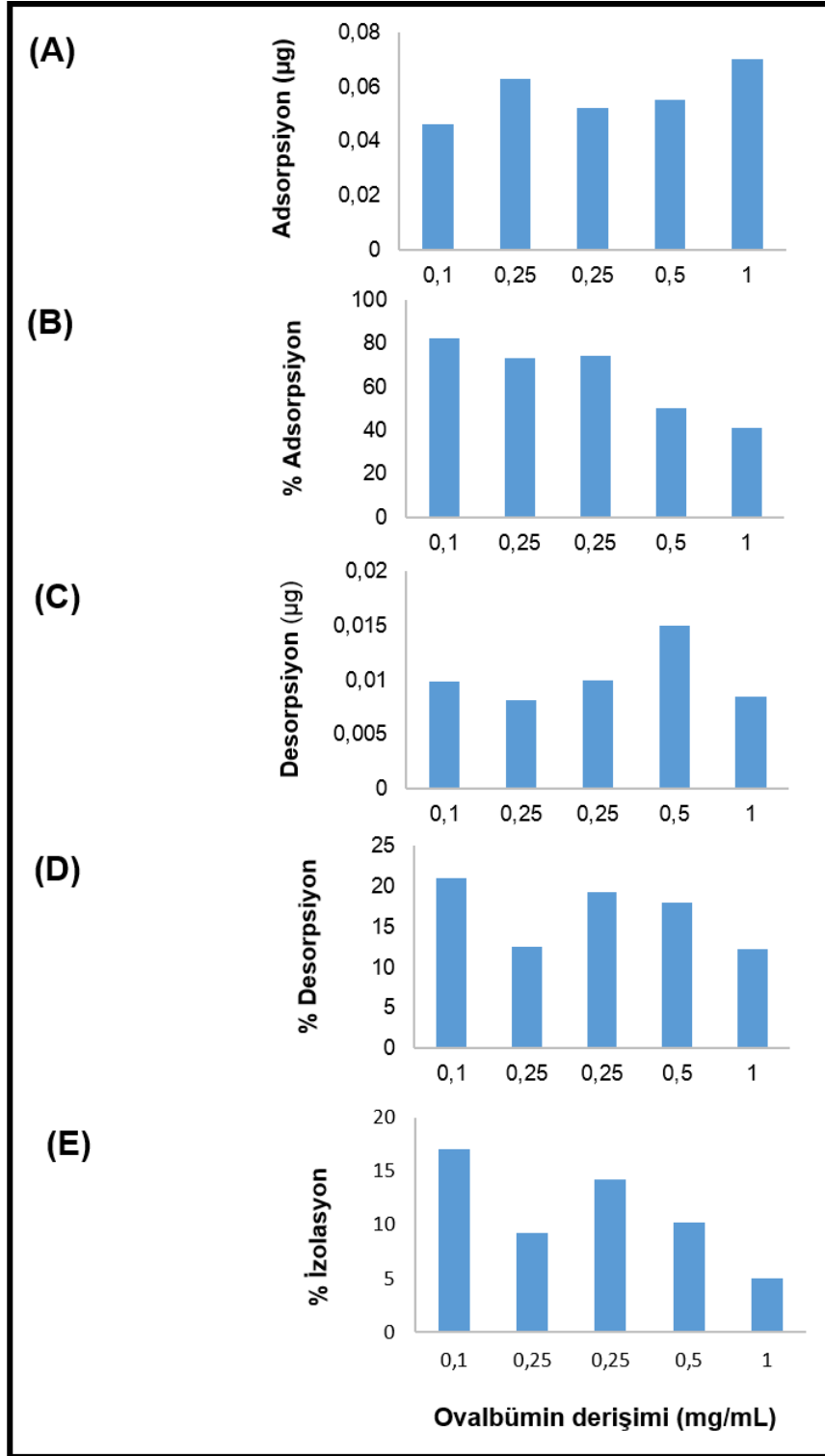
Şekil 4.43.'te ise farklı VPBA derişimi içeren VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların zamana karşı doygunluk grafiği verilmiştir. VPBA içermeyen monolitik kolon en kısa sürede doygunluğa ulaşmaktadır, daha sonra sırasıyla 40 mg, 50 mg ve en son 60 mg VPBA içeren kolon doygunluğa ulaşmıştır. Kolonun monolitik yapısında VPBA miktarının artmasıyla kolonun daha uzun sürede doygunluğa ulaşması daha yüksek ovalbumin adsorpsiyonunu göstermektedir.



