

**HİDROFİLİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ VE TERS FAZ SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İÇİN YENİ POLYMETAKRİLAT BAZLI
MONOLİTİK KAPİLER KOLONLARIN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOKROMATOĞRAFİDE KULLANIMI**

**THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NEW
POLYMETHACRYLATE-BASED MONOLITHIC CAPILLARY
COLUMNS FOR HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY
AND REVERSE PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND THEIR
USE IN BIOCHROMATOGRAPHY**

CEMİL AYDOĞAN

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

CEMİL AYDOĞAN'ın hazırladığı “**Hidrofilik etkileşim kromatografisi ve ters faz sıvı kromatografisi için yeni polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonların hazırlanması karakterizasyonu ve biyokromatografide kullanımı**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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 değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim

25/09/2013

Cemil AYDOĞAN

ÖZET

HİDROFİLİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİSİ VE TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İÇİN YENİ POLİMETAKRİLAT BAZLI MONOLİTİK KAPİLER KOLONLARIN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOKROMATOĞRAFİDE KULLANIMI

CEMİL AYDOĞAN

Danışman: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Eylül 2013, 91 sayfa

Sunulan bu tez çalışmasının amacı, ters faz sıvı kromatografisi ve hidrofilik etkileşim kromatografisi için yeni polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonların hazırlanması ve bu kolonların biyokromatografik uygulamalar için CEC ve Nano-LC gibi sistemlerde kullanılması olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ilk bölümü, farklı tipte polimetakrilat bazlı kapiler monolitlerin hazırlanmasını ve karakterizasyon çalışmalarını içerir. Polimer monolitler, silika kapiler kolonlar kullanılarak, gözenek yapıcı karışım varlığında, *in-situ* polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. Monomer ve çapraz bağlayıcı arasındaki uygun oran oluşturulduktan sonra, monolitik kolonların yapısal özellikleri, monomer çözeltisi ve gözenek yapıcı karışım arasında farklı oranlar kullanılarak optimize edildi. Monolitlerin morfolojik yapıları üzerinde çalışıldı ve SEM görüntüleri incelendi. İkinci bölümde, hazırlanan kapiler monolitlerin ayırma performansı kromatografik sistemlerde incelendi. Hareketli faz olarak, analizlerde genellikle asetronitril ve istenilen pH'ya ayarlı fosfat tamponu kullanıldı. İlk olarak, hazırlanan alkil benzen türevleri ile monolitlerin kromatografik ve elektrokromatografik karakterizasyon çalışmaları yapıldı. İkinci aşamada, monolitlerin hidrofilik ve ters faz etkileşim yönlerinden ayırma performanslarını incelemek için fenoller, poliaromatik hidrokarbonlar, benzoik asit türevleri, anilinler, nükleozidler ve bazı proteinler model bileşikler olarak seçildi. Ayrıca, bu çalışmada literatürde ilk defa, yeni hazırlanan polimer bazlı monolit kullanılarak, bazı sülfonamid antibiyotiklerinin hidrofilik etkileşim uygulaması incelendi. Elde edilen sonuçlardan hazırlanan yeni monolitik kolonlar ile model bileşiklerin etkili olarak ayırımını gözlemlendi. Kolon verimleri, elektroosmotik akış ve bağıl standart sapma değerleri ile hesaplandı. Hazırlanan monolitlerin yüksek verimlilikleri yanında, değişen pH ortamlarına dayanıklı olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: biyokromatografi, monolit, ters faz, hidrofilik etkileşim, Nano-LC, CEC, polimetakrilat

ABSTRACT

THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NEW POLYMETHACRYLATE-BASED MONOLITHIC CAPILLARY COLUMNS FOR HYDROPHILIC INTERACTION AND REVERSE PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND THEIR USE IN BIOCHROMATOGRAPHY

CEMİL AYDOĞAN

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

September 2013, 91 pages

The goal of the research reported in this dissertation is to develop hydrophilic and reverse phase polymethacrylate-based monoliths for use in biochromatographic applications by means of capillary electrochromatography and nano-liquid chromatography. First part of this research involves the preparation and characterization of different types of polymethacrylate-based monoliths. The polymeric monoliths were synthesized by in-situ polymerization in presence of porogen in fused silica capillaries. After established the appropriate ratios between monomer and crosslinker, the porous structure of monoliths were optimized by changing the ratios of monomer solution to porogen. The morphological properties of capillary monoliths were studied and further examined by Scanning electron microscope. The second part of this research focuses on the separation performance of resultant polymeric monoliths in the chromatographic systems with different mode. Mobile phase used in these studies generally includes acetonitrile and phosphate buffer adjusted to desired pH values. In the first study of this part, alkyl benzene derivatives were used for chromatographic and electrochromatographic characterization studies. In the second study, to evaluate the separation performance of the monoliths with respect to reverse phase and hydrophilic interaction, several groups of hydrophobic and hydrophilic compounds including phenols, polyaromatic hydrocarbons, benzoic acids, anilines, nucleosides and proteins were selected. Additionally, the Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) application of some sulfonamide antibiotics was firstly performed using a newly prepared polar monolith. Our results showed these model compounds can be baseline separated using the monolithic columns.

The reproducibility of the columns was evaluated by computing the relative standard deviation values and electroosmotic flow. The monoliths produced were remarkably robust with high reproducibilities against extreme pH values.

Keywords: biochromatography, monolith, reverse phase, hydrophilic interaction, Nano-LC, CEC, polymethacrylate.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince desteğini eksik etmeyen, akademik yaşam ile ilgili tecrübelerini paylaşan, tez çalışmalarımın gerçekleşmesi için her türlü imkanı sağlayan ve tez danışmanlığımı yürüten değerli hocam sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL'e

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımcı olan Dr. Veyis Karakoç'a, Yard. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a, Dr. Bekir Çelebi'ye, Aslıhan Bayraktar'a, Kemal Çetin'e, Duygu Çimen'e,

teşekkür etmeyi borç bilirim.

SEM analizleri için Bilkent Üniversitesi UNAM personeli Mustafa Güler'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yardımlarını esirgemeyen bilgi ve birikimlerinden faydalandığım

sayın Doç. Dr. Lokman UZUN'a

sayın Doç. Dr. Dursun Ali KÖSE'ye

sayın Doç. Dr. Handan YAVUZ'a

Bioreg grubundaki çalışma arkadaşlarım, Dr. Müge Andaç'a, Dr. Nilay Bereli'ye, Gözde Baydemir'e, ve çalışmalarımı en iyi şekilde yürütebilme imkanı oluşturan, ismini yazmadığım tüm Bioreg araştırmacılarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Cemil Aydoğan, Eylül 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kromatografik sistemler.....	3
2.1.1. Kapiler elektroforez	6
2.1.2. Kapiler elektrokromatografi	7
2.1.2.1. Elektroforetik hareket.....	10
2.1.2.2. Alıkonma zamanı ve hareket	10
2.1.3. Nano-Sıvı Kromatografi	10
2.2. Kolon teknolojisi	11
2.2.1. Partikül dolgulu kolonlar	12
2.2.2. Açık tübüler kolonlar.....	14
2.2.2.1. Açık tübüler kapiler elektrokromatografi	14
2.2.2.2. Açık tübüler kapiler sıvı kromatografi.....	15
2.2.3. Monolitik kolonlar	16
2.2.3.1. Monolitlerin yüzey modifikasyonları	23
2.3. Polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonlar	27
2.3.1. Biyokromatografi uygulamaları	29
2.3.1.1. Ters faz polimetakrilat kapiler monolitler	29
2.3.1.2. Hidrofilik polimetakrilat kapiler monolitler	30
2.3.1.3. İyon değiştirici polimetakrilat kapiler monolitler	31
2.3.1.4. Afinite polimetakrilat kapiler monolitler	31
2.3.1.5. Moleküler baskılanmış polimetakrilat kapiler monolitler	32

2.3.1.6. Kiral polimetakrilat kapiler monolitler	32
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	34
3.1. Kromatografik analiz sistemleri	34
3.2. Materyal.....	35
3.3. Deneysel yöntemler	40
3.3.1. Silanizasyon	40
3.3.2. Polimerik monomer seçilmesi.....	40
3.3.3. Poli(BMA-EDMA-MAGA) kapiler monolitlerinin hazırlanması	40
3.3.4. Poli(LMA-EDMA-VPBA) kapiler monolitlerinin hazırlanması	41
3.3.5. Poli(HEMA-EDMA-MAA) kapiler monolitlerinin hazırlanması	42
3.3.6. Poli(HPMA-CI-EDMA)kapiler monolitlerinin hazırlanması ve modifikasyon çalışmaları	42
3.3.7. Karakterizasyon çalışmaları	40
3.3.7.1. Taramalı elektron mikroskobu	43
3.3.7.2. Yüzey alanı ve gözekelelik özellikleri	43
3.3.7.3. Elemental analiz	43
3.3.7.4. Kromatografik performans özellikleri	44
3.3.7.5. Tekrarlanabilirlik çalışmaları	44
3.4. Elektro-sıvı faz kromatografi koşulları	45
3.4.1. Elektroozmotik akış	45
3.4.2. Alıkonma faktörü	45
3.4.3. Teorik tabaka sayısı (N) ve tabaka yüksekliği	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Poli(BMA-EDMA-MAGA) kapiler monolitlerinin karakterizasyon çalışmaları .	47
4.2. Poli(BMA-EDMA-MAGA) monolitik kolonu ile kromatografi çalışmaları.....	52
4.2.1. Fenolik bileşiklerin ayırımı	52
4.2.2. Poliaromatik hidrokarbonların ayırımı	54
4.2.3. Anilin türevlerinin ayırımı	54
4.2.4. Benzoik asit türevlerinin ayırımı	55
4.2.5. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları	56

4.3. Poli(LMA-EDMA-VPBA) kapiler monolitlerinin karakterizasyon çalışmaları...	57
4.4. Poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik kolonu ile kromatografi çalışmaları	60
4.4.1. Anilin türevlerinin ayırımı	60
4.4.2. Fenolik bileşiklerin ayırımı	63
4.4.3. Protein analizi ve etkileşimleri	64
4.4.5. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları	66
4.5. Poli(HEMA-EDMA-MAA) kapiler monolitlerinin karakterizasyon çalışmaları .	67
4.6. Poli(HEMA-EDMA-MAA) monolitik kolonu ile kromatografi çalışmaları	68
4.6.1. Sülfonamitlerin hidrofilik etkileşimlerinin incelenmesi	68
4.6.2. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları	71
4.7. Poli(HPMA-CI-EDMA) kapiler monolitlerinin modifikasyonu ve karakterizasyon çalışmaları	71
4.8. Taurin modifikasyonlu poli(HPMA-CI-EDMA) monolitik kapiler kolonu ile kromatografi çalışmaları	76
4.8.1. Fenolik bileşiklerin ayırımı	76
4.8.2. Nükleosidlerin ayırımı	77
4.8.3. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları	79
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kapiler elektroforez sistemi	3
Şekil 2.2. Elektroozmotik akış oluşumu	4
Şekil 2.3. Kapiler kolon içerisine elektriksel alan uygulaması ve EOF ile analitlerin hareketi	5
Şekil 2.4. Kapiler elektrokromatografi oluşum kombinasyonu	7
Şekil 2.5. CEC ve HPLC sistemlerinde akış profilleri	8
Şekil 2.6. Zwitteriyonik CEC kolonunda anodik ve katodik EOF oluşumunun gösterimi	9
Şekil 2.7. Monolitik kolon şekilleri A) Açık tübüler B) Partikül dolgulu C) Monolitik kolon	12
Şekil 2.8. Farklı büyüklükte SEM görüntüleri alınmış partikül dolgulu kolon görüntüleri	13
Şekil 2.9. Açık tübüler kapiler kolon için SEM görüntüleri A) boş kapiler B) polietilenimin modifikasyonlu kapiler kolon	15
Şekil 2.10. Açık tübüler kolonun SEM görüntüsü	16
Şekil 2.11. Silika bazlı monolitik kolonun SEM görüntüsü	17
Şekil 2.12. Farklı tip ve büyüklükte polimer bazlı monolitik kolonların SEM görüntüleri	19
Şekil 2.13. Polimer bazlı monolitik kolon hazırlanması düzeneği	21
Şekil 2.14. Proteinlerin ayırma kromatogramı	22
Şekil 2.15. GMA yapısındaki epoksi grubunun farklı tepkenler ile değişimi I) Aminasyon tepkimesi, II) Alkilasyon tepkimesi, III) Sülfonasyon tepkimesi, IV) Hidroliz tepkimesi, V) Karboksi metilasyon tepkimesi VI) Boronik asit modifikasyonu	24
Şekil 2.16. GMA bazlı monolitik yapıda mevcut olan reaktif epoksi grubu ile hidroksi grupları üzerinden biyofonksiyonlandırma	26
Şekil 2.17. Kiral monolitik kolon ile amino asitlerin enantioayrılması	33
Şekil 3.1. Prince CEC-760 sistemi	34
Şekil 3.2. Ultimate 3000 Nano-LC sistemi	35

- Şekil 3.3.** Polimetakrilat monolitik kolon sentezinde kullanılan monomerler; A)BMA, B)LMA, C) MAGA, D)HEMA, E)HPMA-Cl, F) MAA, G) Çarpaz bağlayıcı EDMA36
- Şekil 3.4.** Kromatografi uygulamaları için kullanılan küçük organik moleküller 38
- Şekil 3.5.** Kromatografi uygulamaları için kullanılan biyomoleküllerin yapıları .39
- Şekil 4.1.** BMA bazlı monolitik kolonların karakterizasyonu A) akış hızına göre geri basınç değerleri B)Teorik tabaka yüksekliği değerleri47
- Şekil 4.2.** BMA bazlı monolitik kolonların (B-E) kenar ve içkısım SEM görüntüleri48
- Şekil 4.3.** BMA bazlı B kolonun elektrokromatografik karakterizasyonu. Hareketli faz, %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); injeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyoüre (2) benzen (3) toluen (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen.49
- Şekil 4.4.** BMA bazlı kolonların karakterizasyonu A) EOF değerleri, Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); injeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; alıkonma faktörü, formamid B)MAGA içeriği etkisi51
- Şekil 4.5.** BMA bazlı monolitik kolon ile kromatografi uygulamaları A) Fenolik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %40:60 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 10 kV; pik sırası, (1) tiyoüre (2) katekol (3) fenol (4) nitrofenol (5) α-naftol B) Poliaromatik hidrokarbonların elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 15 kV; pik sırası, (1) tiyoüre (2) naftalen (3) fenantren (4) piren C) Bazik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %65:35 ACN/NaOH (pH 12.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) 3-nitroanilin (2) tiyoüre (3) N-metilanilin (4) N,N-dimetilanilin (5) N,N-dietilanilin. D) Asidik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %45:55 ACN/Fosfat tamponu (pH 2.8, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) tiyoüre (2) gentisik asit (3) salisilik asit (4) benzoik asit (5) 4-hidroksibenzoik asit53
- Şekil 4.6.** Poli(LMA-EDMA-VPBA)kolonunun 2250x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri58
- Şekil 4.7.** LMA bazlı kolonun kromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar %70:30 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min; uygulanan basınç, 8 MPa; pik sırası, 1) tiyoüre (2) benzen (3) toluen (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen. .59
- Şekil 4.8.** ACN içeriği etkisi. Kromatografik koşullar ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min; uygulanan basınç, 8 MPa60

- Şekil 4.9.** LMA bazlı monolitik kolon ile bazik bileşikler için pH 8.0 ve pH 10.0 değerlerinde elde edilen kromatogramlar. Kromatografik koşullar; %70:30 ACN/Fosfat tamponu (10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 Mpa, pik sırası (1) tiyoüre, (2) anilin (3) 3-nitroanilin (4) α -naftil amin.....61
- Şekil 4.10.** Poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik kolonun iyonizasyonu62
- Şekil 4.11.** LMA bazlı kolon ile fenolik bileşiklerin ayırımı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 Mpa, pik sırası (1) tiyoüre, (2) fenol (3) hidrokinon (4) katekol63
- Şekil 4.12.** Transferrin proteini için LMA monolitik kolonu ile farklı ACN miktarlarında etkileşim kromatogramı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); % 0.1 TFA; akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 Mpa.65
- Şekil 4.13.** Proteinlerin değişen ACN içeriği ile elde edilen alıkonma süreleri. Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); % 0.1 TFA; akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 Mpa66
- Şekil 4.14.** Poli(HEMA-EDMA-MAA) kolonunun 2400x ve 25000x ölçekli SEM görüntüleri67
- Şekil 4.15.** Sülfonamidlerin hareketli fazda %60-80 ACN içerikli elektrokromatogramları Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 4.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) SPRY (2) SDZ (3) SMZ (4) SXZ (5) SDX70
- Şekil 4.16.** Poli(HPMA-CI-EDMA) bazlı reaktif monolitinin taurin ile modifikasyon tepkimesi.71
- Şekil 4.17.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-CI-EDMA) monolitik kolonun 2000x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri.72
- Şekil 4.18.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-CI-EDMA) monolitik kolonun farklı voltaj içeren katodik EOF uygulamalı elektrokromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); injeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyoüre (2) benzen (3) toluen (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen.73
- Şekil 4.19.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-CI-EDMA) monolitik kolonun anodik EOF uygulamalı elektrokromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); uygulanan voltaj, -20 kV; injeksiyon, -5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyoüre (2) fenol (3) benzaldehit (4) benzen (5) toluen (6) etilbenzen (7) propilbenzen (8) butilbenzen (9) pentil benzen74

- Şekil 4.20.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu için farklı pH larda EOF değerleri. %50:50 ACN/Fosfat tamponu (10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); uygulanan voltaj, -20 kV; injeksiyon, -5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; alıkonma faktörü, tiyoüre75
- Şekil 4.21.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu ile fenolik bileşiklerin ayrılması. Kromatografik koşullar; %35:65 ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); dalga boyu, 200 nm; uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası (1) tiyoüre, (2) fenol (3) katekol (4) hidrokinon (5)α-naftol76
- Şekil 4.22.** Taurin modifiyeli poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu ile fenolik bileşiklerin ayrılması. Kromatografik koşullar; %35:65 ACN/Fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM); dalga boyu, 260 nm; uygulanan voltaj, -20 kV; hidrodinamik injeksiyon, 600 mBar, 0.1 min pik sırası; (1) timidin (2) adenozin (3) uridin(4) guanozin (5) sitidin78
- Şekil 4.23.** ACN içeriği etkisi. Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM); dalga boyu, 260 nm; uygulanan voltaj, -10 kV, hidrodinamik injeksiyon, 600 mBar, 0.1 min79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. BMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltilerinin içerdiği madde miktarları	41
Çizelge 3.2. LMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltilerinin içerdiği madde miktarları	41
Çizelge 3.3. HEMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltileri içerik miktarları	42
Çizelge 4.1. BMA bazlı monolitik kolon için verim değerleri. % 60/40 (v/v) ACN/Fosfat tamponu (10 mM, pH 7.0) uygulanan voltaj; 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 27 cm (toplam uzunluk 36 cm)	55
Çizelge 4.2. Farklı pH değerlerinin sülfonamidlerin alıkonma süreleri üzerine etkisi. % 60/40 (v/v) ACN/Fosfat tamponu (10 mM) uygulanan voltaj; 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 27 cm (toplam uzunluk 36 cm), elektrokinetik injeksiyon, 12 kV, 0.1 min.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