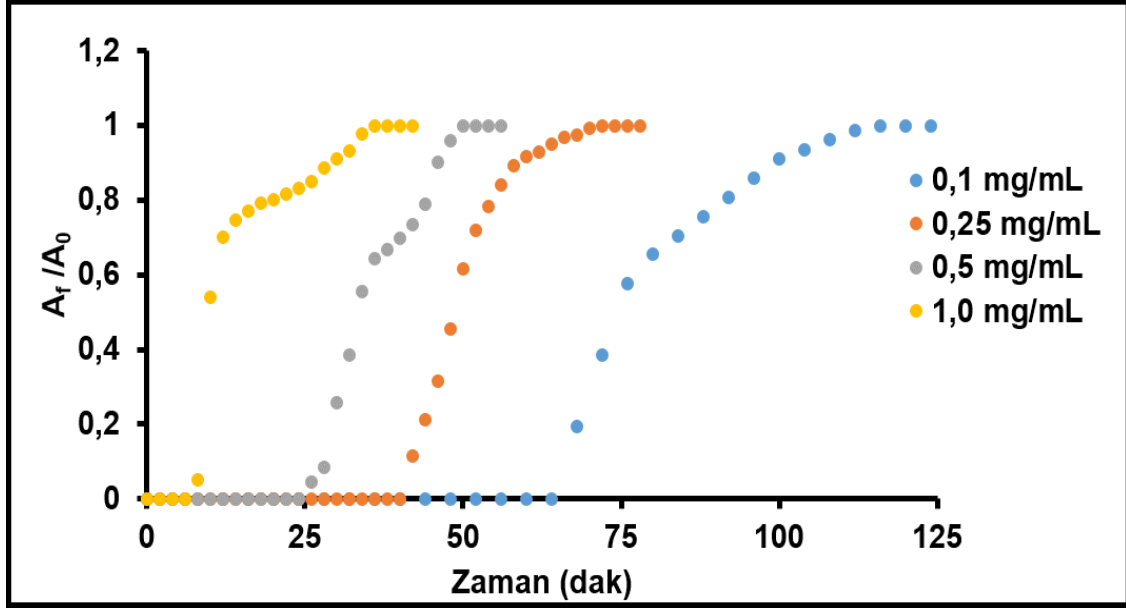
Şekil 4.43. Farklı VPBA miktarı içerikli VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonların farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük formik asit çözeltisi, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak. VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapıların sentez koşulları Çizelge 3.1.'de vermiştir.

Borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile farklı ovalbumin derişimlerinde analiz yapılmış ve ovalbumin'in adsorpsiyon miktarı (µg), % adsorpsiyon verimi, desorpsiyon miktarı (µg), % desorpsiyon ve % izolasyon verimlerini gösteren grafikler Şekil 4.44.'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre ovalbumin derişiminin artmasıyla, ovalbumin adsorpsiyon miktar değerlerinde belli bir artış veya azalma yoktur. Bu sonuç VPBA bağlı-poli(POSS-MA) kolonunun ovalbumin derişiminden bağımsız olarak belli bir ovalbumin miktarı adsorplama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Farklı ovalbumin derişimleri için desorpsiyon miktarları incelendiğinde en yüksek desorpsiyon miktarı 0.015 µg ile 0.5 mg/mL ovalbumin derişimi için elde edilirken bu miktarın diğer ovalbumin derişimleri için elde edilen desorpsiyon verilerinden çok uzak değerde olmadığı ve

sonuç olarak desorpsiyon miktarında sabit olduğu söylenebilir. Bu durum sonucunda, %3 formik asit çözeltisinin sabit yüzey alanına sahip bir monolitik yapı için sabit desorpsiyon etkisi sergilediği söylenebilir. Ovalbumin derişiminin artmasına bağılı olarak kolona yüklenen ovalbumin miktarı artmaktadır. Eşitlik 3.8'e göre izolasyon veriminin yüklenen analit miktarı ile ters orantılı olması sebebiyle ovalbumin derişiminin artmasıyla izolasyon verimi düşmektedir. Şekil 4.45.'de farklı ovalbumin derişimlerinde VPBA bağılı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun zamana karşı doygunluk grafiğinden gözlemlendiği gibi kolona yüklenen ovalbumin derişiminin artmasıyla kolonun doygunluğa ulaşması daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Sırasıyla en kısa sürede 1.0 mg/mL, sonra 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL ve en uzun sürede 0.1mg/mL ovalbumin derişimi kullanımında kolon doygunluğa ulaşmıştır. Ovalbumin derişim taraması için yapılan analizlerde en yüksek % adsorpsiyon verimi % 82 ile 0.1 mg/mL ovalbumin derişimi için elde edilirken en yüksek % desorpsiyon ve % izolasyon verimleri sırasıyla %21 ve % 17 ile yine 0.1 mg/mL ovalbumin derişimi için elde edilmiştir.

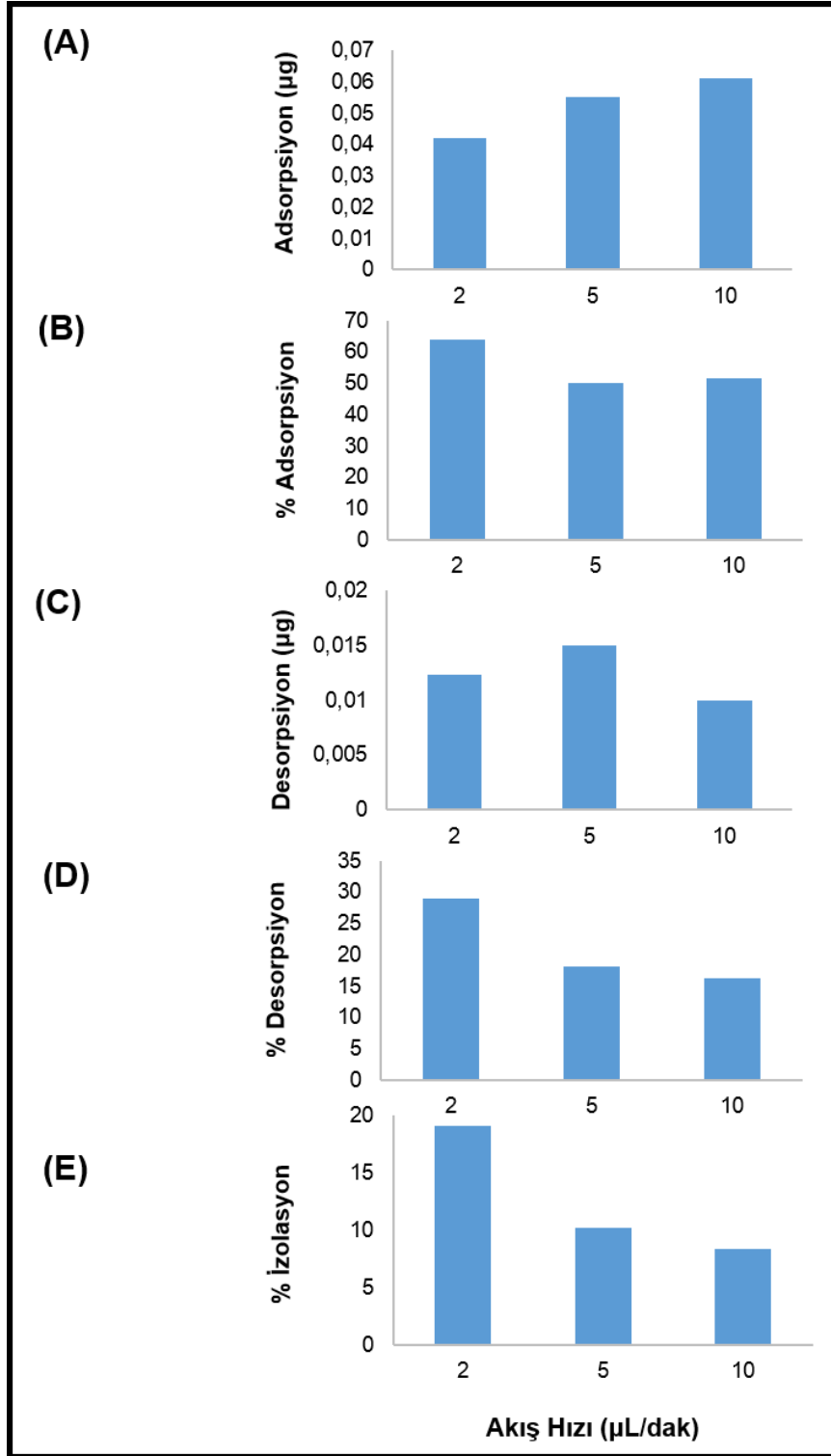


Şekil 4.44. Farklı Ovalbünin derişimi kullanılarak borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağı-poli(POSS-MA) monoliti ile ovalbünin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM, pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük Formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 µL/dak.



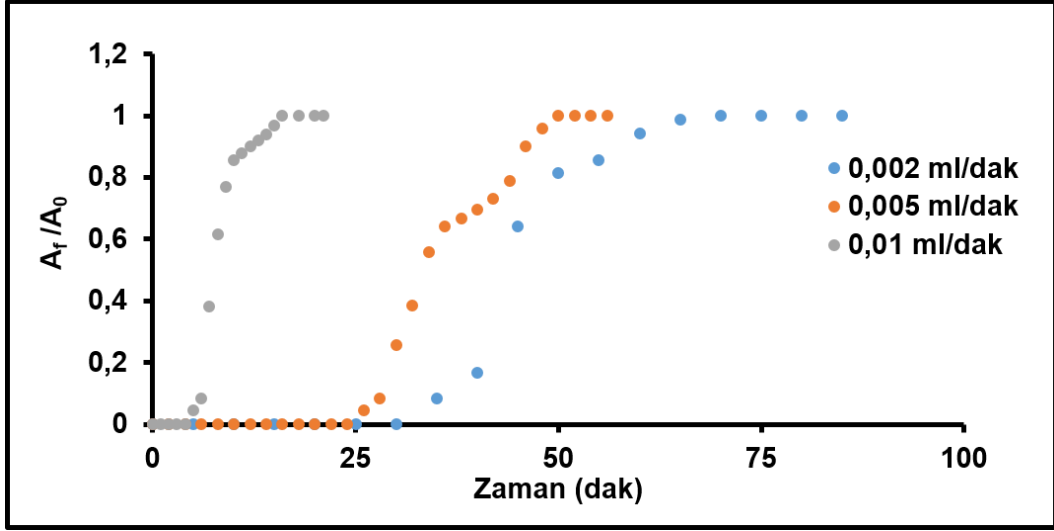
Şekil 4.45. Farklı ovalbumin derişimleri kullanılarak VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doğgunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk, kolona verilen akış hızı: 5 μ L/dak.

Borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monoliti ile ovalbumin'in izolasyonu için yapılan akış taramasında, ovalbuminin adsorpsiyon miktarı (μ g), % adsorpsiyon verimi, desorpsiyon miktarı (μ g), % desorpsiyon ve % izolasyon verimlerini gösteren grafikler Şekil 4.46.'da verilmiştir. Akış hızının artmasına bağlı olarak adsorpsiyon değerlerinde hafif bir artış görülsede değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu (2 μ L/dak için 0.042 μ g, 5 μ L/dak için 0.055 μ g, 10 μ L/dak için 0.061 μ g,) söylenebilir. Bu sonuç VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik yapının akış hızından bağımsız olarak belli bir adsorplama kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Desorpsiyon miktarları incelendiğinde akış hızının artmasına bağlı olarak belli bir artış veya azalma olmadığı, sabitliğin söz konusu olduğunu söyleyebiliriz. İzolasyon verimi incelendiğinde daha önce de belirtildiği gibi yükleme miktarının artmasıyla verim düşmektedir. Akış hızının artmasına bağlı olarak yükleme miktarının artışı meydana gelmektedir. Akış hızının artmasıyla ovalbumin izolasyon verimi gözlemlendiği gibi düşmektedir. Ovalbumin analizinin akış hızı taramasında en yüksek adsorpsiyon verimi %61 ile en yüksek desorpsiyon verimi % 29 ile ve en yüksek izolasyon verimi % 20 ile 2 μ L/dak akış hızında gerçekteşen analiz için elde edilmiştir.



Şekil 4.46. Farklı akış hızlarında borat affinite kromatografisi modunda VPBA bağlı-poli(POSS-MA)) monoliti ile ovalbumin'in, (A) Adsorpsiyonu (µg), (B) % Adsorpsiyonu, (C) Desorpsiyonu (µg), (D) % Desorpsiyonu ve (E) % İzolasyonu verilmiştir. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM Ph=8,5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük Formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, ovalbumin derişimi: 0,5 mg/mL, kolon: 300 µm iç çap x 140 mm uzunluk.

Şekil 4.47.'de farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun zamana karşı doygunluk grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kolona verilen akış hızının artmasıyla, kolona yüklenen ovalbumin miktarı artmaktadır. Sonuç olarak kolon daha kısa sürede doygunluğa ulaşmaktadır.



Şekil 4.47. Farklı akış hızlarında VPBA bağlı-poli(POSS-MA) monolitik kolonun farklı zamanlarda doygunluğa ulaşması. Analiz koşulları; adsorpsiyon tampon çözeltisi: 50 mM pH=8.5 HEPES, desorpsiyon tampon çözeltisi: %3'lük formik asit çözeltisi, monolit VPBA içeriği: 50 mg, ovalbumin derişimi: 0.5 mg/mL, Kolon: 300 μ m iç çap x 140 mm uzunluk.

5. SONUÇLAR

- Tez kapsamında foto başlatıcı kullanılarak tiyol-en kimyasıyla yeni MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik hibrid yapı sentezlenmiştir. Monolitik yapının hibrid olması, yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip olması, çok modlu kromatografi sisteminde sabit faz olarak kullanılabilir olması, tek basamaklı bir mekanizma ile tiyol-en kimyasıyla 30 dakika gibi kısa bir sürede hazırlanabilir olması, MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik yapıya özgünlük kazandıran en önemli özelliklerdir.
- Ayrıca tez çalışması kapsamında borat affinite kromatografisinde kullanım amacıyla termal başlatıcı kullanılarak serbest radikal polimerizasyonu ile VPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik hibrid yapı sentezlenmiştir.
- MPBA bağlı-poli (POSS-MA) ve VPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik yapıların SEM analizi ile morfolojik yapı incelemesi, BET analizi ile özgül yüzey alanları ve gözenek boy dağılımı tayini, XPS analizi ile monolitik yapı bileşen içeriklerinin belirlenmesi yapılmıştır. SEM görüntülerine göre monolitik yapıların düzgün morfolojik özelliklere sahip olması ve monolitik yapının kolon çeperine düzgün bir şekilde tutunmuş olması, uygulanan silanizasyon işleminin başarısını ortaya koymaktadır.
- MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik yapı alkilbenzenlerin ve çok halkalı aromatik bileşiklerin izokratik ve gradient modda ters faz kromatografisinde ayrımını için sabit faz olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunda analitlerin elüsyon sırasının hidrofobik özelliklerine bağlı olduğu ve ters faz kromatografisine uyum sağlayarak gerçekleştiği görülmüştür. İzokratik koşullarda sabit akış hızı için asetonitril oranının artırılmasıyla teorik kademe yüksekliğinde artış gözlenmektedir. Sabit asetonitril/su oranı için ise akış hızının değişimine bağlı olarak teorik kademe yüksekliğinde bir değişiklik gözlenmemektedir. Gradient modda yapılan zaman taraması analizlerinde yine zamanın değişimine bağlı olarak teorik kademe yüksekliğinde bir değişiklik gözlenmemektedir. Bu durum MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik kolonun hem izokratik hem de gradient koşullarda analit alıkonma süresinden bağımsız performans sergilediğini göstermektedir.
- MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik yapı ayrıca anilin bileşiklerinin hidrofobik/kasyon değişim kromatografisi sisteminde izokratik modda sabit faz olarak kullanılmıştır. Yapılan pH taraması, asetonitril ve akış hız taraması sonucunda pH, asetonitril oranı ve akış hızının değişimine bağlı olarak o-fenilendiamin hariç diğer

analitlerin kolonun teorik kademe yüksekliğinin değişimine etki etmediklerini göstermiştir. Hidrofobik modda olduğu gibi hidrofobik etkileşim/kasyon değişim kromatografisi modunda da çalışıldığında MPBA bağlı-poli (POSS-MA) monoliti, analitlerin alıkonma süresinden bağımsız kolon performansı sergilediği görülmüştür.