CE	Kapiler elektroforez
CEC	Kapiler elektrokromatografi
Nano-LC	Nano sıvı kromatografi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografi
MEKC	Misellar elektrokinetik kromatografi
BMA	Butil metakrilat
LMA	Lauril metakrilat
HEMA	Hidroksi etilmetakrilat
HPMA-CI	3-kloro-2-hidroksi propil metakrilat
EDMA	Etilen dimetakrilat
VPBA	Vinil fenil boronik asit
MAA	Metakrilik asit
EOF	Elektroozmotik akış
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
BET	Branuer-Emmet-Teller analiz cihazı
ACN	Asetonitril
k	Kromatografik alıkonma faktörü
μ_{eof}	Elektroozmotik hareket
tR	Alıkonma zamanı
SPRY	Sülfapiridin
SDZ	Sülfadiazin
SMZ	Sülfametazin
SXZ	Sülfasoksazol
SDX	Sülfadoksin

1.GİRİŞ

Kolon teknolojisi 1960'lı yıllarda keşfedilen HPLC ile birlikte önemli bir mesafe almıştır. Buna bağlı olarak kromatografi çalışmaları, yüksek etki ve seçicilik içeren ayırma ortamlarının geliştirilmesi ile paralel olarak ilerlemiştir. Özellikle 1990'lı yılların başında, durgun faz olarak monolitik yapıların tanıtılması ile farklı modlu kromatografik teknikler üzerine artarak devam eden çalışmalar literatürde geniş olarak yer almaktadır [1-8]. Monolitik kolonlar, yaklaşık 100 yıldır kullanılan partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak ortaya çıkarılmış ve geliştirilmişlerdir. Monodispers partiküllerden oluşmuş ve % 40 lara varan partiküller arası boşlukları olan partikül dolgulu kolonların monolitik kolonlara göre çok farklı dezavantajları vardır. Monolitler tek bir yapı ihtiva ettiğinden silanlanma işlemi gerçekleştirilmiş bir kapiler kolondaki polimerizasyon sonrasında monolit ile kolon arasında herhangi bir boşluk oluşmaz. Dolayısıyla, monolitik kolonlar partikül dolgulu kolonlara göre farklı hidrodinamik özellik gösterirler. Monolitik kolonlar inorganik (silika) ve organik polimer bazlı olmak üzere iki kısma ayrılır [9]. Son zamanlarda hibrit (organik-silika) yapıları monolitik kolonlarda araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. Silika monolitler, alkoksi silanların asit katalizörlüğünde polikondenzasyonu ile hazırlanır. Bu tür monolitik yapılar mekanik olarak kararlı ve farklı organik çözümlere karşı dirençlidirler. Hibrit monolitler yapılarında inorganik yapıları silika ve organik yapıda monomer içerirler. Silika bazlı monolitlerden daha kolay hazırlanabilen organik bazlı monolitler, farklı kromatografik modlardaki uygulamalarına ve kullanılan organik monomer çeşitliliğine bağlı olarak en sık kullanılan yapılarıdır. Organik bazlı monolitik kolonların oluşturulmasında kullanılan monomere bağlı olarak polistiren, poliakrilamid ve polimetakrilat olmak üzere üç farklı tipte organik polimer bazlı monolitik yapılar vardır [11]. Polistiren monolitler, stiren yapıları bir monomer ve farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak hazırlanır. Stiren hidrofobik bir monomer olduğu için, bu türde hazırlanan monolitik kolonlar genellikle ters faz kromatografi modunda kullanılır. Poliakrilamid bazlı monolitler genellikle akrilamid monomeri içerir ve bu monomer hidrofilik karakterde olduğu için polar biyomoleküllerin analizinde önemlidir. Polistiren ve poliakrilamid monolitlerden farklı olarak, polimetakrilat monolitler organik bazlı monolitlerin en çok kullanılan türleridir.

Kolon hazırlamasının kolay olması ve özellikle istenilen kromatografik moda göre değişik monomer çeşitliliği bulunması sayesinde, polimetakrilat bazlı monolitler kapiler elektro- ve sıvı faz sistemlerde biyomolekül analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır [12-14].

Son yıllarda nano ölçekli kimyasal analiz sistemleri (lab-on-a-chip) önemli bir ilgi alanı olmuş ve artarak devam eden mesafeler almıştır. Nano ölçek içeren sistemlerden kapiler elektrokromatografi (CEC), HPLC ve kapiler elektroforez sistemlerinin kombinasyonu ile oluşturulmuş etkili bir kromatografi tekniğidir. Etkin ve seçici ayırma kapasitesine sahip olan bu hibrit teknik son yıllarda yaygın kullanımı ile büyük önem kazanmıştır. Belirli amaca uygun hazırlanmış bir partikül dolgulu veya kapiler monolite elektroforez sisteminde elektriksel alan uygulayarak yapılan kromatografik ayırma çalışmaları kapiler elektrokromatografinin çalışma prensibini oluşturmaktadır. CEC sisteminde ayırmaya etki eden iki önemli faktör vardır. Bunlardan birincisi sürücü kuvvet olan elektro ozmotik akış varlığında numunenin bulunduğu hareketli faz ve durgun faz arasındaki kromatografik etkileşim, diğeri ise numunelerin yapılarından kaynaklanan kendi elektroforetik hareketleridir.

Diğeri bir nano ölçekli kromatografi tekniği olan, Nano sıvı kromatografi (Nano-LC), klasik HPLC sistemine göre daha az kimyasal kullanımı, yüksek seçicilik, kısa süreli etkin analiz ve MS sistemlerine daha uyumlu olması gibi özelliklerinden dolayı son yıllarda kromatografik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Partikül dolgulu kolonlar kısmen monolitik kolonlar ise yaygın olarak Nano-LC sisteminde biyoayırma için kullanılmaktadır.

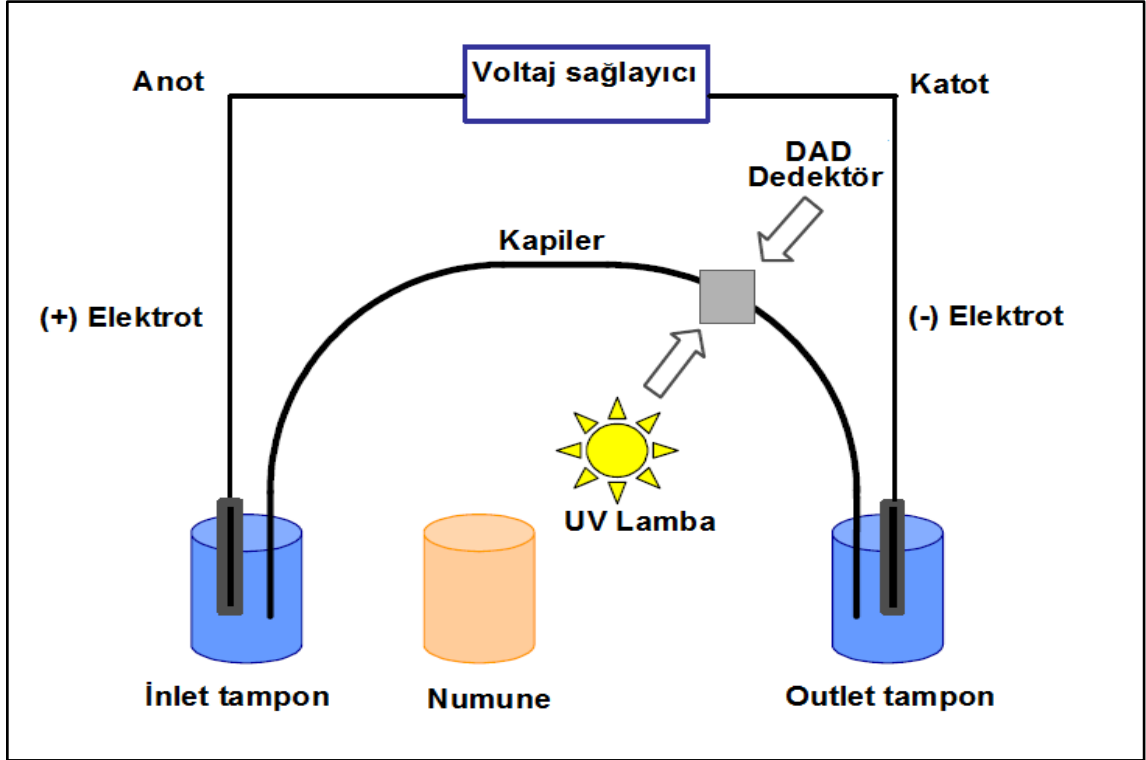
Sunulan bu tez çalışmasında, farklı monomerler kullanılarak yeni polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar farklı deney koşullarında sentezlendi. Kromatografik performanslarının yanında monolitlerin geçirgenlik özelliklerinin artırılması için farklı sentez koşulları denendi. Optimum geçirgenlik elde edilmesi sonrasında monolitlerin kromatografik performansları alkil benzenler kullanılarak belirlendi. Elde edilen kromatogramlarla monolitik kolonların verim hesaplamaları yapıldı. Hazırlanan ters faz ve hidrofilik karakterli monolitlerin CEC ve Nano-LC sistemlerinde biyokromatografi uygulamaları için fenoller, poliaromatik hidrokarbonlar, benzoik asit türevleri, anilinler, nükleozidler ve bazı proteinler model bileşikler olarak seçildi. Ayrıca literatürde ilk olarak bazı sülfonamid türevlerinin hidrofilik etkileşim kromatografisi ile analizleri incelendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kromatografik sistemler

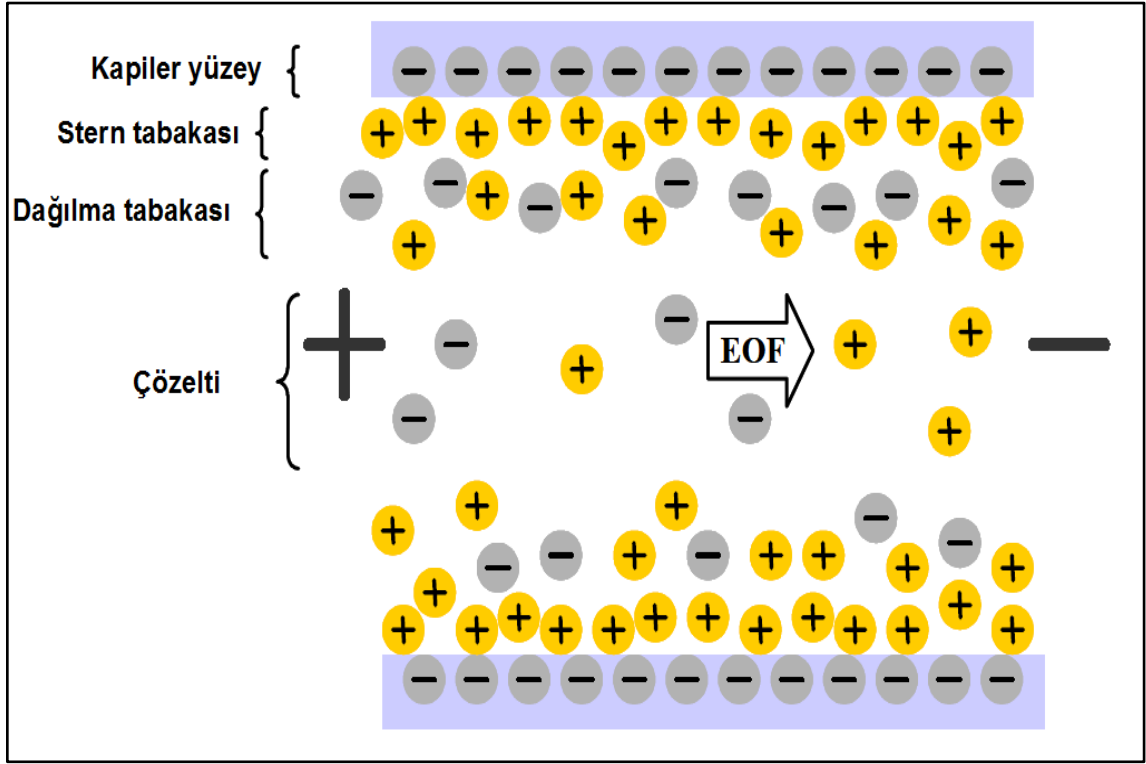
2.1.1. Kapiler elektroforez (CE)

Kapiler elektroforez bir silika kapiler kolon içerisinde elektriksel alan uygulaması ile organik veya biyomoleküllerin hareket ettirilmesi esasına dayanır. İlk olarak 1948 de protein analizinde elektroforez tekniği ile protein analizinde başarılı olan Tselius bu çalışmaları ile Nobel ödülü almıştır [15]. Daha sonra 1980'li yıllarda Jorgenson ve Lukas ilk olarak kapiler içerisinde elektroforez uygulayarak protein analizi yapmışlardır [16]. Kapiler elektroforez sisteminde, protein yapıda makromoleküllerin analizi yanında ilaç analizi, çevresel analizler, adli bilimlere yönelik analizler, organik asitler, surfektanlar, inorganik iyonlar ve boyalar gibi çok çeşitli moleküllerin etkin şekilde analizi yapılabilir.



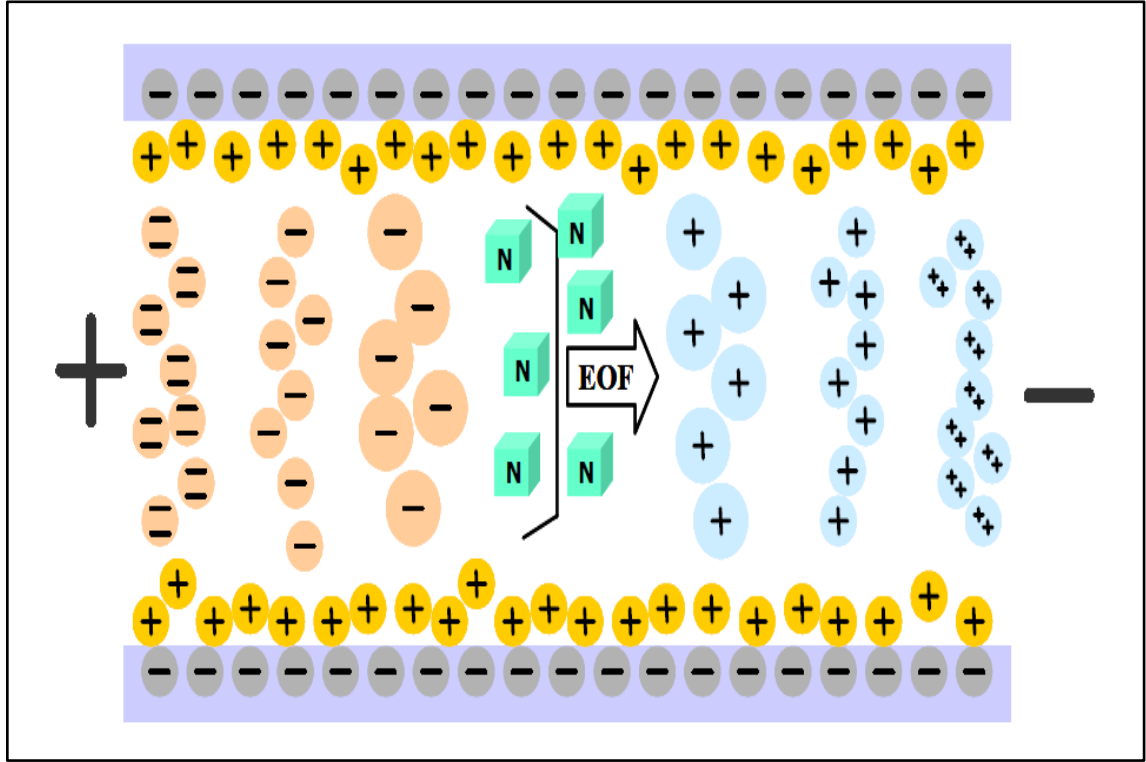
Şekil 2.1. Kapiler elektroforez sistemi

Genel olarak kapiler elektroforez sisteminin çalışma prensibi Şekil 2.1'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi, silika kapiler kolon, elektriksel voltaj uygulayıcı, dedektör, UV lamba, elektrolit çözeltileri ve numune sistemin temel bileşenlerini oluşturur. Kapiler elektroforezde analitlerin analizinde temel sürücü güç elektroosmotik akış (EOF) dır.



Şekil 2.2. Elektroozmotik akış oluşumu

Şekil 2.2'de silika kapiler kolon içerisinde EOF oluşumunu göstermektedir. Bazık koşullarda (veya $pH > 3.5$), silika kapiler yüzeyinde silanol grupları, negatif yüklü silanat şekline dönüşür ve elektrolit çözeltisinin pozitif iyonları negatif yüzey tarafından çekilerek elektrostatik etkileşim ile elektriksel çifte tabaka oluşur. Elektrolit çözeltisi içerisinde bulunan pozitif iyonların çoğu ikinci bir dağılma tabakasında bulunur ve elektriksel alan uygulanması ile pozitif iyonların katoda, negatif iyonların anoda doğru hareket etmesi EOF olarak açıklanır.



Şekil 2.3. Kapiler kolon içerisine elektriksel alan uygulaması ve EOF ile analitlerin hareketi

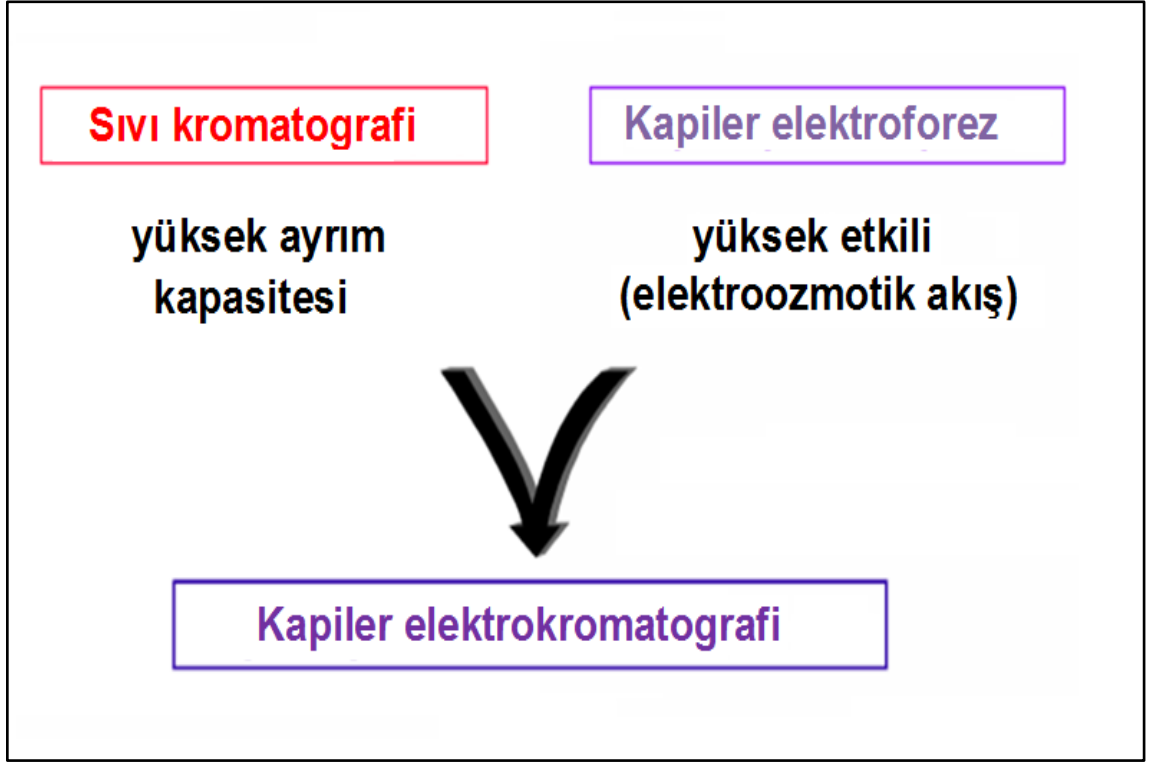
Elektriksel alan uygulanmış bir kapiler kolondaki iyonların durumu Şekil 2.3'de gösterilmektedir. Buradanda görülebileceği gibi EOF, iyonların kendi elektroforetik hareketleri yanında iyonların hareketine çok büyük bir etkisi vardır. Kapiler elektroforez farklı modlarda kullanılır.