- Alıkonma süresinden bağımsız kolon performansı durumu monolitik yapıların sentezinde kullanılan 10 metakrilat grup içerikli POSS-MA'nın hem monomer hem de çapraz bağlayıcı olarak görev almasıyla çapraz bağ yoğunluğunun artmasına dayanmaktadır.
- VPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik hibrid kolon borat affinite kromatografisinde β -NAD ve ovalbumin izolasyonunda kullanılmıştır.
- Analitler için en uygun desorpsiyon tampon çözeltisini belirlemek için VPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik kolonda desorpsiyon tampon çözeltisi taraması yapılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirilerek β -NAD için en uygun desorpsiyon tampon çözeltisi olarak 50 mM pH=10.2 di-sodyum tetraborat seçilmiştir. Ovalbumin için ise %3 formik asit uygun bulunmuştur.
- Monolitik yapı içerisindeki en uygun VPBA miktarını belirlemek amacıyla farklı VPBA miktarı içeren VPBA bağlı-poli (POSS-MA) monolitik kolonlar ile analizler yapılmıştır. Elde edilen verilere göre VPBA miktarının monolitik yapı içerisinde artmasıyla hem β -NAD hem de ovalbumine karşı kolon seçiciliğinin arttığı görülmüştür.
- β -NAD analizlerinde VPBA 40 kodlu kolon kullanılırken ovalbumin analizlerinde VPBA 50 kodlu kolon kullanılmıştır. β -NAD ve ovalbumin derişim taraması sonrasında akış hızı taraması yapılmıştır. Elde edilen verilere göre analit derişiminin değişimine ve kolona verilen akış hızının değişimine bağlı olarak kolonun adsorplama kapasitesinde belirgin bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç kolonun analit derişiminden ve akış hızından bağımsız kolon performansı sergilediğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Aydoğan C., Boronic Acid-Fumed Silica Nanoparticles Incorporated Large surface Area Monoliths For Protein Separation By Nano-Liquid Chromatography, *Anal Bioanal Chem*, 408, 8457–8466, **2016**.
- [2] Nischang I., Bruggemann O., On The Separation Of Small Molecules By Means of Nano-Liquid Chromatography With Methacrylate-Based Macroporous Polymer Monoliths, *J. Chromatogr. A*, 1217, 5389–5397, **2010**.
- [3] Nischang I., On The Chromatographic Efficiency Of Analytical Scale Column Format Porous Polymer Monoliths: Interplay Of Morphology And Nanoscale Gel Porosity, *J. Chromatogr. A*, 1236, 152– 163, **2012**.
- [4] Nischang I., Porous Polymer Monoliths: Morphology, Porous Properties, Polymer Nanoscale Gel Structure And Their Impact On Chromatographic Performance, *J. Chromatogr. A*, 1287, 39– 58, **2013**.
- [5] Kip ., Erkakan D., Gökaltun A., elebi B., Tuncel A., Synthesis Of A Reactive Polymethacrylate Capillary Monolith And Its Use As A Starting Material For The Preparation Of A Stationary Phase For Hydrophilic Interaction Chromatography In Nano-Lc, *J. Chromatogr. A*, 1396, Pages 86–97, **2015**.
- [6] “<https://theanalyticalscientist.com/issues/0313/future-separations/>”, (Nisan, **2017**).
- [7] Ettre L.S, Chromatography The Separation Technique Of The 20th Century, *Cromatographia*, Vol.51, No 1/2, 7-17, **2000**.
- [8] Fairchild J.N., *Multidimensional Liquid Chromatography Separations*, Doktora Tezi, University of Tennessee, Knoxville, **2010**.
- [9] KİP F. ., *Poli (Akriyat) Bazlı Reaktif Sabit Fazların Geliştirilmesi Ve Mikro-Sıvı Kromatografisi Sisteminde Kromatografik Performanslarının Tanımlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2015**.
- [10] Perry S.G., Amos R., Brewer P.I., *Practical Liquid Chromatography*, Plenum Press, New York-London, **1972**.

- [11] Muhammad P., Li D. and Liu Z., *Boronate Affinity Chromatography*, Research Gate, DOI: 10.1002/9780470027318.a9414, **2015**.
- [12] Corradini D., *Handbook of HPLC*, 2. Baskı, CRC Press, **2011**.
- [13] Harris C.D., Lucy A.C., *Quantitative Chemical Analysis*, 9.Baskı, W.H. Freeman and Company Basımevi, New York, **2016**.
- [14] Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., *Analitik Kimya Temel İlkeler*, 8.Baskı, Bilim Yayımcılık, Ankara, **2004**.
- [15] “<http://cevre.erciyes.edu.tr/dosyalar/dokumanlar/1.D%C3%B6nem%20deney%20f%C3%B6yleri/kromotografi.pdf>” (Nisan, **2017**).
- [16] “http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kromatografik%20Analizler.pdf” (Nisan **2017**).
- [17] Wang W., He M., Wang C., Wei Y., Enhanced Binding Capacity Of Boronate Affinity Adsorbent Via Surface Modification Of Silica By Combination Of Atom Transfer Radical Polymerization And Chain-End Functionalization For High-Efficiency Enrichment Of Cis-Diol Molecules, *Anal Chim Acta.*, 886, 66-74, **2015**.
- [18] Xue Y., Shi W., Zhu B., Gu X., Wang Y., Yan C., Polyethyleneimine-Grafted Boronate Affinity Materials For Selective Enrichment Of Cis-Diol-Containing Compounds, *Talanta, Volume 140*, , Pages 1-9, **2015**.
- [19] WANG H.Y., LI L., ZHAO Y.F., Preparation Of Molecularly Imprinted Polymers Functionalized With Core–Shell Magnetic Nanoparticles For The Recognition Of Glycoprotein, *Atlantis Press*,668-672, **2015**.
- [20] Lianbing, R., Yunchun, L., Mingming D., Zhen, L., Synthesis Of Hydrophilic Boronate Affinity Monolithic Capillary For Specific Capture Of Glycoproteins By Capillary Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 8421-8425, **2009**.

- [21] Jiang HP., Qi CB., Chu JM., Yuan BF., Feng YQ., Profiling Of Cis-Diol Containing Nucleosides And Ribosylated Methabolites By Boronate-Affinity Organic-Silica Hybrit Monolithic Capillary Licuid Cromatography-Mass Spectrometry, *Sci Rep.*, 5, 77-85, **2015**.
- [22] Huang H., Lin Z., Lin Y., Sun X., Xie Y., Zhang L., Preparation And Evaluation Of Poly(4-vinylphenylboronic acid-co-pentaerythritoltriacylate) Monolithic Column For Capillary Liquid Chromatography Of Small Molecules And Proteins, *Journal of Chromatography A*, 1251, 82– 90, **2012**.
- [23] Ren L.B., Liu Z., Dong M.M., Ye M.Y., Zou H.F., Synthesis And Characterization Of A New Boronate Affinity Monolithic Capillary For Specific Capture Of Cis-Diol-Containing Compound, *J. Chromatogr. A*, 1216, 4768-4774, **2009**.
- [24] Chen M., Lu Y., Ma Q., Guo L., Feng Y.Q., Boronate Affinity Monolith For Highly Selective Enrichment Of Glycopeptides And Glycoproteins, *Analyst*, 13, 42158-21564, **2009**.
- [25] Ren L.B., Liu Y.C., Dong M.M., Liu Z., Synthesis Of Hydrophilic Boronate Affinity Monolithic Capillary For Specific Capture Of Glycoproteins By Capillary Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1216, 8421-8425, **2009**.
- [26] Lin Z.A., Pang J.L., Lin Y., Huang H., Cai Z.W., Zhang L., *G.N. Chen*, Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *Analyst* 136, 3281, **2011**.
- [27] Lin Z.A., Pang J.L., Yang H.H., Cai Z.W., Zhang L., One-Pot Synthesis Of An Organic–Inorganic Hybrid Affinity Monolithic Column For Specific Capture Of Glycoproteins, *G.N. Chem. Commun.*, 47, 9675-9677, **2011**.
- [28] Li H.Y., Wang H.Y., Liu Y.C., Liu Z., A Benzoboroxole-Functionalized Monolithic Column For The Selective Enrichment And Separation Of Cis-Diol Containing Biomolecules, *Chem. Commun.*, 48, 4115-4117, **2012**.
- [29] Li H.Y., Liu Y.H., Liu J., Liu Z., A Wulff-Type Boronate For Boronate Affinity Capture Of Cis-Diol Compounds At Medium Acidic Ph Condition, *Chem. Commun.*, 47, 8169-8171, **2011**.

- [30] Liu Y.C., Lu Y., Liu Z., Restricted Access Boronate Affinity Porous Monolith As A Protein A Mimetic For The Specific Capture Of Immunoglobulin G, *Chem. Sci.* 3 1467, **2012**.
- [31] Liua C., Oua J., Liua Z., Liua J., Lina H., Fangjun W., Zoua H., (b), Separation of Intact Proteins By Using Polyhedral Oligomeric silsesquioxane Based Hybrid Monolithic Capillary Columns, *Journal of Chromatography A*, 1317, 138– 147, **2013**.
- [32] Wu M., Li R., Qin R., Dong H., Zhang J., Zou Z., Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane As A Cross-Linker For Preparation Of Inorganic-Organic Hybrid Monolithic Columns”, *Anal. Chem*, 82, 5447–5454, **2010**.
- [33] Lin H., Ou H., Zhang J., Dong Z., Zou J., Ring-Opening Polymerization Reaction of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS) For Preparation of Well-Controlled 3d Skeletal Hybrid Monoliths”, *Chem. Commun.*, 49, 231-233, **2013**.
- [34] Smith N.W., Jiang Z.J., Developments In The Use And Fabrication of Organic Monolithic Phases For Use With High-Performance Liquid Chromatography And Capillary Electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 1184, Issues 1–2, Pages 416–440, **2008**.
- [35] Lin Z., Huang H., Li S., Wang J., Tan X., Zhang L., Chen G., Preparation of Phenylboronic Acid-Silica Hybrid Monolithic Column With One-Pot Approach For Capillary Liquid Chromatography Of Biomolecules, *Journal of Chromatography A*, 1271, 115– 123, **2013**.
- [36] Geiser L., Eeltink S., Svec F., Frechet J.M.J., Optimization Of The Porous Structure And Polarity Of Polymethacrylate-Based Monolithic Capillary Columns For The Lcms Separation Of Enzymatic Digests, *J. Chromatogr. A*, 30, 2814-2820, **2007**.
- [37] Ueki Y., Umemura T., Iwashita Y., Odake T., Haraguchi H., Tsunoda K., Preparation Of Low Flow-Resistant Methacrylate-Based Monolithic Stationary Phases Of Different Hydrophobicity And The Application To Rapid Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation Of Alkylbenzenes At High Flow Rate And Elevated Temperature, *J. Chromatogr. A*, 1106, 106-111, **2006**.