- i) Kapiler zone elektroforez (CZE)
- ii) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- iii) Kapiler izotakofrez (CITP)
- iv) Kapiler izoelektrikfokoslama (CIEF)
- v) Miseller kapiler elektrokinetik kromatografi (MEKC)
- vi) Kapiler elektrokromatografi (CEC)

CE sisteminde analitlerin ayırımı tampon çözelti ile numune çözeltisi kısa süreli yer değiştirerek numunenin hidrodinamik veya elektrokinetik uygulaması ile gerçekleştirilir. Elektroforez ve kromatografi tekniğinin kombinasyonu ile oluşturulmuş CEC en çok kullanılan CE modlarından biridir [17].

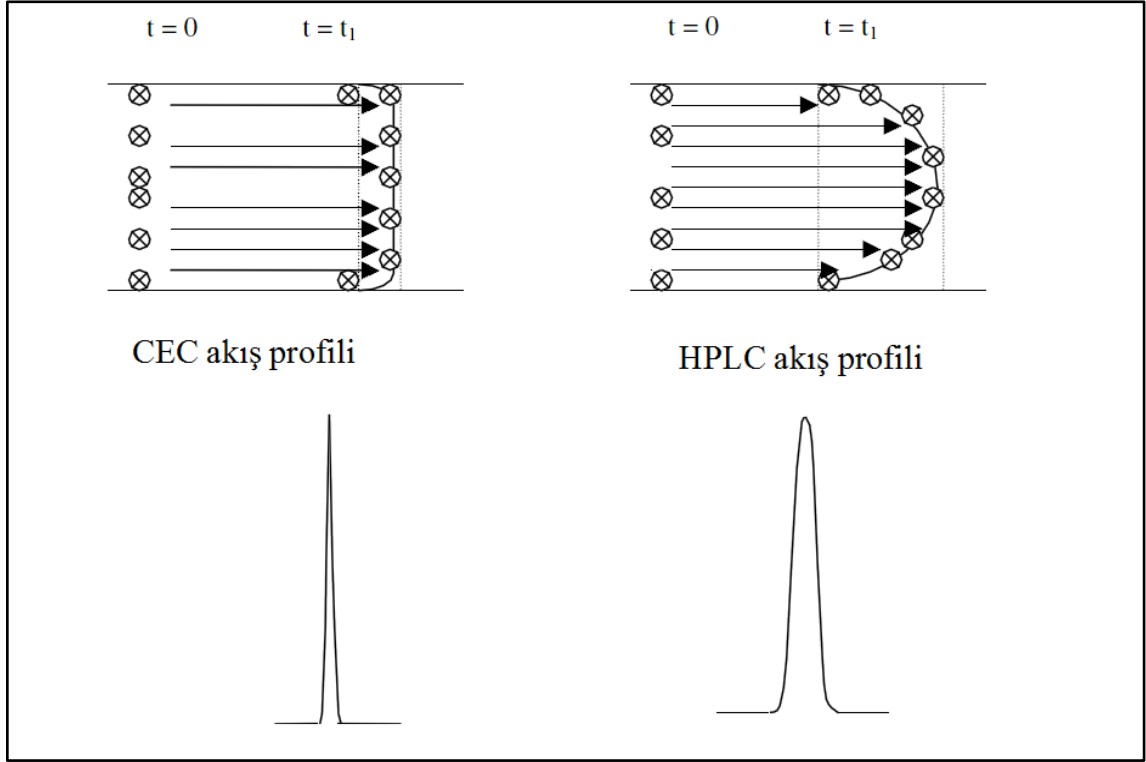
2.1.2. Kapiler elektrokromatografi

Kromatografi ve elektroforez kombinasyonu ile oluşturulan elektrokromatografi ilk olarak 1939 yılında Strain tarafından boya maddelerinin ayırımında kullanılmıştır [18]. Strain çalışmasında adsorpsiyon kromatografisi tekniği ile alümina kolona elektriksel alan uygulayarak elektrokromatografi yöntemi ile boya maddelerini ayırmıştır. Mould ve Syinge kolloid membran üzerinde bazı polisakkaritleri ayırma çalışmasında ilk defa EOF oluştuğunu gözlemlemiş ve rapor etmişlerdir [19]. Bu çalışmadan yaklaşık yirmi yıl sonra, Pretorius ve arkadaşları basınca dayalı ayırmaya alternatif olarak EOF'u önermişlerdir [20]. 1981 yılında Jorgenson ve Lukas 10 µm boyutlu silika partikül dolgu 170 µm iç hacime sahip kapiler kolonda EOF uygulamasını göstermişlerdir [16]. Teorik olarak hibrit teknik olan kapiler elektrokromatografi keşfedildikten sonra özellikle 1990'lı yıllardan itibaren literatürde sıklıkla yer almıştır [21-24]. Hibrit bir teknoloji olarak CEC, kolon içerisinde durgun faz içermesi sebebi ile, CE ve HPLC sistemlerinden çok daha yüksek pik kapasitesi ve seçiciliği vardır. CEC sisteminde genellikle az miktarda hareketli faz kullanılır. Genel olarak bir tanımlama yapmak gerekirse, CEC sürücü güç olarak elektriksel alan uygulaması ile durgun faz içeren bir kapiler kolon içerisinde hareketli faz ve analitlerin hareket ettirilmesi esasına dayanan mikro ölçekli ayırma tekniğidir. CEC yukarıda ifade edildiği gibi CE sisteminin modifikasyonu ile oluşturulmuştur [25].



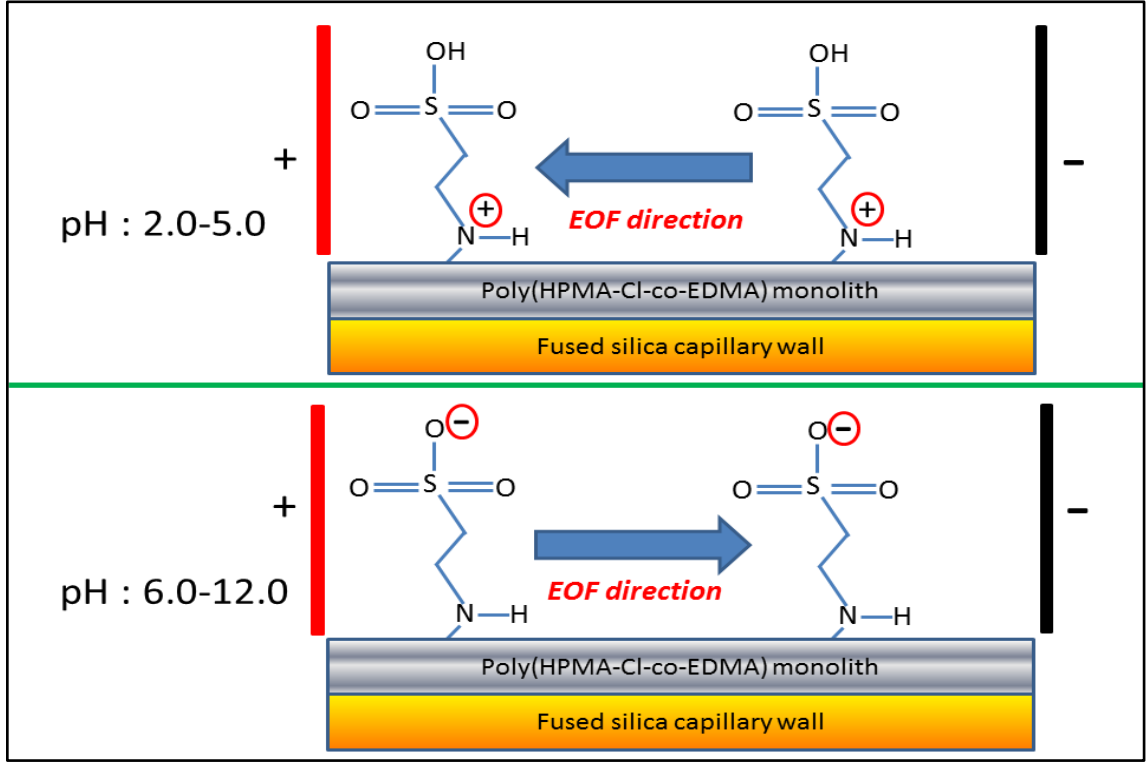
Şekil 2.4. Kapiler elektrokromatografi kombinasyonu

Şekil 2.4'den görüldüğü gibi, CEC'de farklı olarak, dolgulu kolon kullanılmasının sağladığı avantajın kromatografik yüksek ayırma kapasitesine ve EOF kombinasyonu ile daha yüksek ayırma performansına önemli etkisi vardır. Kapiler elektroforez'de olduğu gibi CEC de sürücü kuvvet EOF dur. CEC de EOF biraz daha farklı olarak hareketli faz ve sabit faz arasında oluşan elektriksel çift tabaka ile sağlanır.



Şekil 2.5. CEC ve HPLC sistemlerinde akış profilleri

Şekil 2.5'den görüldüğü gibi, sürücü güç olarak HPLC sisteminde yüksek basınç kullanılması parabolik akış oluşmasına neden olurken, CEC sisteminde elektriksel alan uygulaması ile sürücü güç olarak EOF oluşur ve kromatografik etkileşimlerinde gerçekleştiği düz akış meydana gelir. Dolayısıyla EOF daha yüksek pik kapasitesi ve etkin ayırım gerçekleşmesine neden olur.



Şekil 2.6. Zwitteriyonik CEC kolonunda anodik ve katodik EOF oluşumu [26].

CEC sistemi için hazırlanmış zwitteriyonik kolonda EOF oluşum mekanizması Şekil 2.6'da verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi hazırlanan reaktif poly(HPMA-Cl-co-EDMA) monolit taurin ile modifiye edilmiştir. Taurin zwitteriyonik bir ligand olduğu için modifiye olduğu kolona zwitteriyonik özellik kazandırır [26]. Bu tür kolonlar düşük pH larda anodik EOF, yüksek pH larda katodik EOF gösterme eğilimindedirler. Ticari olarak elde edilebilen çok az sayıda uygun polimerik monomer olması sebebi ile, literatürde sınırlı sayıda zwitteriyonik kolon hazırlanmış ve kullanılmıştır [27-29]. Zwitteriyonik kolon, CEC sisteminde hem anodik hem de katodik EOF uygulamasını olanaklı hale getirir ve çok farklı kimyasal özelliğe sahip bileşiklerin etkili olarak ayırımını sağlar.

2.1.2.1. Elektroforetik hareket

Dolgulu kolon içerisine elektriksel alan uygulandığında, iyonik bileşikler kendi elektroforetik hareketleri ve EOF dan dolayı elektriksel güce sahip olacaklar. Elektroforetik hareket, bileşğin kendi hacim, yük ve şekli ile ortamın viskozitesine bağlıdır. Bir bileşğin elektroforetik hareketliliği aşağıda verilen formülle gösterilir [30];

$$\mu_e = q/6\pi\eta\alpha$$

burada, q iyonik direnç, η hareketli fazın viskozitesi, α ise bileşğin hidrodinamik yarıçapı olarak ifade edilir. Eşitlikten görüldüğü gibi, elektroforetik hareket artan viskozite ve analitin hacmi yanında kütle yük oranına bağlı olarak azalır.

2.1.2.2. Alıkonma zamanı ve hareket

CEC'de bir bileşğin alıkonma zamanı t_R olarak gösterilir ve sıvı kromatografi ile benzerlik gösterir. Kromatografik alıkonma faktörü k ile gösterilir ve aşağıdaki şekilde formülize edilebilir;

$$k = t_R - t_0 / t_0$$

verilen formülde t_0 alıkonma zamanını gösterir.

2.1.3 Nano sıvı kromatografi (Nano-LC)

İlk olarak 1988'de Karlsson ve Novotny tarafından HPLC ye alternatif olan ve daha yüksek ayırma kapasitesine sahip nano-LC tekniğini önerilmiştir [31]. Nano-LC sistemi kısa analiz zamanı, gradient modlu hızlı akış sağlama ve özellikle kütle spektrometresine (MS) daha uyumlu olması gibi özelliklerinden dolayı özellikle son zamanlarda proteomiks çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [26,32-34]. Genellikle nano-LC sisteminde iç çapı 10-100 μm arasında değişen ve CEC de olduğu gibi paket, açık tübüler ve monolitik yapıları kolonlar kullanılır. Kolonlarda 40-600 nL arasında hızlı akış sağlama MS uyumluluğunu oldukça artırır. Mikro sıvı kromatografi ($\mu\text{-LC}$) sisteminde izokratik modlu ayırmalarda tek bir pompa akışı sağlamaktadır dolayısıyla yüksek seçicilik isteyen ayırmalar için gerekli olan gradient modlu akış sağlanamamaktadır. Bu problem $\mu\text{-LC}$ sisteminde özellikle yüksek seçicilik isteyen ayırma çalışmalarının yapılmasını olanaklı kılmamaktadır.

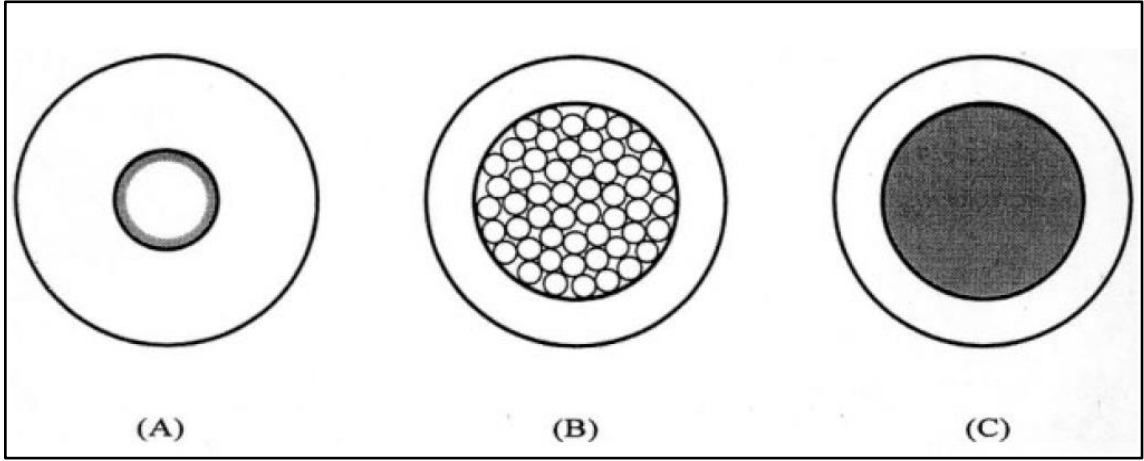
Nano-LC sisteminde ise μ -LC sisteminden farklı olarak gradient modlu hızlı akışı sağlayan ikinci bir pompa bulunmaktadır. Bu sistemde hareketli faz da yapılacak farklı bir gradient değişikliği sistemdeki ikinci pompa ile kolaylıkla uygulanabilmektedir. Sistemde sağlanan nano ölçekli akış sayesinde ve kullanılan kapiler kolonun iç hacminin azalmasına paralel olarak yapılan ayırmada etkinlik artar [35].

2.2. Kolon Teknolojisi

Kromatografi çalışmaları 1960 ve 1970'li yıllarda HPLC sisteminin ortaya çıkması ve kullanılması ile önemli mesafe almış buna bağlı olarak kolon teknolojisi üzerine son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda önemli artış olmuştur. Kolon teknolojisi ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, çapları 5-10 μm arasında değişen partikül dolgulu kolonlar ticarileştirilerek kullanılmıştır [35-38]. 1980'li yıllarda Guichon ve arkadaşları araştırmalarında, çapları 1.5-2 μm arasında değişen partikül dolgulu kolonlar kullanmışlardır [39-41]. 1990'lı yıllarda Tanaka ve arkadaşları polikondenzasyon yöntemi ile monolitik silika kolonları ilk olarak hazırlamış ve geliştirmişlerdir [42-44]. Svec ve Frechet 1992 de polimer bazlı monolitik matrisleri oluşturmuş ve 1996 yılında monolitik yapıları tanıtmışlardır [45,46]. Merck firması 1999' da bazı monolitik yapıları (chromolith) ticarileştirmiştir [47].

Kolon teçhizat malzemeleri genellikle kimyasal inert malzemelerden yapılır ve mekaniksel olarak 200 MPa basınca kadar dayanıklı olması gerekir. Özellikle partikül dolgulu kolonlarda önemli bir parametre, kolon içerisinde mikropartiküllerin kalmasını sağlayan fritz materyalleridir [48]. Bu malzemelerin kimyasal olarak dayanıklı olması yanında gözenek yapısının da uyumlu olması gerekir.

Mikro ve nano ölçekli kolonlar 1980'li yıllarda çok geniş kullanım alanı bulamamış olsa da araştırma laboratuvarlarında hazırlanarak kullanılmıştır. Analitik olarak kullanılan kolon çeşitleri partikül dolgulu, açık tübüler (open-tubular) ve monolitik kolonlar olmak üzere üç kısma ayrılır [49,50]. Şekil 2.7'de farklı monolitik yapıya sahip 100 μm çaplı kolonların genel görüntüleri verilmiştir.



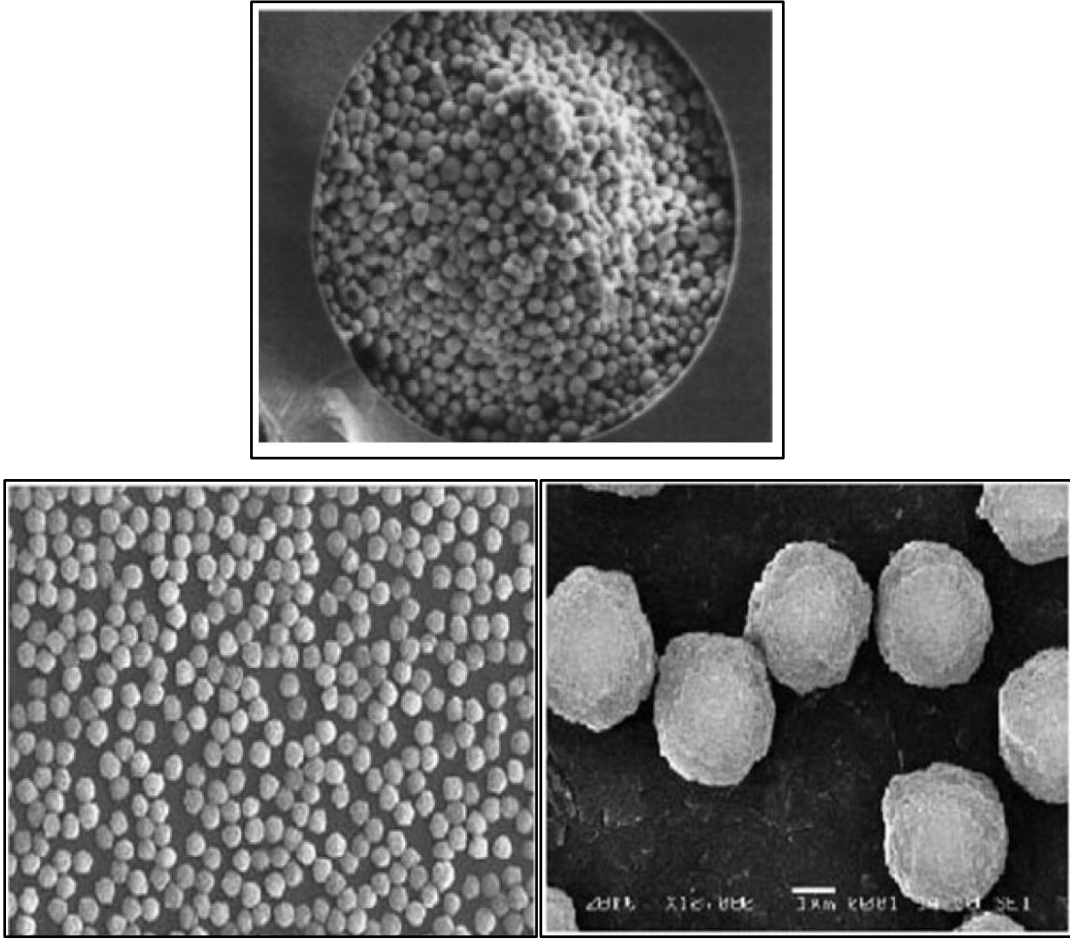
Şekil 2.7. Monolitik kolon A) Açık tübüler B) Partikül dolgulu C) Monolitik kolon

2.2.1. Partikül dolgulu kolonlar

Partikül dolgulu kolonlar, kolon dolgu materyalinin yüksek basınç yardımı ile kolon içerisindeki iki fritz arasına sıkıştırılması ile hazırlanan kolon türleridir. Partikül içeren kolonlar gözenekli (porous), çekirdek-kabuk (core-shell) ve gözeneksiz (nonporous) olmak üzere üç kısma ayrılır. Bu tür kolonlar aşağıdaki sıralamaya göre hazırlanır [49];

- i) kolon malzemesi seçimi
- ii) dolgu malzemesinin seçimi ve sentezi
- iii) boyut analizi
- iv) yüzey türevlendirme ya da modifikasyon
- v) paketlenme
- vi) kolon testi, karakterizasyonu ve yöntem validasyonu

Şekil 2.8'de partikül dolgulu kolonların SEM görüntüleri verilmiştir. Yaklaşık 5 μm boyutlu mikropartikül içeren kolona kıyasla, monolitik kolonun daha yüksek gözenek içerdiği görülmektedir.



Şekil 2.8. Farklı büyüklükte SEM görüntüleri alınmış partikül dolgulu kolon.

Genellikle dolgu materyali olarak silika yada alümina kullanılmaktadır. Partikül dolgulu kolonlarda boyut analizi kolon performansı ve kolon kullanılabilirliği açısından önemli bir parametredir [51-53]. Kolonlarda fizikokimyasal karakterizasyon önemli olduğu gibi, daha da önemlisi kolonun sistemde gösterdiği kromatografik performanstır [54]. Hedef moleküle özgü ya da istenilen özellikte hazırlanmış kolon kullanılarak buna uygun kromatografik testler kullanılır. Örneğin dolgu malzemesi yüksek hidrofobik karakterli ise, hidrofobik alkil benzenler test bileşikler olarak kullanılabilir veya dolgu malzemesi hidrofilik karakterli ise buna uygun tiyoüre, inosin bileşikleri test bileşiği olarak seçilebilir. Elektrokromatografik uygulamalarda ise dolgu malzemesi seçiminde yukarıdaki durumlara ek olarak elektroozmotik akışı (EOF) sağlayacak olan yüklü veya iyonlaşabilir gruplara sahip malzemelerin seçilmesi önemlidir. Özellikle dolgulu kolonlarda, partikül boyutu EOF oluşumunu sağlayan elektriksel çiftetabaka nın kalınlığı ile uygunluk gösterirse yeterli EOF oluşmaz.

2.2.2. Açık tübüler (open-tubular) kolonlar

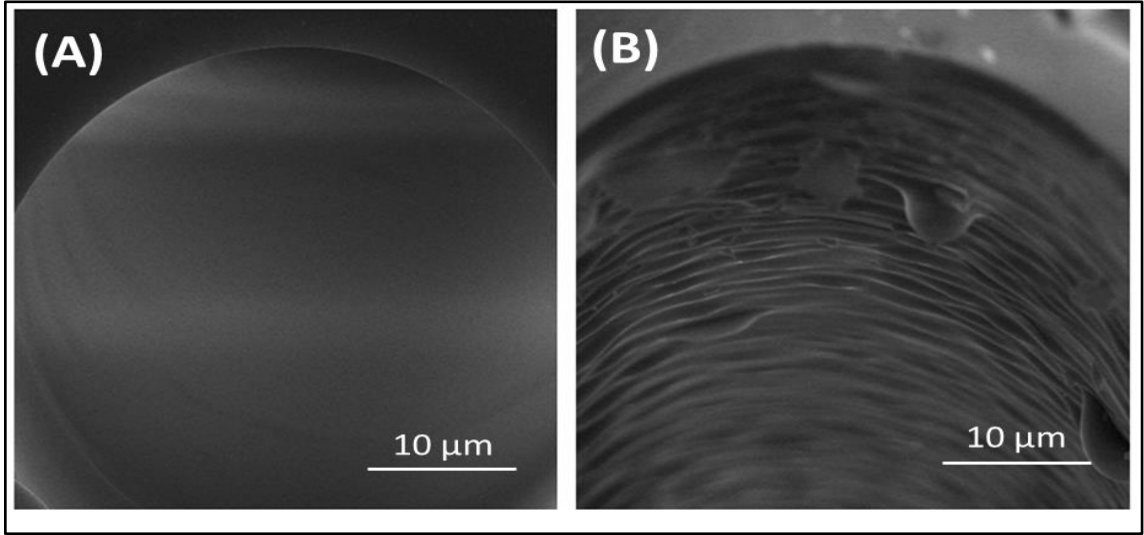
Açık tübüler kolonlar ilk olarak gaz kromatografisinde kullanılmıştır [55]. Bu tür kolonlar genellikle düşük çaplı kapiler kolonlar içerisinde hazırlanır ve durgun faz silika kapiler kolonun i yüzeyinde oluşturulur. Kolon yüzeyindeki kaplama yada hazırlanan durgun fazın kararlı olması için durgun fazın hazırlanma aşaması önemli bir adımdır. Açık tübüler kolonlarda durgun faz oranı ve numune kapasitesi partikül dolgulu ve monolitik kolonlara göre daha düşüktür.

2.2.2.1 Açık tübüler kapiler elektrokromatografi (OT-CEC)

OT-CEC mikro ölçekli kapiler biyoayırılmalarda son yıllarda sıklıkla kullanılan bir kromatografik tekniktir [56-60]. Genellikle 50  m veya daha düşük çaplı silika kapiler kolonlar kullanılır ve daha düşük miktarlarda kimyasal malzeme kullanımı yanında etkin analiz yapılabilmesi bu tekniğın önemli avantajlarıdır.

OT-CEC sistemi için hazırlanan kolonun i yüzeyinde olması gereken yüklü veya ayırma grupları aşağıda verildiği gibi farklı şekillerde kolonun yüzeyinde oluşturulur.

- i) adsorpsiyon
- ii) kovalent bağlanma
- iii) gözenekli silika tabaka oluşturulması
- iv) dağlamadan sonra kimyasal bağlanma
- v) sol jel yöntemi
- vi) moleküler baskılama



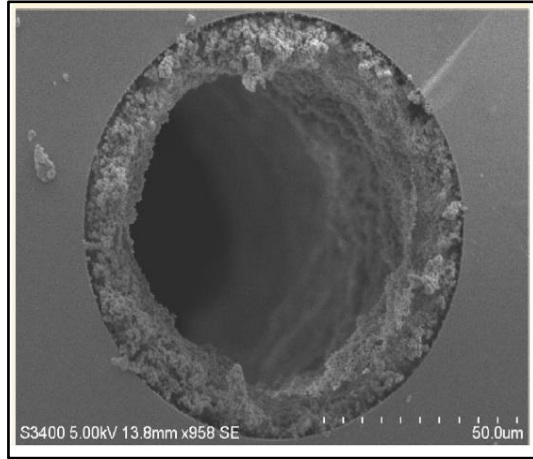
Şekil 2.9. Kapiler kolon SEM görüntüleri A) Boş kapiler B) Polietilen modifikasyonlu kapiler kolon

Polietilen fonksiyonlu poli 3-kloro-2-hidroksi metakrilat (poli(HPMA-Cl)) açık tübüler kapiler elektrokromatografi sistemi için hazırlanan kaplanmış kolon görüntüsü Şekil 2.9'da verilmiştir [61].

Kromatografik performansları yüksek olan gözenek tabakalı açık tübüler kolonlar (PLOT column) hazırlanmış ve kapiler elektrokromatografi sisteminde etkin olarak protein analizleri yapılmıştır [62].

2.2.2.2. Açık tübüler sıvı kromatografi (OT-LC)

İlk olarak 1957'de açık tübüler kolonlar gaz kromatografisinde kullanılmış yaklaşık 20 yıl sonra sıvı kromatografi de uygulaması yapılmıştır [63]. Sıvı kromatografi için PLOT kolonlar *in-situ* polimerizasyon yöntemi ile hazırlanır. Bu teknikte, daha çok monomer ve az ya da bulunmayacak miktarda çarpaz bağlayıcı içeren monomer çözeltisi, başlatıcı ve çözücü ile birlikte kolona basınç yardımı ile injeksiyon yapılır ve uygun sıcaklıkta polimerizasyon ile gözenekli yapı oluşturulur. Sıcaklık ve polimerizasyon süresi bu tür kolonların performansını önemli ölçüde etkiler. Kromatografik performansı gösteren alıkonma faktörü, PLOT kolonun iç yüzey kalınlığına bağlıdır. Sıvı kromatografisi için hazırlanmış PLOT kolonun SEM görüntüsü Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Açık tübüler kolonun SEM görüntüsü

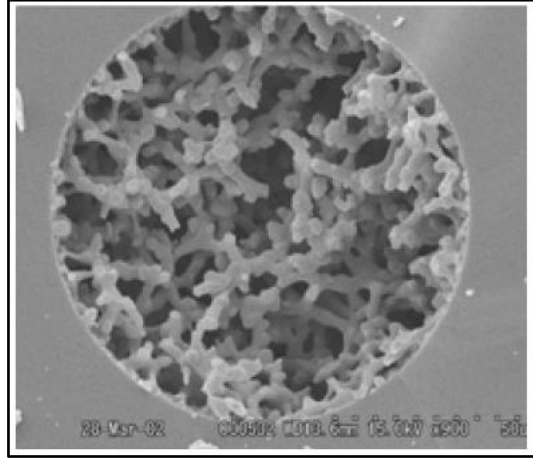
Özellikle proteomiks çalışmaları için PLOT kolonlar hazırlanmış ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi kombinasyon sistemlerde kullanılmıştır [64].

2.2.3. Monolitik kolonlar

Monolitik kolonlar, partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak geliştirilen ve son yıllarda kromatografik ayırmalarda yaygın olarak kullanılan materyallerdir. İlk olarak 1950 lerde Robert Synge tarafından kullanılmıştır [19]. Kubin ve arkadaşları 1967 yılında düşük geçirgenliğe sahip monolitik yapıları hazırlamışlardır [65]. 1980'li yıllarda Hjerten ve arkadaşları jel yapıda oluşturdukları monolitlerle çalışmışlardır [4]. 1992 ve 1996 da Svec ve Frechet ilk olarak monolitik yapıları tanıtmışlardır [2,46]. 1996 yılında Tanaka ve arkadaşları silika bazlı monolitik yapıları literatürde ilk olarak göstermişlerdir [42,43]. 1996 yıllarından itibaren günümüze kadar monolitik kolonlar hazırlanmış ve pek çoğu ticarileştirilerek farklı çalışmalarda kullanılmaktadır. Monolitik kolonlar hazırlanma şekline göre üç kısma ayrılır;

- i) Silika bazlı monolitik kolonlar
- ii) Hibrit bazlı (organik-silika) bazlı monolitik kolonlar
- iii) Polimer bazlı monolitik kolonlar

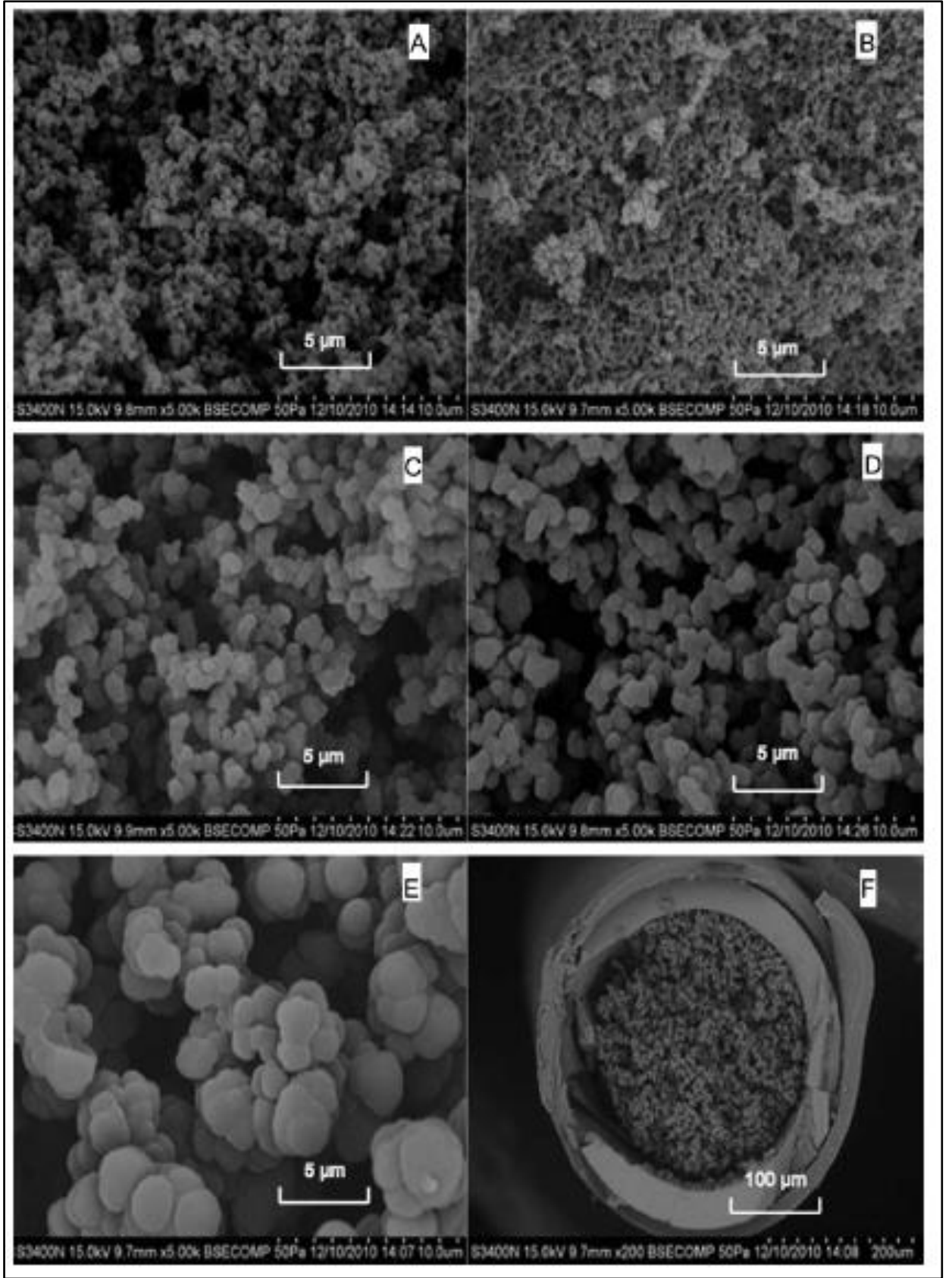
Silika bazlı monolitler sol jel yöntemi ile hazırlanır. Sol jel yöntemi üç aşama içerir; i) alkoksi silan molekülünün hidrolizi, yani silanol gruplarının oluşumu (Si-OH) ii) alkoksi silan ile silanol grupları arasındaki polikondenzasyon, yani siloksan oluşması (Si-O-Si) iii) suyun silanol grupları ile kondenzasyonu. Genellikle sol jel yönteminde, fonksiyonel monomer olarak, tetraetoksi silan (TEOS), gözenek oluşturucu olarak polietilenglikol (PEG) ve asetik asit başlatıcı olarak kullanılır. Silika monolitin morfolojik yapısı monomer karışım oranı, gözenek oluşturucular ve çözücü gibi faktörlerden etkilenir. Şekil 2.11 de silika bazlı monolitik yapının SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.11. Silika bazlı monolitik kolonun SEM görüntüsü

Hibrit bazlı monolitik kolonlarda silika kolonlara benzer olarak sel jel yöntemi ile hazırlanır. Farklı olarak kondenzasyonda 3-aminotrimetoksi silan gibi ikinci bir fonksiyonlandırılabilir silika ajanı kullanılır. Hedeflenen analize uygun organik ligand hazırlanmış silika yapıya modifikasyonu gerçekleştirilerek hibrit monolit hazırlanır. Hibrit monolitler özellikle son zamanlarda literatürde kullanılmaktadır [66].

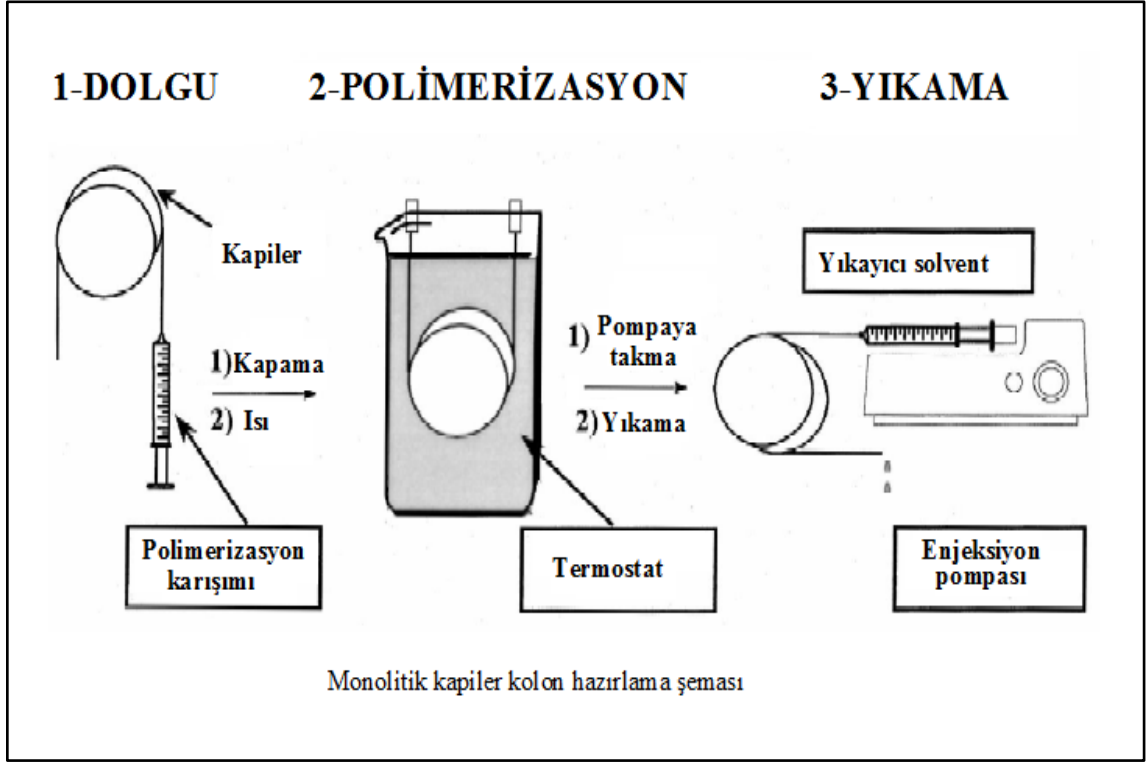
Polimer bazlı monolitler ısı polimerizasyon, radyasyon polimerizasyonu veya fotopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanabilir. Polimer monolitler, monomer karışımı, gözenek oluşturuucu sistem yanında başlatıcının da bulunduğu karışım bir kapiler kolon içerisinde *in-situ* polimerizasyon ile oluşturulur. SEM görüntüleri alınmış farklı türden polimer bazlı monolitler Şekil 2.12 de verilmiştir. Polimer bazlı monolitler; metakrilat bazlı, stiren bazlı ve akrilamid bazlı monolitler olmak üzere üç kısma ayrılır, bunların arasında en çok kullanılan monolitler ise metakrilat bazlı monolitlerdir [67-70].