- [38] Bedair M., Rassi Z.E., 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, *J. Chromatogr. A*, 1013, 47-56, **2003**.
- [39] Zeng C., Liao J., Nakazato K., Hjertén S., Biomedical Hydrophobic-Interaction Chromatography Of Proteins On Continuous Beds Derivatized With Isopropyl Groups, *Journal of Chromatography A*, Volume 753, Issue 2, Pages 227-234, **1996**.
- [40] Jin W., Fu H., Huang X., Xiao H., Zou H., Optimized Preparation Of Poly(Styrene-Codivinylbenzene-Co-Methacrylic Acid) Monolithic Capillary Column For Capillary Electrochromatography, *Electrophoresis* 24, 3172-3180, **2003**.
- [41] Colón H., Zhang X., Murphy J.K., Rivera J.G., Colón L.A., James Hayes D. and Malik A., Sol-Gel Monolithic Columns with Reversed Electroosmotic Flow for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* 72, 4090-4099, **2000**.
- [42] Nunez O., Ikegami T., Kajiwara W., Miyamoto K., Horie K., Tanaka N., Preparation Of High Efficiency And Highly Retentive Monolithic Silica Capillary Columns For Reversed-Phase Chromatography By Chemical Modification By Polymerization Of Octadecyl Methacrylate, *J. Chromatogr. A*, 1156, 35-44, **2007**.
- [43] “<http://www.biologydiscussion.com/biochemistry/chromatographytechniques/top-12-types-of-chromatographic-techniques-biochemistry/1273001/05/2017>” (Mayis **2017**).
- [44] Kolb H., Finn M., Sharpless K., Click Chemistry: Diverse Chemical Function From A Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004-2021, **2001**.
- [45] Brian N. H., Roderick N., Thiol-Ene C., Click Chemistry: Computational and Kinetic Analysis of the Influence of Alkene Functionality, *American Chemical Society*, 134, 13804-13817, **2012**.
- [46] Lin Z., Zheng X., Wang N., Wang J., Zheng X., Xie Y., Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (Poss)-Based Multifunctional Organic-Silica Hybrid Monoliths, *Analyst*, 138, 5555-5558, **2013**.

- [47] Alves F. and Nischang I., Tailor-Made Hybrid Organic–Inorganic Porous Materials Based On Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (Poss) By The Step-Growth Mechanism Of Thiol-Ene “Click” Chemistry, *Chem. Eur. J.*, 19, 17310 – 17313, **2013**.
- [48] Lin J., Zhang H., Dong Z., Liu J., Ou Z., Preparation Of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Based Hybrid Monoliths By Ring-Opening Polymerization For Capillary Lc And Cec, *J. Sep. Sci.*, 36, 2819–2825, **2013**.
- [49] Alves Scholder F., Nischang P., Conceptual Design Of Large Surface Area Porous Polymeric Hybrid Media Based On Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Precursors: Preparation, Tailoring Of Porous Properties, And Internal Surface Functionalization, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 2517–2526, I. **2013**.
- [50] Roll M. F., Kampf J. W., Kim Y., Yi E., Laine R. M., Nano Building Blocks Via Iodination Of [Phsio_{1.5}]N, Forming [P-I-C₆H₄sio_{1.5}]N (N) 8, 10, 12), And A New Route To High-Surface-Area, Thermally Stable, Microporous Materials Via Thermal Elimination Of I₂, *Am. Chem. Soc.* 132, 10171 – 10183, **2010**.
- [51] Ou H., Zhang J., Lin Z., Dong H., Zou J., Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes As Functional Monomer To Prepare Hybrid Monolithic Columns For Capillary Electrochromatography And Capillary Liquid Chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 761, 209–216, **2013**.
- [52] Lin Z., Wang X., Zhao X., Zheng T., Liu Y., Xie S., Electroneutral Silica-Based Hybrid Monolith For Hydrophilic Interaction Capillary Electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1260, 174– 182, **2012**.
- [53] Xiong B., Yang X., Li Z., Xiao Y., Jiang L., Chen L., Ma Y., Chen M., Preparation Of A Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-Based Perfluorinated Monolithic Column, *Journal of Chromatography A*, 1304, 85– 91, **2013**.
- [54] Liu H., Ou Z., Lin J., Wang H., Dong H., Zou J., Preparation Of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-Based Hybrid Monolith By Ring-Opening Polymerization And Post-Functionalization Via Thiol-Ene Click Reaction, *Journal of Chromatography A*, 1342, 70–77, **2014**.