Şekil 2.12. Farklı tip ve büyüklükte polimer bazlı monolitik kolonların SEM görüntüleri

Genel olarak monolitik kolonların hazırlanma prosedürü Şekil 2.13 te verilmiştir. İlk olarak, monomer karışımı ve gözenek oluşturuvcu sistem başlatıcı varlığında karıştırılarak polimerizasyon çözeltisi elde edilir. Silika monolit hazırlamak için tetrametoksi silan gibi alkoksi silanlar kullanılır. Daha sonra hazırlanan çözeltinin kolon içerisine basınç ile injeksiyonu yapılır, kullanılan başlatıcı dikkate alınarak farklı sıcaklıklarda ve farklı süre içerisinde polimerizasyon gerçekleştirilir. Polimerleşmemiş monomer yıkama ile kolondan dışarı atılır, böylece monolitik kolon hazırlanmış olur.

Monolitler tek bir yapı ihtiva etmektedir. Özellikle, Nano-LC ve CEC gibi sistemlere uygun olarak hazırlanan mikro ölçekli kapiler kolonlar etkin kromatografik ayırım sağlamışlardır [71]. Monolitik kolonlar, kolay hazırlanma, hedef moleküle uygun olarak yüzey modifikasyon yapılabilmesi, yüksek geçirgenlik ve yüksek verimlilik gibi avantajları vardır. Hızlı gelişen mikro ve nano ölçekli kromatografik sistemler ve MS kombinasyonlarında yaygın olarak kullanılan monolitik yapılar ve bunların kompleks biyo ortamdan seçici analizlerin yapılabilmesi için kullanımı proteomiks ve metabolomiks gibi çalışmalarda da çok önem arz etmektedir.



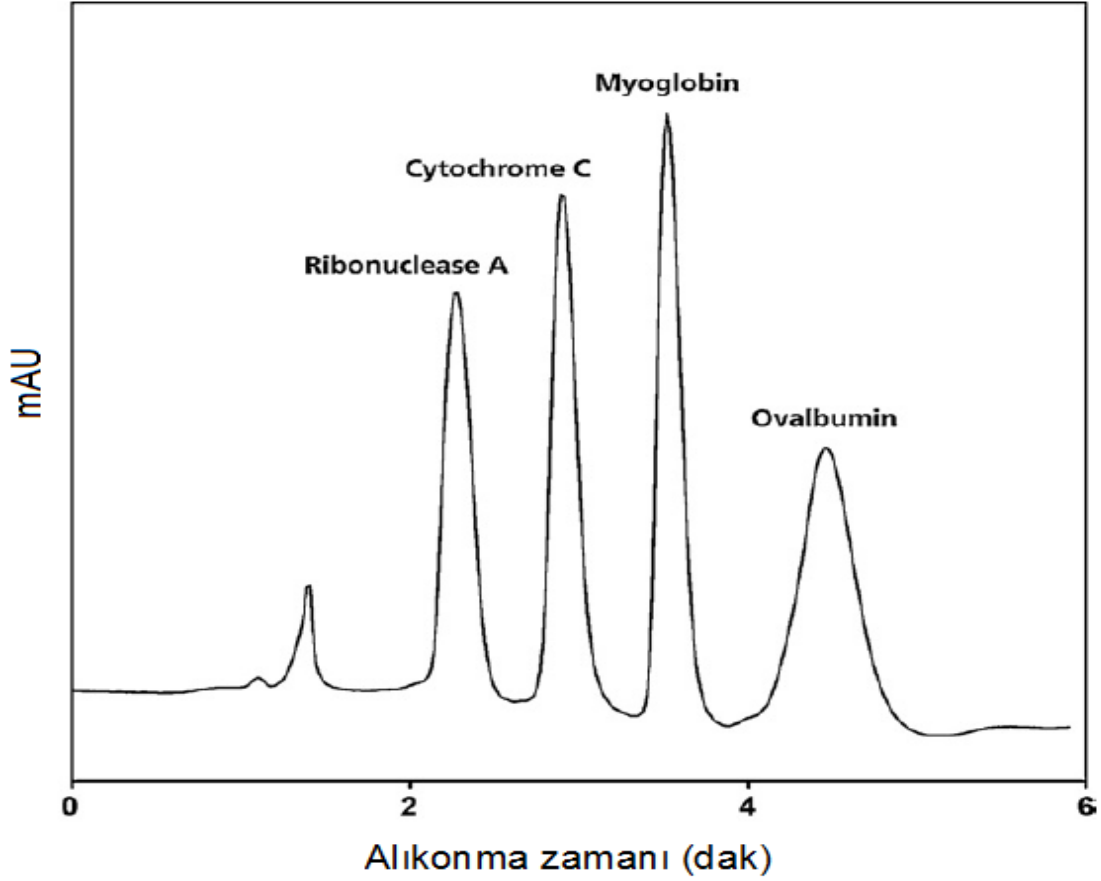
Şekil 2.13. Polimer bazlı monolitik kolon oluşturulması düzeneği

Tek yapı ihtiva eden ve partikül dolgulu kolonlara göre büyük avantajı olan monolitler gözenek büyüklüğüne göre üç farklı sınıfa ayrılır [72].

- i) Mikrogözenekli yapılar, boyutları 2 nm'den daha düşüktür.
- ii) Makrogözenekli yapılar, boyutları 50 nm'den daha büyüktür.
- iii) Mezogözenekli yapılar ise boyutları 2-50 nm arasındadır.

En çok kullanılan mezogözenekli monolitik yapılar yüksek geçirgenliğe sahip olmak ile birlikte boyutları ortalama 130 Å ve yüzey alanları yaklaşık 300m²/g dır. Kromatografik koşullarda teorik olarak yüksek verim elde etmek için bir molekülün kullanılan kolon içerisinden hızlı geçmesi (erken analiz) ve etkili ayırması önemli parametrelerdir. Kromatografik performansın artırılmasına bağlı olarak farklı uygulamalar yapılabilir.

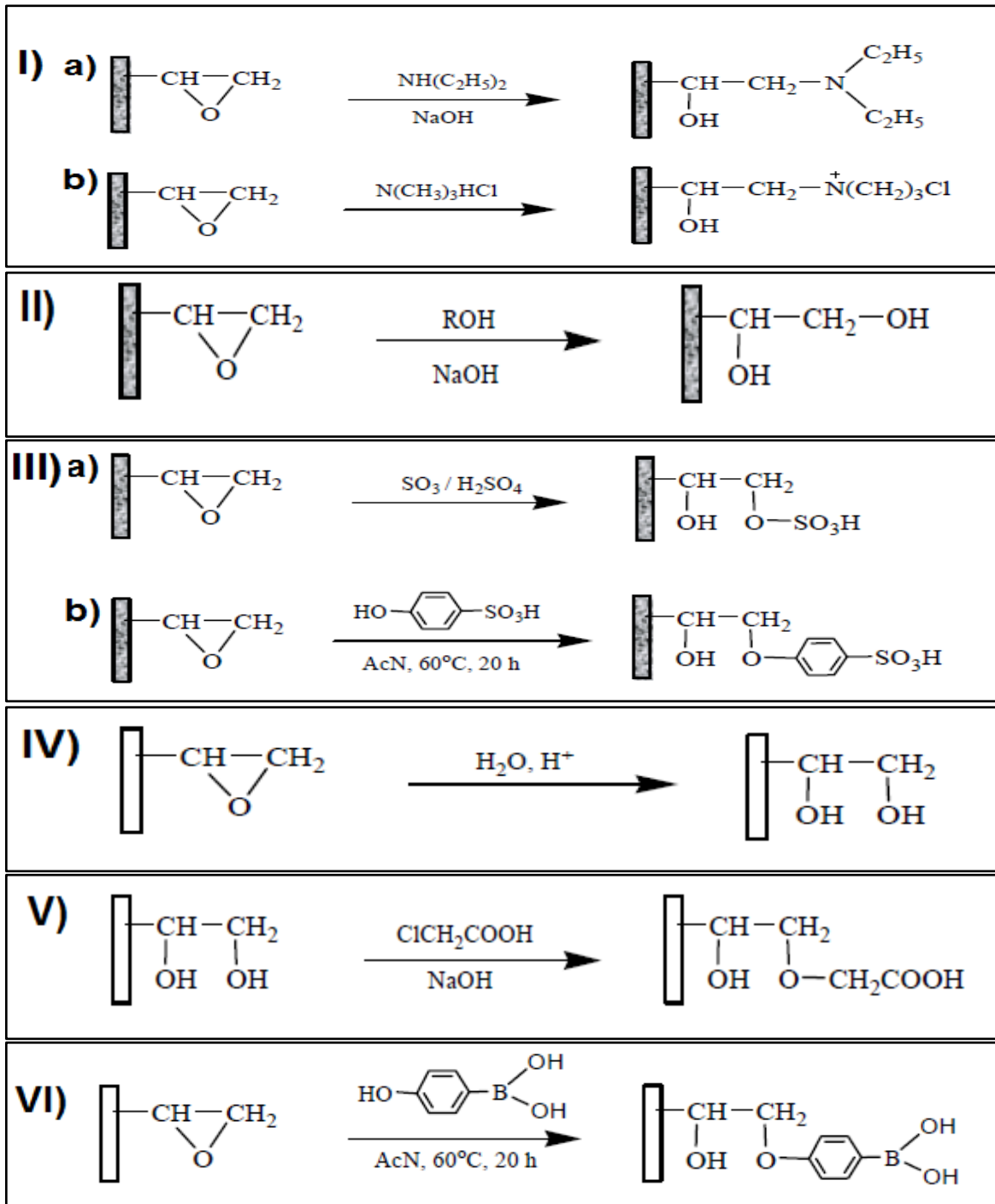
Yüksek geçirgenlik, hızlı kütle transferi, kolay modifikasyon ve değişken pH ortamlarındaki kararlılık göstermesinden dolayı monolitik kolonlar ilaçlar, nükeozidler, peptitler, metabolitler, proteinler gibi mikroyutlu biyomoleküllerden makroyutlu biyomoleküllere pekçok bileşğin analizi için ideal malzemelerdir. Şekil 2.14'de gösterildiği gibi, BMA bazlı monolitik kolon kullanılarak 5 farklı proteinin etkili olarak ayırımı sağlanmıştır [73]



Şekil 2.14. Proteinlerin ayırma kromatogramı

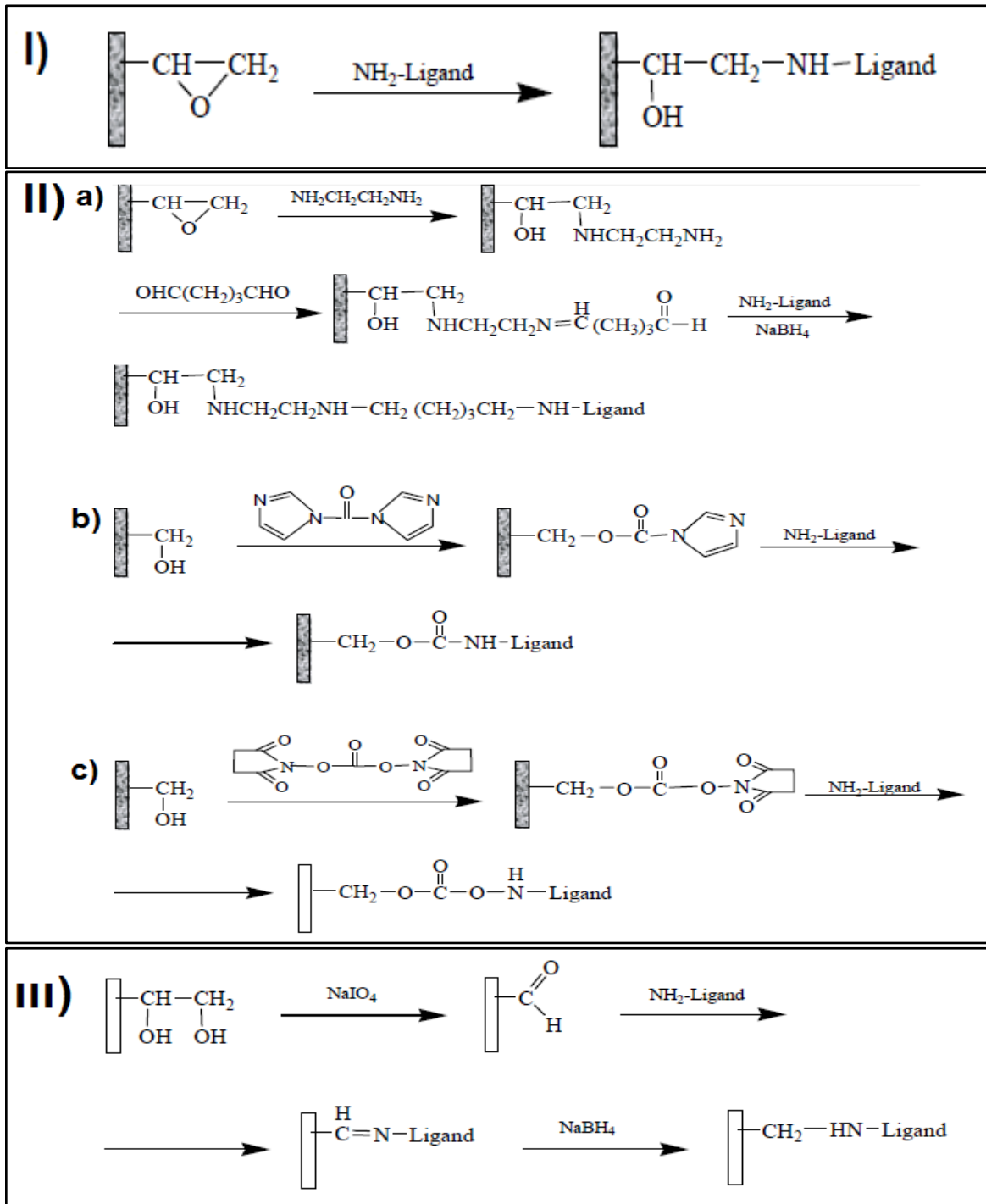
2.2.3.1. Monolitlerin yüzey modifikasyonları (Post-functionalization)

Afinite kromatografisi, proteomiks çalışmaları, immobilize enzim rektörlerinin hazırlanması ve enzim aktivite incelemesi, kiral analizler ve daha pek çok uygulama için hazırlanmış reaktif polimerik monolitler uygun ligandlar kullanılarak modifiye edilmiştir [12]. Çok farklı yöntemler ile monolitik kolonların modifikasyonu gerçekleştirilebilir. Modifikasyon için monolitik kolon hazırlamada en fazla kullanılan monomer, reaktif epoksi halkasına sahip GMA dır. Yüzey grupların reaksiyonu, en sık kullanılan modifikasyon türüdür. Bu uygulama ile anyon, katyon değiştirici monolitler hazırlanabilir. Genellikle bu amaç için glisidil metakrilat (GMA) monomeri ile hazırlanmış monolitler kullanılır.



Şekil 2.15. GMA yapısındaki epoksi grubunun farklı tepkenler ile değişimi I) Aminasyon tepkimesi, II) Alkilasyon tepkimesi, III) Sülfonasyon tepkimesi, IV) Hidroliz tepkimesi, V) Karboksi metilasyon tepkimesi VI) Boronik asit modifikasyonu [12].

Şekil 2.15'den görüldüğü gibi GMA yapısındaki reaktif epoksi halkası değişik tepkenler ile modifikasyon tepkimesi verir. Bu tür tepkimeler sonrasında elde edilen yapı hedef moleküle daha fazla bir özgülük kazanmıştır. En önemli monolitik yüzey modifikasyonlardan biri, biyoafinite kromatografisi için özgül ligandların modifikasyonudur. Monolitik kolonların afinite yöntemi için fonksiyonellendirmeleri için çok sayıda metod vardır.



Şekil 2.16. GMA bazlı monolitik yapıda mevcut olan reaktif epoksi grubu ile hidroksi grupları üzerinden biyofonksiyonlandırma [12].

Şekil 2.16'dan görüldüğü gibi GMA bazlı monolitik yapıda mevcut olan reaktif epoksi grubu ve hidroksi grupları üzerinden biyofonksiyonlandırma yapılabilmektedir. Glisidil metakrilat yapısında aktif epoksi halkası içerdiğinden bu tür monolit üzerinde kolaylıkla uygun ligand modifikasyonu yapılabilir. El Rassi ve arkadaşları GMA ve EDMA kullanarak hazırladıkları monoliti mannan ile modifiye etmişlerdir ve bu afinite karakterli monoliti mannoz bağlı proteinlerin ayırımında kullanmışlardır [74]. Pan ve arkadaşları GMA ve TRİM kullanarak hazırladıkları monoliti protein A ile modifiye etmişlerdir. Hazırlanan monolit mikro ölçekte HlgG analizinde kullanmışlardır [75].

2.3. Polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonlar

Biyomoleküllerin kromatografik analizinde polimetakrilat bazlı monolitler son yıllarda sıklıkla kullanılmışlardır. Kolay hazırlanabilirliği yanında etkin ayırma potansiyeli, hazırlanmasında kullanılacak polimerik monomerlerin çeşitliliği gibi özelliklerinden dolayı polimetakrilat bazlı monolitlerin kullanımı daha fazla tercih edilmiştir. Polimetakrilat bazlı monolitler daha çok termal başlatıcılı serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır. Diğer bir sentez yöntemi ise “High Internal Phase Emulsion” (HIPE) polimerizasyon tekniğidir. İlk olarak bu yöntemi 2005 yılında kullanan Krajc ve arkadaşları yüksek gözenekli monolit elde etmişlerdir [76]. Bu tür monolitlerin hazırlanmasında daima monomer olarak stiren ve çarpaz bağlayıcı olarak ise divinilbenzen kullanılır.

Daha çok kullanılan termal başlatıcılı polimerizasyon yöntemi ile polimetakrilat bazlı monolitlerin hazırlanmasında monomer seçimi, polimerizasyon sıcaklığı, gözenek oluşturucu sistem yüksek performansa sahip geçirgen monolitin elde edilmesinde önemli faktörlerdir. Genel olarak polimerizasyon süreci aşağıda verilmiştir. i) yeterli sıcaklıkta başlatıcının bozulması ile polimerizasyon başlar ve polimer zincirlerinin büyümesi gerçekleşir. ii) Reaksiyon karışımında oluşan polimer zincirlerinin çözünürlüğü azalır ve polimer zincirleri çekirdek oluşturmak üzere çöker. iii) Oluşan çekirdekler ortamdaki monomerler ile hacimsel olarak büyür ve mikroküre şeklinde yapılar veya topak (agregat) lar oluşur. Sonuç olarak morfolojik yapının oluşması ile reaksiyon sonrasında ortamda daha çok katı ve daha az sıvı olmak üzere iki faz oluşmuştur. Sıvı faz yani gözenek yapıcı sistem yıkama ile uzaklaştırılır ve gözenekli monolitik yapı elde edilir. Polimerizasyon sıcaklığı yüksek gözenekliğe

sahip, verimli monolitlerin elde edilmesinde önemli bir parametredir. Yüksek sıcaklıklarda, başlatıcının hızlı bozunması ile zincirlerin büyümesi hızlı olmaktadır. Buna bağlı olarak çekirdek hacmi büyür ve gözenek hacmi (pore size) küçülür. Hızlı polimerizasyonun gerçekleşmesi eş boyutlu gözenek yapı oluşumunu engeller dolayısıyla monolitik yapı oluşumunda düşük sıcaklıklar tercih edilir. Başlatıcı seçimide polimerizasyonda önemlidir, örneğin poligliserol dimetakrilat bazlı monolit hazırlarken diğer parametreleri sabit tutarak, 2,2-azobisisobutironitril (AIBN) yerine 2,2-azobis-(2,4-dimetil)valeronitril (ADVN) kullanılırsa mezogözenekli yapı yerine makrogözenekli yapı oluşması gözlenecek dolayısıyla monolitin yüzey alan 143 m²/g den 93 m²/g e düşecektir [77]. Gözenek yapıcı sistem ile birlikte bunların arasındaki uygun oranın seçimi, istenilen ölçüde gözenek yapılı metakrilat bazlı monolitlerin sentezinde en önemli parametrelerden biri yada en önemlisidir diyebiliriz. Çünkü monomer ve çarpaz bağlayıcı arasındaki oran ya da başlatıcı türü sabit tutulduğunda, gözenek oluşturucu sistemin değiştirilmesi, oluşan polimerik monolitin gözenek yapısını etkiler. Gözenek oluşturucu sistem monolit oluşumu için ya iyi bir çözügen ya da zayıf bir çözügendir. Eğer seçilmiş olan gözenek oluşturucu sistem iyi ise, yukarıda ifade edildiği gibi polimerizasyonda faz ayrılması daha sonra gerçekleşecek ve daha küçük boyutlu gözenekler oluşacaktır, dolayısıyla gözenek oluşturucu çözügenin seçimi dikkate alınmalı monomer ve çözügenin çözünebilirlik (δ) uyumu çok iyi olmalıdır [78]. Polimetakrilat bazlı monolitlerin hazırlanmasında diğer önemli faktörler ise monomer seçimi ve çarpaz bağlayıcıdır. Seçilen monomerin özellikleri uygun gözenek oluşturucu sistemin tercih edilmesini ve uygun oranlarda karışımını gerektirir. Örneğin GMA ve HEMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında farklı oranlarda dodekanol ve sikloheksanol kullanılmıştır. Her iki monolitik yapı için benzer gözenek hacmi oluşturmak için HEMA monomerli polimerizasyon çözültisinde daha az dodekanol kullanılmıştır. Bu durum monomerlerin yapısal özelliklerinden ileri gelmektedir [79]. Metakrilat monolitlerde, etilen dimetakrilat (EDMA) en çok kullanılan çarpaz bağlayıcıdır. Çarpaz bağlayıcı monolitik kolonun yapısını etkileyebilir. Örneğin EDMA yerine daha hidrofilik bir çarpaz olan polietilenglikoldimetakrilat (PEGDA) kullanıldığında aynı etkiyi göstermediği görülmüştür [80].

Polimetakrilat bazlı monolitik kapiler kolonların karakterizasyon çalışmalarında değişik teknikler kullanılmıştır. Gözenek özelliklerinin belirlenmesinde en yaygın teknikler taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) dir. SEM çok yoğun olarak kullanılan görüntüleme tekniğidir. Ancak 50 nm ve daha aşağısını yani mezogözenekli yapıların morfolojik özellikleri hakkında bilgi vermez. Bu tekniğin uygulanması için monolit yüzeyinin kararlı ve yalıtkan olması gerekir. Genellikle polimerik monolitin SEM görüntüsü alınırken yüzeyde metal kaplama yapılması gerekir. AFM sisteminde nemli ya da ıslak olan monolitlerin analizi yapılabilir, bununla birlikte elde edilen topografik görüntülerle monolitin yüzey alanı ve gözenek hacmi belirlenebilir. Civa porozimetri monolitin gözenek hacminin belirlenmesinde en çok kullanılan tekniktir [81].

Bu analizin yapılması için yeterli basınç ihtiyacı vardır. Uygulanan basınç ile civa gözeneklere girer ve uygun matematiksel dönüşümlerle yüzey alanı hesaplanır.

2.3.1 Biyokromatografik uygulamaları

Stiren bazlı monolitlere benzer olarak hidrofobik özellikte olan polimetakrilat bazlı monolitler, iyon değiştirici, hidrofilik etkileşim gibi çok farklı modlarda hazırlanmış ve kromatografik uygulamalarda kullanılmışlardır [82-87].

2.3.1.1. Ters faz polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

Genellikle ters faz kromatografi, hidrofobisitesi yüksek bir kolon veya materyal içerisinden polar hareketli faz geçerken hidrofobik moleküllerin adsorbe olmalarına dayanan kromatografik ayırma tekniği olarak bilinir. Ters faz kromatografide polar hareketli faz da bulunan organik içeriğin miktarı artırılırsa hidrofobik moleküllerin etkileşimi azalacaktır.

Polimetakrilat bazlı monolitler makromoleküllerin ayırımı için kullanılmasına rağmen küçük organik moleküllerin ayrılmasında sıklıkla kullanılmıştır. Jiang ve arkadaşları 100 µm çaplı stearil metakrilat bazlı ters faz monolit hazırlayarak zayıf asit, nötral ve bazik bileşikler analiz etmişlerdir [88]. Aydoğan ve arkadaşları ters faz özellikte butil metakrilat bazlı monolit sentezleyerek asidik, bazik ve nötral bileşiklerin ayırımında kullanmışlardır [83]. Protein ve peptitlerin ayırma çalışmalarında genellikle poli(stiren-co-divinilbenzen) monolitleri kullanılmasına rağmen, butil metakrilat bazlı monolit kullanılarak proteinlerin ters faz kromatografi yöntemi ile ayırmaları sağlanmıştır [73]. Ters faz kromatografiden biraz daha farklı

olarak hidrofobik etkileşim kromatografi (HIC) tekniğinde ise analizi yapılacak numunenin kolon içerisine yüksek derişimli tuz içerisinde (genellikle $(NH_4)_2SO_4$) gradient modlu uygulaması söz konusudur. Hemström ve arkadaşları farklı hidrofobisiteli kapiler monolitler hazırlayarak HIC tekniği ile etkili protein ayırımı gerçekleştirmişlerdir [89]. Aydoğan ve arkadaşları hazırladıkları boronik asit modifiye edilmiş lauril metakrilat monolitler ile glikoproteinlerin etkileşimlerini incelemişlerdir [13].

2.3.1.2. Hidrofilik polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) polar biyomoleküllerin analizi için 1990 yılların başından günümüze kadar kullanılmış ve kullanılmakta olan önemli bir kromatografi tekniğidir. Hidrofilik etkileşim kromatografisi polar durgun faz yanında hareketli faz içerisinde yüksek oranda organik içerik ve düşük oranda su kullanılarak yapılır aynı zamanda ters faz kromatografi metodları için zor olan polar biyomoleküllerin analizinde çok etkilidir.

HILIC uygulamalarında hareketli faz içeriği (ACN > %60) oranında ve su yada düşük derişimli (5.0 mM) fosfat tamponu kullanılır.

Hidrofilik monolitik kolonlar üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar çok fazla dikkat çekmiştir [90]. Son yıllarda biyomoleküllerin monolit bazlı HILIC uygulamaları üzerine artan ilgi olmasına rağmen, ticari olarak elde edilen alternatif polar monomer olmaması, elde edilen polar monomerlerin sınırlı sayıdaki çözümlerde çözünmesi veya gözenek optimizasyonu gibi problemlerden dolayı çok fazla uygulama alanı bulamamışlardır. Holdsvendova ve arkadaşları hidroksimetil metakrilat bazlı hidrofilik monolitik kolon hazırlayarak polar bileşikler olan oligonükleotidlerin ayırımı yapmışlardır [91]. Hosoya ve arkadaşları nükleik asid, peptit ve protein analizi için epoksi bazlı hidrofilik monolit hazırlamışlardır [92]. Zwitteriyonik polimetakrilat bazlı sülfobetain monolit ile benzoik asit türevleri, nükleozidler ve nötral bileşiklerin ayırımı HILIC modunda incelenmiştir [93].

Aydoğan ve arkadaşları literatürde ilk olarak 3-chloro-2-hidroksi propilmetakrilat bazlı hidrofilik monomer kullanmış ve taurin modifiye edilmiş reaktif monolit hazırlamışlardır. Hazırlanan hidrofilik monolit ile nükleozidlerin etkili ayırımı gerçekleştirmişlerdir [26].

2.3.1.3. İyon değiştirici polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

İyon kromatografisi modern bir uygulaması olarak iyon değişim kromatografide yüklü bileşiklerin ayrılması sağlanır. Çözelti içerisinde iyonizasyona uğrayan bileşiklerin analizi için iyon değiştirici polimetakrilat bazlı monolitler kullanılır ve iyon değiştirme en sık kullanılan kromatografik modlardan biridir. Proteomiks ve metabolomiks uygulamalarında iyon değiştirici monolitler sıklıkla kullanılmaktadır [91]. İyon değiştirici monolit hazırlamak için daha çok fonksiyonlandırılabilen GMA bazlı monolitler kullanılır. Örneğin, peptit ayırımı için GMA bazlı monolit güçlü anyon değiştirici bir ajanla modifiye edilmiştir [94]. Quaterner amonyum modifiye edilmiş GMA bazlı monolit sentezlenmiş ve nükleotid mono-, di-, trifosfat ve oligonükleotidlerin ayırımı yapılmıştır [95]. Butil metakrilat bazlı güçlü anyon değiştirici özelliğe sahip monolit ile yedi sakkarid türevi 10 dakikadan daha kısa sürede analiz edilmiştir [6]. Aydoğan ve Denizli literatürde ilk defa butil metakrilat bazlı zayıf katyon değiştirici monolitler sentezlemiş ve bunları optimize ederek amino asit analizinde kullanmışlardır[69].

2.3.1.4. Afinite polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

İlk olarak 1960'lı yıllarda geliştirilen Afinite kromatografisi (AC) protein ayırımı için önemli bir tekniktir [96]. AC tekniği, hedef biyomolekül ve ona özgü polimer matrikse immobilize edilmiş ligand arasındaki etkileşim esasına dayanır. Genel olarak, uygun koşullarda hedef molekülün liganda bağlanması sağlanır ve istenmeyen moleküller yıkama ile uzaklaştırılır, daha sonra matrikse bağlı hedef molekül kullanılan desorpsiyon çözeltisi ile saf halde elde edilir. Bu teknikte kullanılan ligandlar genel ve özgül ligandlar olarak iki kısma ayrılabilir [97]; Genel ligandlara örnek olarak, boyalar, metal iyonları, protein A ve protein G verilebilir. Özgül ligandlara ise enzimler, antijen ve antibadiler, hormonlar örnek olarak verilebilir.

Zou ve arkadaşları GMA bazlı monolit üzerine protein A immobilizasyonu ile insan immünoglobulinlerini (hlgG) analiz etmiştir [75]. E.F Hilder ve grubu yaptıkları çalışmada polietilen glikol bazlı monolit hazırlayarak immünoglobulin G altbirimleri ve varyantlarını analiz etmişlerdir [98]. Metakrilat bazlı monolitik kolonlar, boya ligand afinite kromatografisi yöntemi ile proteinlerin afinite bazlı biyokromatografisinde kullanmışlardır [99].

2.3.1.5. Moleküler baskılanmış polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

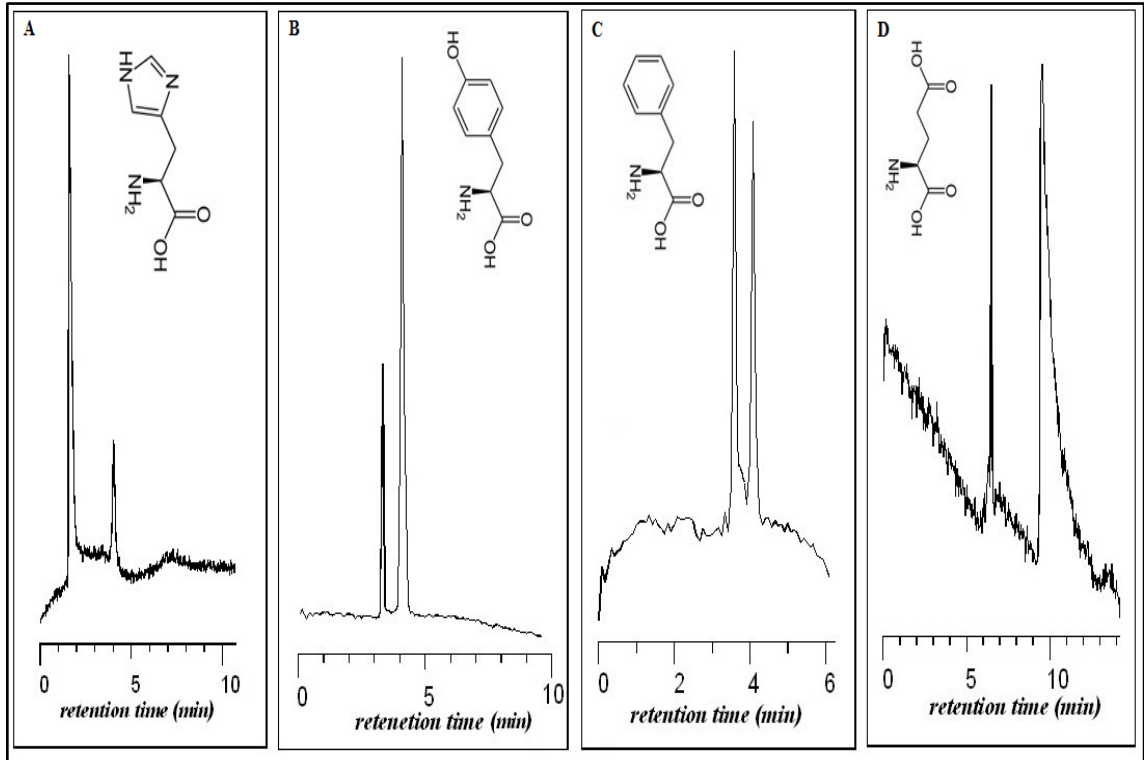
Moleküler baskılama tekniği, bir analitin bağlanma yönü ile yapısal, hacimsel ve fonksiyonel özellikleri bütün olarak bir polimer matriks içerisinde tanımlayıcı bir yer oluşturan ve aynı analit için özgüllük içeren bir teknolojidir [100]. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) genellikle bir yada iki farklı polimerik monomer, analit (template), çarpaz bağlayıcı, gözenek oluşturucu ve başlatıcının karışımıyla hazırlanan polimer çözeltisinin polimerleşmesi ile hazırlanır. Polimerizasyon sırasında fonksiyonel monomer ve analit arasında kompleks yapı oluşur ve çarpaz bağlayıcı ile üç boyutlu polimer matriks hazırlanır. Yıkama sonrasında analit polimerik yapıdan uzaklaştırılır ve kalan boşluklar analite özgü özellikler gösterir. Farklı biyomoleküller için çok sayıda polimetakrilat bazlı moleküler baskılanmış kapiler monolitik kolonlar hazırlanmıştır. Bu tür monolitik kapiler kolonların hazırlanmasında karboksilik asit fonksiyonel grubu içeren MAA kullanılmıştır [101]. Literatürde genellikle küçük yapılı organik moleküllere özgü kapiler MIP kolonlar hazırlanmıştır [102]. Ancak son zamanlarda makroyapılı proteinlerin de monolitik kapiler kolonlar içerisinde baskılanması çalışmaları devam etmektedir [103-105].

2.3.1.6. Kiral polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar

Enantiyoayırma, ayırma bilim ve teknolojisinde önemli bir araştırma alanıdır. Kromatografi çalışan bilim insanları enantiyoayırma çalışmalarına büyük önem vermişlerdir. Bir bileşiğin enantiyomerleri buldukları biyolojik ortamlara bağlı olarak farklı biyolojik aktiviteye sahiptirler [106]. Farklı biyoortamlarda bulunan enantiyomerlerin farklı biyolojik aktiviteye sahip olmaları nedeni ile CE, CEC, HPLC gibi sistemlerde yaygın olarak kiral ayırma çalışmaları yapılmıştır [107]. Bu çalışmalar genellikle uygun kiral kolon kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Farklı özellikte kiral kolonlar hazırlanarak araştırma amaçlı kullanılmıştır. CEC sisteminde 4 farklı yapıda kullanılan kiral monolitik kolonlar mevcuttur [107-110];

- i) Partikül uyumlu monolitler
- ii) Silika monolitler
- iii) Polimer bazlı monolitler
- iv) Moleküler baskılanmış monolitler

Polimer bazlı kiral monolitik kolonlar genellikle ya direk polimerizasyon yöntemi ile yani metakrilat bazlı kiral selektör özelliğine sahip monomerlerin kullanılması veya bir kiral ligand ile polimerizasyon sonrası monolitin modifikasyonu ile hazırlanır [111]. Proteinler, antibiyotikler, Crown eterler, aminoasitler, polisakkarit türevleri kiral ligand olarak kullanılmışlardır. Aydoğan ve Denizli MAGA yı kiral selektör olarak kullandıkları çalışmada hazırladıkları kiral kolon ile amino asitlerin enantiyomerlerini Şekil 2.17’den görüldüğü gibi etkili olarak ayırmışlardır [112].



Şekil 2.17. Kiral monolitik kolon ile amino asitlerin enantioayrılması

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kromatografik analiz sistemleri

Kapiler elektrokromatografi deneyleri Hollanda yapımı Prince CEC-760 sisteminde yapıldı. Şekil 3.1’de göüldüğü gibi, Prince CEC-760 sistemi, diyot array dedektör (DAD), UV lamba ve elektriksel güç sağlayıcısı içermektedir. Ayrıca sistemde analiz için uzun kapiler (long capillary) modu seçilmiştir. Kapiler kolonların şartlandırılmasında μ HPLC pompa kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Prince CEC-760 sistemi

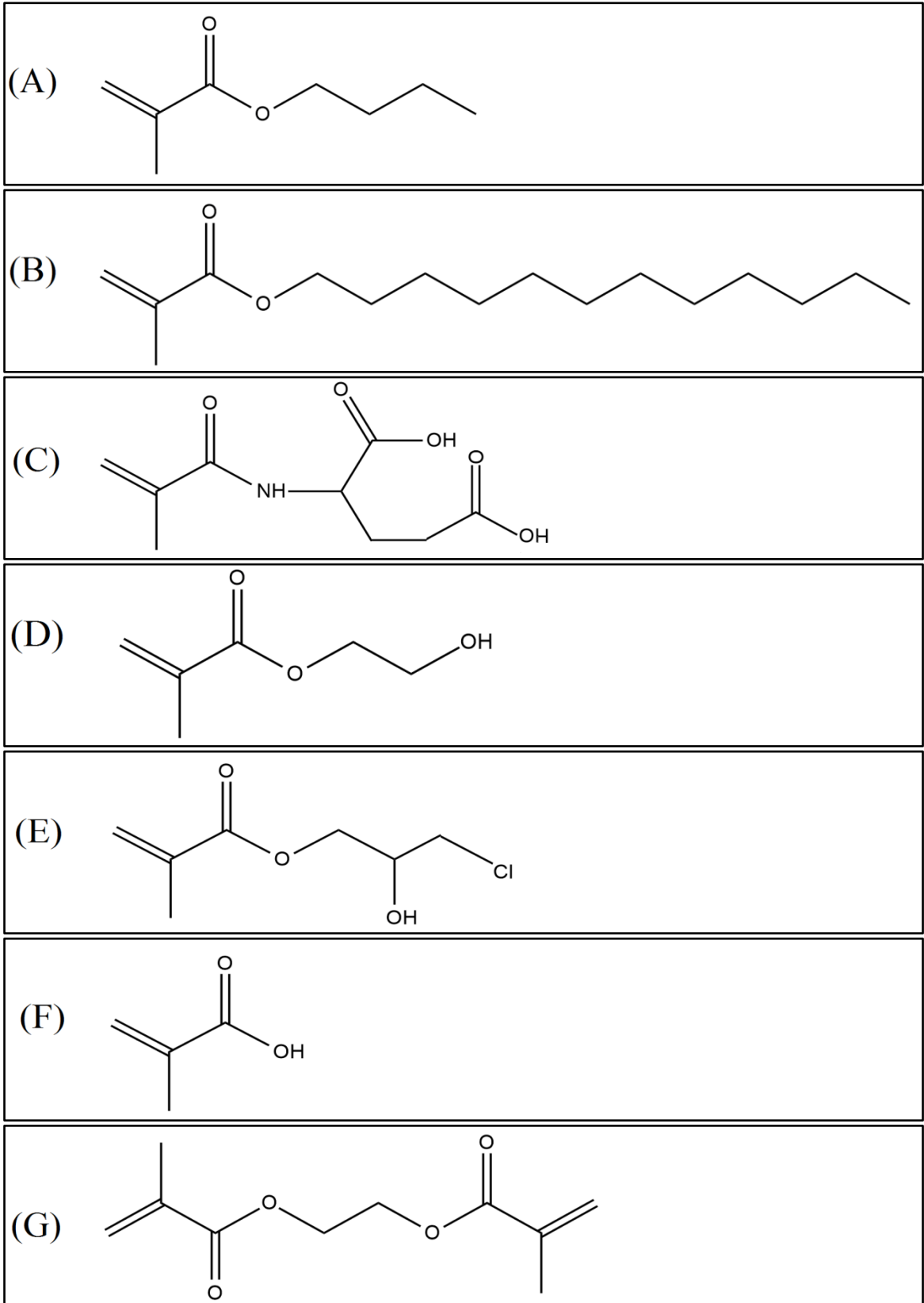
Nano-LC deneylerinde, Şekil 3.2’de veril nano akış içeren Ultimate 3000 kromatografi sistem (Dionex Technologies, Münih, Almanya) kullanıldı. Sistem ultimate 3000 pompa, ultimate 3000 nano akış ayarlayıcı, ultimate 3000 oto sampler ve ultimate 3000 RS değışken dedektör içeren kısımlardan oluşmaktadır.