- [55] Lin H., Ou H., Tang J., Zhang S., Dong Z., Liu J., Zou Z., Facile Preparation Of A Stable And Functionalizable Hybrid Monolith Via Ring-Opening Polymerization For Capillary Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1301, 131–138, **2013**.
- [56] Kip Ç., Demir C., Tuncel A., One Pot Synthesis Of Carboxyl Functionalized-Polyhedral Oligomeric Siloxane Based Monolith Via Photoinitiated Thiol-Methacrylate Polymerization For Nano-Hydrophilic Interaction Chromatography, *Journal of Chromatography A*, xxx–xxx, **xxx 2017**.
- [57] Gunasena D.N., Rassi Z.E., Organic Monoliths For Hydrophilic Interaction Electrochromatography/Chromatography And Immunoaffinity Chromatography, *Electrophoresis*, 33, 251–261, **2012**.
- [58] Lin J., Liu S.F., Lin J., Lin X.C., Xie Z.H., Novel Highly Hydrophilic Methacrylate-Based Monolithic Column With Mixed-Mode Of Hydrophilic And Strong Cation-[50]Exchange Interactions For Pressurized Capillary Electrochromatography, *J. Chromatogr. A*, 1218 4671-4677, **2011**.
- [59] Lin J., Lin J., Lin X. and Xie Z., Capillary Liquid Chromatography Using A Hydrophilic/Cation-Exchange Monolithic Column With A Dynamically Modified Cationic Surfactant, *J. Chromatogr. A*, 1216, 7728–7731, **2009**.
- [60] Wang X.C., Lin X.C., Xie Z.H., Preparation And Evaluation Of A Sulfoalkylbetaine-Based Zwitterionic Monolithic Column For CEC Of Polar Analytes, *Electrophoresis*, 30, 2702-2710, **2009**.
- [61] Aggarwala P., Tolley H.D., Lee M.L., Monolithic Bed Structure For Capillary Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume: 1219, Pages 1–14, **2012**.
- [62] Jiang Z.J., Smith N.W., Liu Z.H., Preparation And Application Of Hydrophilic Monolithic Columns, *J. Chromatogr. A*, 1218, 2350-2361, **2011**.
- [63] Guerrouache T., Mahouche-Chergui M., Mekhalif S., Hien Dao Chehimic T. T., Carbonniera M. M., Engineering The Surface Chemistry Of Porous Polymers By Click Chemistry And Evaluating The Interface Properties By Raman Spectroscopy And Electrochromatography, *Surf. Interface Anal*, 46, 1009–1013, **2014**.

- [64] Liu Z. , Ou J., Lin H., Liu Z., Wang H., Donga J. and Zou H., Photoinduced Thiol–Ene Polymerization Reaction For Fast Preparation Of Macroporous Hybrid Monoliths And Their Application İn Capillary Liquidm Chromatography, *Chem. Commun.*, 50, 9288—9290, **2014**.
- [65] Serban C. Moldoveanu and Victor David, *Selection Of The Hplc Method İn Chemical Analysis*, Elsevier Yayınevi, ebook, 87, **2017**.
- [66] Gökaltun A.A, *Kapiler Elektrokromatografi İçin Yeni Monolitik Sabit Fazların Sentezi Ve Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2014**.
- [67] M. Cihan Demir, *Organosilikon kapiler monolitlerin sentezi ve nano-sıvı kromatografisi uygulamalarında sabit faz olarak kullanımı*, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2017**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Gjulten Nedjip
Doğum Yeri: Debar (MKD)
Medeni Hali: Evli
E-posta: gulten.necip@hacettepe.edu.tr
Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
BEYTEPE/ANKARA

Eğitim

Lise: Vendramin Corner, Venedik
Lisans: Venedik Ca' Foscari Üniversitesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,
Ankara

Ana Dili: Makedonca

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce: Orta
İtalyanca: İleri düzey
Türkçe: İleri düzey

İş Deneyimi

01/2014-09/2014 Öğretmenlik,
ATA Lisesi, Debar, Makedonya
02/2009-06/2009 "Kelemata" ilaç ve kozmetik fabrikası, Martellago Venedik,
(stajyer)

02/2008-06/2008	San Benedetto su fabrikası, Scorze Venedik, (stajyer)
06/2008-08/2008	“Ospedale dell’Angelo” hastanesi Anatomi-Pataloji laboratuar bölümü, Venedik, (stajyer)
06/2007 – 08/2007	“L’Ospedale Umberto I di Mestre” hastanesi Anatomi-Pataloji Laboratuar bölümü, Venedik, (stajyer),

Deneyim Alanları

- Gas kromatografisi/Kütle spektrometrisi (GC/SM)
- Nano-Sıvı Kromatografisi
- Mikro ve Nano Partikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Kip, Çiğdem; Demir, Cihan; Nedjip, Gjulten; Tuncel, Ali; Preparation of phenilboronic acid functionalized polyhedral oligomeric siloxane monolithic column via one-pot approach for nano liquid chromatography of small molecules, HPLC 2017, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 18-22 June, **2017**.

2. Kip, Çiğdem; Nedjip, Gjulten; Demir, Cihan; Tuncel, Ali; Preparation of phenilboronic acid functionalized hybrid monolithic column for boronate affinity chromatography of diol compounds in a microfluidic system, HPLC 2017, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 18-22 June, **2017**.



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 06/07/2017

Tez Başlığı / Konusu: Oligomerik Siloksan Bazlı Affinite Monolitlerin Sentezi, Sıvı Kromatografisi ve Borat Affinite Kromatografisinde Kullanımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 100 sayfalık kısmına ilişkin, 06/07/2017 tarihinde şahsım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Gjulden Nedjip
Öğrenci No: N14128086
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Kimya Mühendisliği - Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

06/07/2017

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel
(Unvan, Ad Soyad, İmza)