Şekil 3.2. Ultimate 3000 Nano-LC sistemi

3.2. Materyal

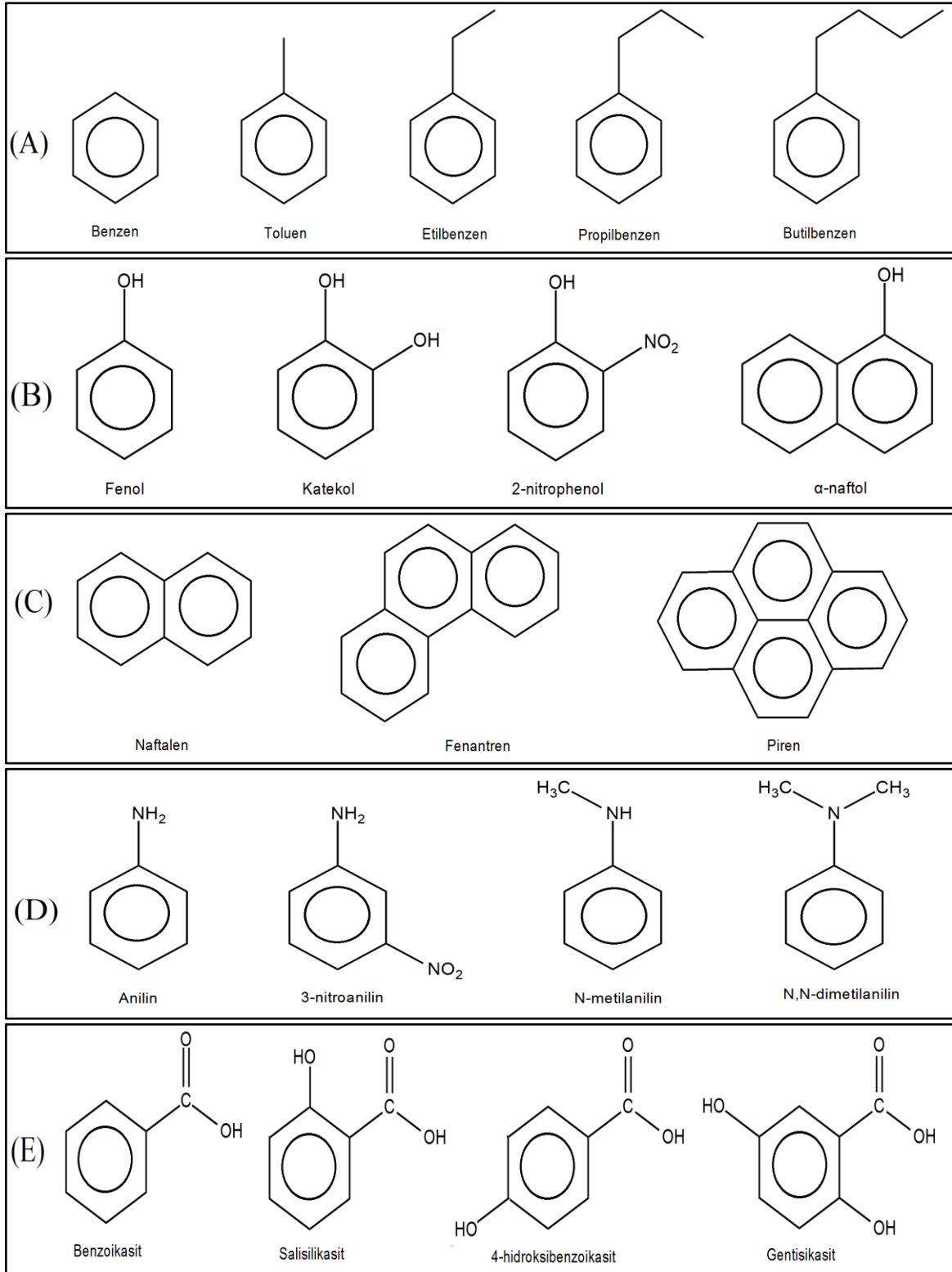
Polimetakrilat bazlı monolitik kolonlar hazırlamak için butilmetakrilat (BMA), hidroksietilmetakrilat (HEMA), lauril metakrilat (LMA), 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl), N-metakroil-L-glutamik asit (MAGA), vinil fenil boronik asit (VPBA) ve çapraz bağlayıcı olarak etilendimetakrilat (EDMA) kullanıldı. Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan polimerik monomerlerin yapısı Şekil 3.3'de verilmiştir.



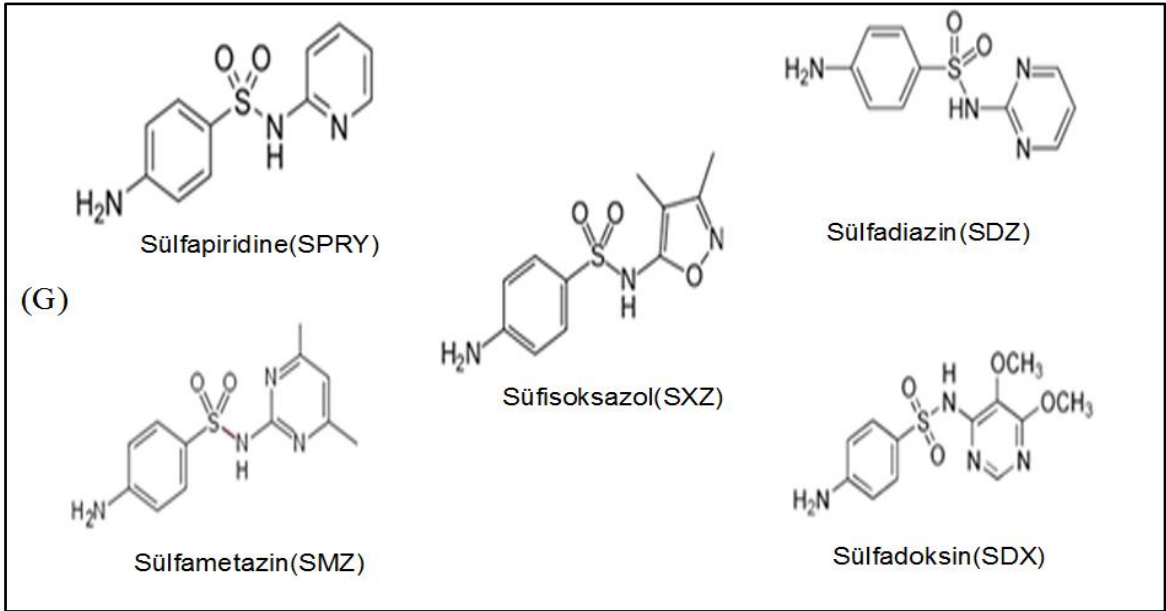
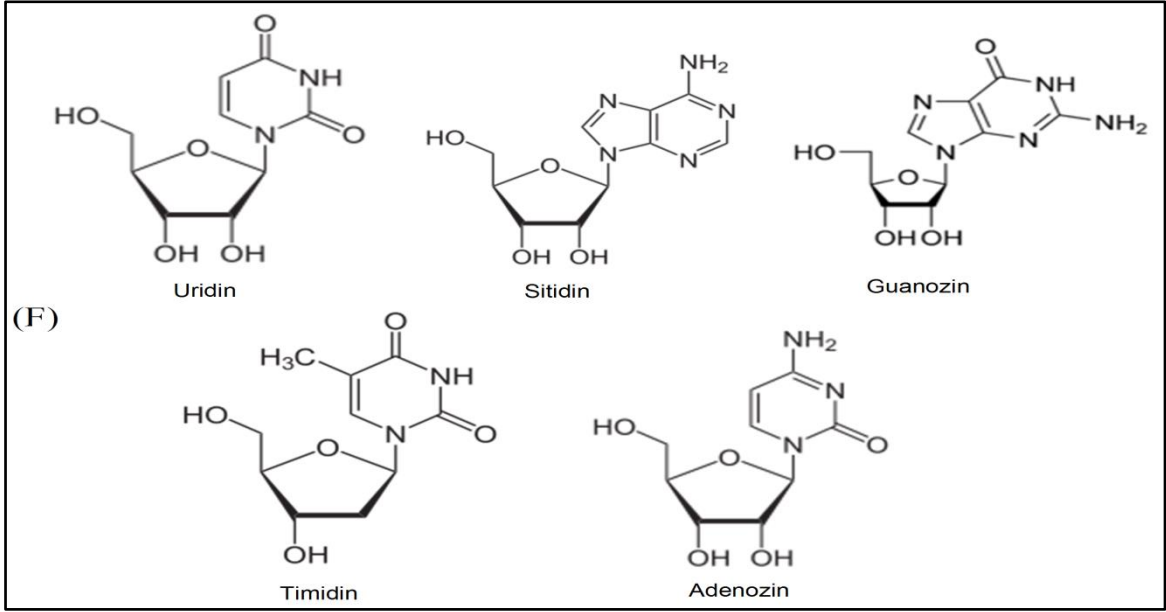
Şekil 3.3. Polimetakrilat monolitik kolon sentezinde kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları; A) BMA, B) LMA, C) MAGA, D) HEMA, E) HPMA-Cl, F) MAA, G) Çarpaz bağlayıcı EDMA

Kromatografik karakterizasyon çalışmalarında benzen, toluen, etilbenzen, propilbenzen ve butilbenzen gibi alkilbenzen türevleri kullanıldı. Biyokromatografi çalışmalarında, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), benzoik asit türevleri, anilinler, fenolik bileşikler, nükleosidler, proteinler ve bazı sülfonamid antibiyotikleri kullanıldı. Kullanılan bu bileşiklerin yapıları Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de verilmiştir.

Tüm analitler Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Kolon hazırlamak için, üretimi Polimikro Teknolojileri tarafından yapılan iç çapı 100 µm ve dış çapı 360 µm boş fused-silika kapiler kolonlar kullanıldı. Silanlama ajanı 3-trimetoksi silil propilmetakrilat (TMSPM), Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Deneysel çalışmalarda genellikle fosfat tamponu kullanıldı. Tampon hazırlamak için monobazik NaH_2PO_4 ve dibazik Na_2HPO_4 tuzları, ortamın pH sını ayarlamak için HCl, NaOH stok çözeltileri, dimetil formamid (DMF) Merk firmasından alındı.



Şekil 3.4. Kromatografi uygulamaları için kullanılan küçük organik bileşiklerin yapıları



Şekil 3.5.Kromatografi uygulamaları için kullanılan biyomoleküllerin yapıları

3.3. Deneysel yöntemler

3.3.1. Silanizasyon

Deneysel çalışmalarda kullanılan fused-silika kapiler kolonların toplam uzunluk 38 cm ve etkin uzunluk (monolit içeren kısım) 30 cm olarak ayarlandı. Aşağıda ifade edilen silanizasyon işlemleri için CEC sisteminde 750 mBar basınç uygulandı. Polimerizasyon çözeltilerinin kolon içerisine enjeksiyonundan önce kolonların yüzeyi aktif hale getirildi. İlk olarak uygun ölçümlerde hazırlanan kolondan sırasıyla 3 saat 0.2 M NaOH çözeltisi, 30 dakika deiyonize H₂O, 30 dakika N₂ gazı geçirildi, daha sonra TMSPM ve MeOH (50:50) oranında hazırlanarak kolon içerisinden yaklaşık 1 saat süre ile geçirildikten sonra kolon uçları septumlarla kapatıldı ve 35°C de su banyosunda 20 saat süre ile bekletildi. Su banyosundan çıkarılan kolondan yaklaşık 30 dakika metanol ve 30 dakika N₂ gazı geçirilerek kolonun iç yüzeyi aktif (vinilize) hale getirildi. Hazırlanan tüm kolonlar için benzer silanizasyon işlemi uygulandı.

3.3.2. Polimerik monomer seçilmesi

Tez kapsamında ters faz ve hidrofilik polimetakrilat monolitik kolonların hazırlanması planlandığı için hidrofobik ve hidrofilik karakterli monomerler seçildi. Ters faz monolit hazırlamak için hidrofobik karakterli LMA, BMA ve hidrofilik monolit hazırlamak için hidrofilik karakterli HEMA ve yeni reaktif bir monomer olarak HPMA-Cl kullanıldı.

3.3.3. Poli(BMA-EDMA-MAGA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması

Polimerizasyon çözeltisi hazırlamak için 0.70 mL BMA, 0.35 mL EDMA ve farklı miktarlarda MAGA kullanıldı. Gözenek oluşturucu olarak 2.6 mL DMF ve 0.34 mL fosfat tamponu (5.0 mM, pH 7.0) kullanıldı. Aynı koşullarda hazırlanmış BMA bazlı monolitlerin polimerizasyon çözelti içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. CEC sisteminde 750 mBar basınç uygulayarak hazırlanan polimerizasyon çözeltileri 38 cm silanize edilmiş kolonun 30 cm lik (işaretleyerek) kısmına injekte edildi. Dolgulu kolon 50°C sıcaklıkta 20 saat su banyosunda bekletildi, daha sonra µHPLC pompasına bağlandı ve etanol ile 3µL/min akış uygulayarak 2 saat yıkandı. Hazırlanan monolitik kapiler kolonunun işaretli kısmından ışık geçmesi için çakmak ile yakılarak poliimid tabakası kaldırıldı ve monolitik kolon CEC sisteminde kullanıma hazır hale getirildi

Çizelge 3.1. BMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltilerinin içerdiği madde miktarları

Kolonlar	BMA (mL)	EDMA (mL)	MAGA (mg)	DMF (mL)	PB (mL)	AIBN (mg)
A	0.7	0.35	1	2.6	0.34	3
B	0.7	0.35	5	2.6	0.34	3
C	0.7	0.35	10	2.6	0.34	3
D	0.7	0.35	40	2.6	0.34	3
E	0.7	0.35	40	2.5	0.55	3
F	0.7	0.35	40	2.1	1.05	3
G	0.7	0.35	40	1.8	1.25	3

3.3.4. Poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması

LMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında PEG ve MeOH gözenek oluşturucu sistem olarak seçildi. Monomer çözeltisi 0.75 mL LMA, 0.75 mL EDMA farklı miktarlarda VPBA içerdi. Oluşturulan monomer çözeltisi buz banyosunda (yaklaşık -4°C) bir süre bekletilerek homojen çözelti elde edildi. 1.0 mL metanolde 5 mg AIBN çözüldü ve 2.0 mL PEG ilave edilerek başlatıcı içeren gözenek yapıcı sistem monomer çözeltisine eklendi böylece polimerizasyon çözeltisi hazırlandı. LMA bazlı monolit hazırlanması için polimerizasyon karışımları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Daha önce ifade edildiği gibi CEC sisteminde 750 mBar basınç uygulayarak kolonlar dolduruldu ve 50°C de 20 saat su banyosunda bekletildi. Sentezlenen LMA bazlı monolitik kapiler kolonlar metanol ile 3 µL/min akış uygulayarak 2 saat yıkandıktan sonra Nano-LC de ters faz uygulamaları için hazır hale getirildi.

Çizelge 3.2. LMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltilerinin içerdiği madde miktarları

Kolonlar	LMA (mL)	EDMA (mL)	VPBA (mg)	PEG (mL)	MeOH (mL)	AIBN (mg)
A	0.75	0.75	0	2.50	2.00	5
B	0.75	0.75	0	3.00	1.50	5
C	0.75	0.75	0	3.50	1.00	5
D	0.75	0.75	20	3.00	1.50	5
E	0.75	0.75	40	3.00	1.50	5
F	0.75	0.75	80	3.00	1.50	5

3.3.5. Poli(HEMA-EDMA-MAA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması

Polimerizasyon çözeltisi 0.05 mL HEMA, 0.10 mL MAA ve çarpaz bağlayıcı olarak 0.10 mL EDMA bir deney tüpü içerisinde karıştırılarak 2 mg AIBN ilave edildi. Gözenek oluşturuvcu sistem 1.00 mL toluen ve 0.50 mL dodekanolun ayrı bir deney tüpünde çözünmesi ile elde edildi. Polimerizasyon çözeltisi, monomer ve gözenek oluşturuvcu sistemin karıştırılması ile hazırlandı ve CEC sisteminde silanize kapiler kolona basınç uygulayarak enjekte edildi. Daha sonraki aşamalarda polimerizasyon içeriğindeki farklı parametreleri incelemek için 4 farklı kolon sentezlendi. Çizelge 3.3'de farklı yapıların karışım içerikleri verilmiştir. Monolitik kolon optimize edilerek kromatografi uygulamaları için uygun hale getirildi.

Çizelge 3.3. HEMA bazlı monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltileri madde miktarları

Kolonlar	HEMA (mL)	EDMA (mL)	MAA (mL)	Toluen (mL)	Dodekano l(mL)	AIBN (mg)
A	0.05	0.10	0.10	1.00	0.50	2
B	0.05	0.10	0.10	1.25	0.25	2
C	0.05	0.10	0.10	0.75	0.75	2
D	0.05	0.20	0.10	1.00	0.50	2
E	0.05	0.30	0.10	1.00	0.50	2

3.3.6. Poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması ve modifikasyonu

Bu çalışmada yeni reaktif hidrofilik monomer HPMA-Cl kullanıldı. Monomer çözeltisi 0.3 mL HPMA-Cl, çarpaz bağlayıcı olarak 1.00 mL EDMA içerdi. Gözenek oluşturuvcu sistem 1.80 mL dodekanol ve içerisinde 8 mg AIBN çözünmüş 1.8 mL izopropanoldan oluşturuldu. Bu iki çözelti karıştırılarak polimerizasyon çözeltisi hazırlandı. Polimerizasyon çözeltisi silanize edilmiş kolon içerisine enjekte edildi ve su banyosunda 50°C de 20 saat süre ile polimerizasyon için bekletildi. Metanol ile 5µl/min akış hızında yıkanarak reaktif monolit modifikasyon için hazır hale getirildi. Daha sonra hazırlanan reaktif monolit farklı miktarlarda sulu ortamda hazırlanmış (0.005 g/mL, 0.01 g/mL, 0.05 g/mL ve 0.10 g/mL) taurin çözeltileri (pH 5.9) ile modifikasyon yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.3.7. Karakterizasyon çalışmaları

3.3.7.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Hazırlanan monolitik kolonların morfolojik özelliklerini incelemek için, monolitlerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri Ulusal nanoteknoloji araştırma merkezi (UNAM) (Bilkent Üniversitesi, Ankara) 'nde bulunan SEM cihazından elde edilmiştir. Kromatografik performansı incelenmiş kolonların dolgulu uçlarından yaklaşık 2'şer cm kesildikten sonra altın kaplama yapıldı ve farklı büyüklükte SEM görüntüleri alındı. SEM görüntüleri özellikle monolit hazırlamada kullanılan değişik oranlarda gözenek yapıcı sistemlerin incelenmesi yapılmıştır.

3.3.7.2. Yüzey alanı ve gözeneklilik özellikleri

Yüzey alanı ve civa porozimetre ile monolitlerin gözenek özellikleri incelenmiştir. Civa porozimetri analizleri yalnızca LMA bazlı monolitler için yapılabilmektedir. Bu analizlerin yapılması için yaklaşık 2.5 cm çaplı şırıngalarda makroboyutlu hazırlanan monolit şırınga içerisinden çıkarıldıktan sonra etanol ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutularak toz haline getirilen yapı BET sistemi hücresine kondu ve 80°C de vakum altında 3 saat kurutulduktan sonra analiz yapılmıştır.

3.3.7.3. Elementel analiz

Elementel analiz çalışmaları yalnızca modifikasyonu uğrayan HPMA-Cl monoliti için gerçekleştirilmiştir. Taurinin uygun koşullar altında ne kadar bağlandığı ve yapısındaki azot atomunun miktarına göre elementel analiz ile bağlanan miktarı hesaplanmıştır. Elementel analiz için de, yukarıda ifade edildiği gibi, benzer yöntemler ile şırıngada hazırlanan normal ve modifikasyonlu makroboyutlu monolitik yapılardan alınan numuneler kullanılarak elemental analiz sonuçları elde edilmiştir.

3.3.7.4. Kromatografik performans özellikleri

BMA, HEMA ve taurin modifikasyonu yapılmış HPMA-Cl monolitik kolonları için CEC sisteminde alkil benzen türevleri test bileşikler olarak kullanılması ile kromatografik performans çalışmaları yapılmıştır. Alkil benzen çözeltileri % 0.1 oranında ACN ve farklı derişimli fosfat tamponu içerisinde genellikle % 60:40 oranında hazırlandı. Ters faz için tiyoüre, hidrofilik uygulamalar için toluen alikonmayan analit olarak kullanıldı. Ayrıca kromatografik performanslarının optimizasyonu için farklı oranlarda ACN:fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.3.7.5. Tekrarlanabilirlik

Kromatografi çalışlarında tekrarlanabilirlik çok önemlidir. Çalışmalarımızda hazırladığımız kolonların gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik veya farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği gibi verimlilik analizleri yapılmıştır. Ayrıca kromatografik performansları test edilmiş monolitik kolonlar aynı koşullar altında tekrar hazırlanarak tekrarlanabilirliği tesbit edilmiştir.

3.4. Elektro- sıvı faz kromatografi koşulları

Elektrokromatografi deneylerinde uzun kapiler modu seçilerek analiz yapıldı. Uzun kapiler moduna göre, anot sistemin giriş (inlet) kısmında katot ise sistemin çıkış (outlet) kısmında yer almaktadır. Negatif elektrovoltaj elektrotların polaritelerini terse çevirmektedir. Nano-LC deneylerinde izokratik hareketli faz kullanıldı. Her iki sistem içinde hareketli faz olarak ACN ve fosfat tamponu farklı oranlarda karıştırılarak hazırlandı. 2 M NaOH ve 2 M HCl çözeltileri kullanılarak tampon için istenilen pH değeri oluşturuldu.

3.4.1. Elektrozmotik akış (EOF)

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

$$\mu_{eof} = LeLt/V.t_R$$

Eşitlik (3.1)

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

3.4.2. Alıkonma faktörü (k)

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

$$k = (t_R - t_0)/t_0$$

Eşitlik (3.2)

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

3.4.3. Teorik tabaka sayısı (N) ve tabaka yüksekliği (h)

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

Hazırlanan kolonların N değeri aşağıda verilen formüle göre belirlendi;

$$N = 5,54 \times (t/W_{1/2})^2 \quad \text{Eşitlik (3.3)}$$

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

Teorik tabaka yüksekliği ise aşağıda verilen formüle göre hesaplanır,

$$H = (L/N) \quad \text{Eşitlik (3.4)}$$

Bu eşitlikte, h; teorik tabaka yüksekliği, L; kolon boyu ve N; teorik tabaka sayısıdır. Kolon geçirgenliği hesaplama yöntemi aşağıda verilen Darcy eşitliğine göre yapıldı [113].

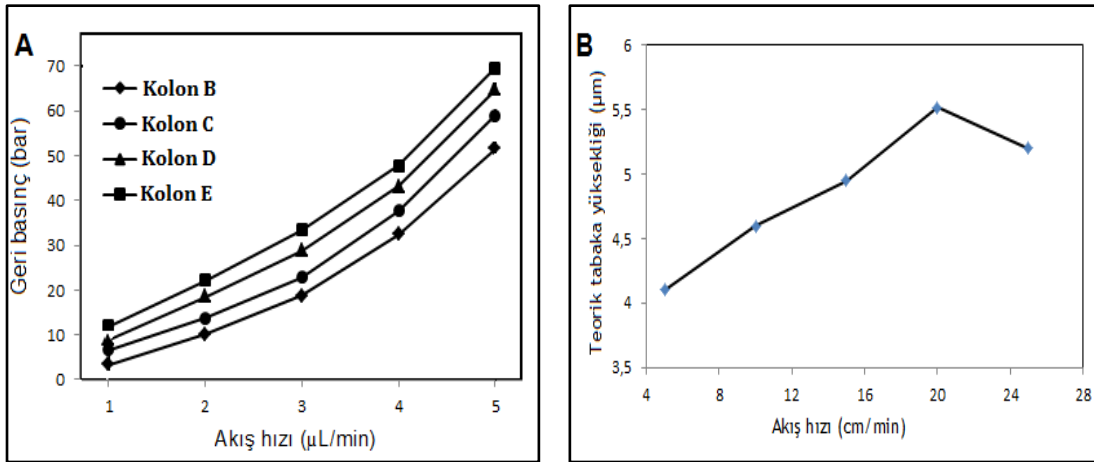
$$K = (F \times \eta \times L) / (\Delta P \times \pi \times r^2) \quad \text{Eşitlik (3.5)}$$

Bu eşitlikte, F; hareketli fazın akış hızı, η ; hareketli fazın viskozitesi, L; kolon uzunluğu, ΔP ; kolonun geri basıncı ve r; kolonun iç çapıdır [13].

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1.Poli(BMA-EDMA-MAGA) monolitik kolonların hazırlanması, karakterizasyonu

Bu çalışmada literatürde ilk olarak amino asit bazlı MAGA monomeri monolitik kapiler kolon hazırlanmasında kullanılmıştır. Çalışma kapsamında MAGA miktarı ve gözenek yapıcı sistem içeriğine bağlı olarak 7 farklı kolon hazırlandı. Hazırlanan kolonlarda hidrofobik yüzey sağlamak için BMA, çapraz bağlayıcı olarak EDMA, kolonda EOF oluşumunu sağlamak için kısmi hidrofobik MAGA monomeri kullanıldı. Uygun gözenek yapıcı sistem oluşturmak için, DMF:su, 1,4-butandiol:1-propanol:su, DMF:fosfat tamponu gibi karışımların denemesi yapıldı. Ancak MAGA'nın yapısı ve çözünübilirlik uyumu dikkate alınarak DMF:fosfat tamponu gözenek oluşturucu sistem olarak seçildi. Hazırlanan A kolonunda akış olmadığı ve bu kolonun SEM görüntüsü incelendiğinde akışa neden olacak gözeneklerin oluşmadığı gözlemlendi.

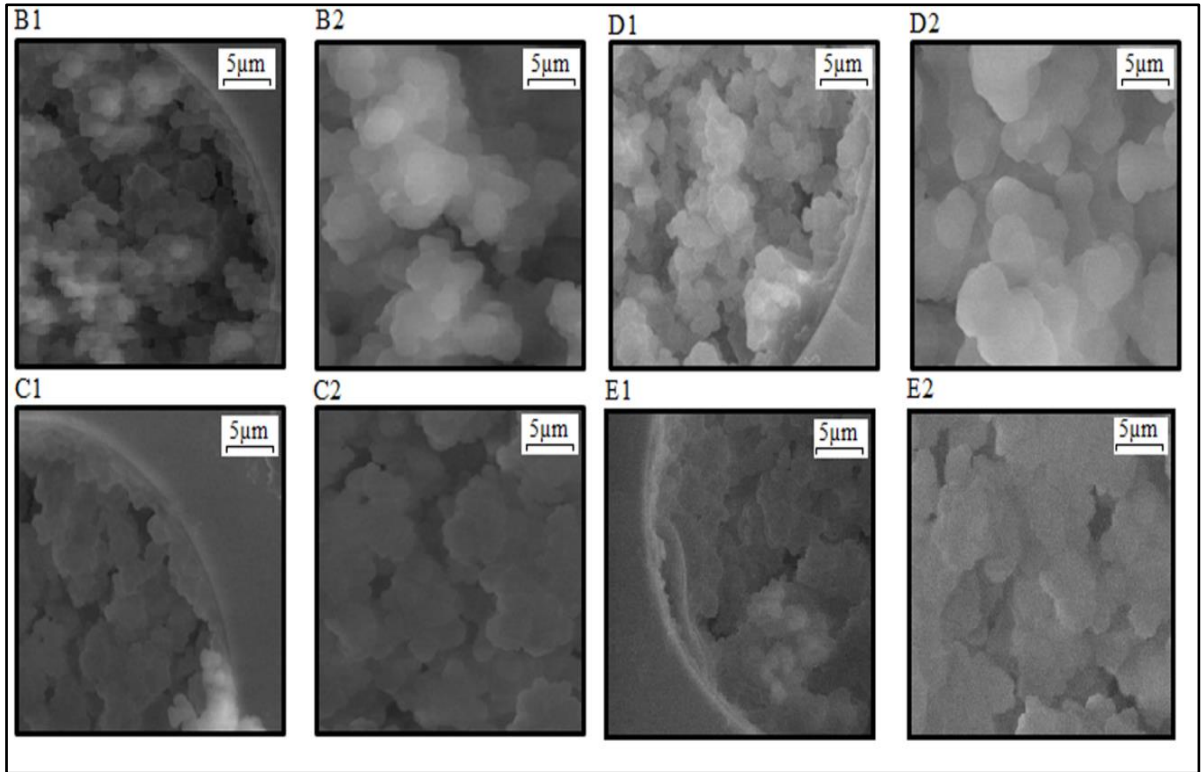


Şekil 4.1. BMA bazlı monolitik kolonların karakterizasyonu A) akış hızına göre geri basınç değerleri B) Teorik tabaka yüksekliği değerleri

B, C, D ve E kolonlarının akış hızına göre geri basınç değerleri Şekil 4.1-A'da verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi, kolonlardaki MAGA miktarı artırıldığında kolonların geri basınç değerlerinde artış olduğu tesbit edildi. B kolonu için 2 µL/dak akışta, sistemde 13 bar geribasinç değeri görüldü ve kolon geçirgenliği 1.93 mm/s olarak hesaplandı. Bu değer kolonun yüksek geçirgenliğe sahip olduğunu göstermektedir. Hareketli faz olarak %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH

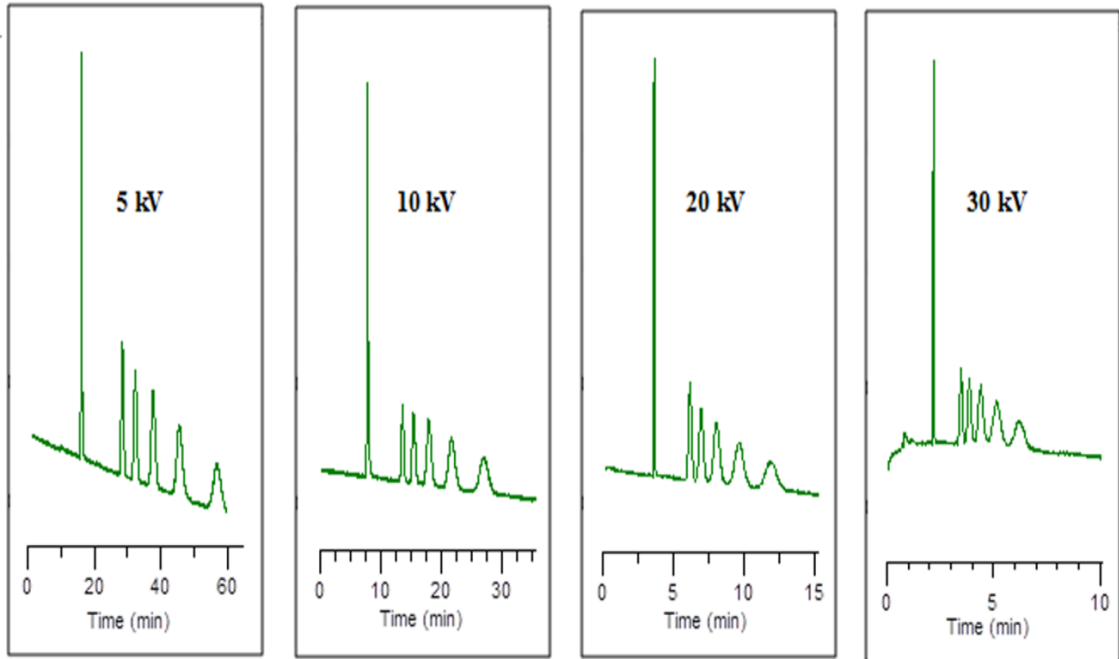
7.0, 10mM) kullanılması ile B kolon için teorik plaka yükseklik değerleri hesaplandı. Şekil 4.1-B'den görüldüğü gibi alkil benzen türevlerinin kullanılması ile hesaplanan değerlerin kolon etkisi ve EOF akış hızı yönlerinden yüksek ve etkili olduğu görüldü. Ayrıca, alkil benzenler için hesaplanan teorik tabaka sayı değerlerinde 1×10^5 (plaka/m)'e kadar ulaşılmıştır. Kolonlar uygun koşullarda şartlandırıldıktan sonra test bileşikleri olarak alkil benzen türevleri kullanıldı ve elektrokromatografik karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Hazırlanmış kolonların morfolojik yapılarını incelemek için kolonların SEM görüntüleri alındı. Şekil 4.2'de kolonların kenar ve iç hacimleri büyütülerek elde edilen SEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntülerinden görüldüğü gibi polimerik yapı kolonların yüzeyi ile sıkı bir yapı oluşturmuştur. Polimerik yapıdaki MAGA miktarının artırılması ile kolonların yapılarında çok farklılık meydana gelmemiştir.



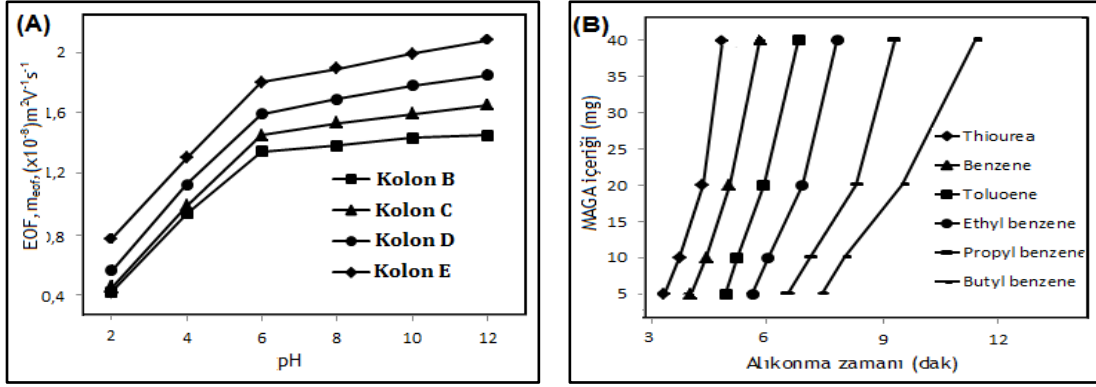
Şekil 4.2. BMA bazlı monolitik kolonların (B-E) kenar ve içkısım SEM görüntüleri

Kolonların kromatografik ayırma performansları, farklı voltaj uygulamaları ile test edildi. Test bileşikleri olarak seçilen alkil benzenler için hareketli faz % 60:40 ACN/fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM) karışımlarından oluşturuldu. Şekil 4.3'den görüldüğü gibi, sistemde +5 kV uygulanması ile toplam analiz süresi 60 dakika, +30 kV uygulandığında ise seçicilik kaybolmadan 5 dakikaya kadar düşmektedir. Elde edilen kolonların kromatografik performans sonuçları düşük MAGA miktarlı B kolonundan, yüksek miktar MAGA içeren E kolonunda daha iyi sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar MAGA miktarının kromatografik seçiciliği ve performansı artırdığını göstermiştir. Ancak, çözünürlük problemlerinden dolayı daha yüksek MAGA miktarı içeren kolonlar hazırlanması mümkün olmamıştır. Dolayısıyla E kolonu diğer kromatografik ayırma çalışmalarında tekrar sentezlenerek kullanılmıştır.



Şekil 4.3. BMA bazlı B kolonun elektrochromatografik karakterizasyonu. Hareketli faz, %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100 µm); enjeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyüre (2) benzen (3) toluen (4) etilbenzen (5) propilbenzen (6) butilbenzen.

Literatürde 4-akrilamidobutirik asit, 2-akrilamidopropen sülfonik asit gibi katyon değiştirici ve buna bağlı olarak CEC sisteminde katodik EOF sağlayıcı monomerler kullanılmıştır [114]. Formamid işaretleyici olarak kullanılması ile hazırlanan monolitik kolonların EOF ölçümleri yapıldı. Monolitik kolonların EOF davranışı Şekil 4.4A'da gösterilmektedir. Buradan görüldüğü gibi hareketli fazda pH arttıka, kolonların EOF davranışlarında artış gözlemlendi. Özellikle MAGA yapısındaki karboksilik asitlerin iyonizasyonu ile oluşan EOF, pH 8.0 de kararlı hale geldi. Bilindiği gibi asidik ve bazik özellik gösteren bileşikler izoelektrik bir değere sahiptir ve bu bileşikler zwitteriyonik olarak ifade edilir. Ayrıca bu bileşikler çözelti içerisinde ve aynı çözeltinin pH değerine bağlı olarak negatif veya pozitif yük özelliği gösterebilir, yani sahip olduğu izoelektrik değerin altındaki pH değerlerinde pozitif, üzerindeki pH değerlerinde negatif yük özelliği gösterir. Glutamik asit'in pI değeri 3.2 dir. Ancak monolitik yapı içerisinde bu değer tahmin edilememektedir. Ancak pH ile artan EOF, asit gruplarının deprotonasyonu ile pH 6.0 kararlı hale gelmiştir. Böylece kolon farklı pH değerlerinde MAGA nın yapısındaki karboksilik asitlerinden kaynaklanan kararlı katodik EOF göstermiştir. Şekil 4.4-B'den görüldüğü gibi, MAGA miktarı arttıka bileşiklerin alıkonma zamanları artmıştır. Bu durum, BMA yapısının etkisi yanında MAGA yapısında bulunan alifatik CH_2 gruplarının kısmi hidrofobik özelliklerinden kaynaklanmaktadır.



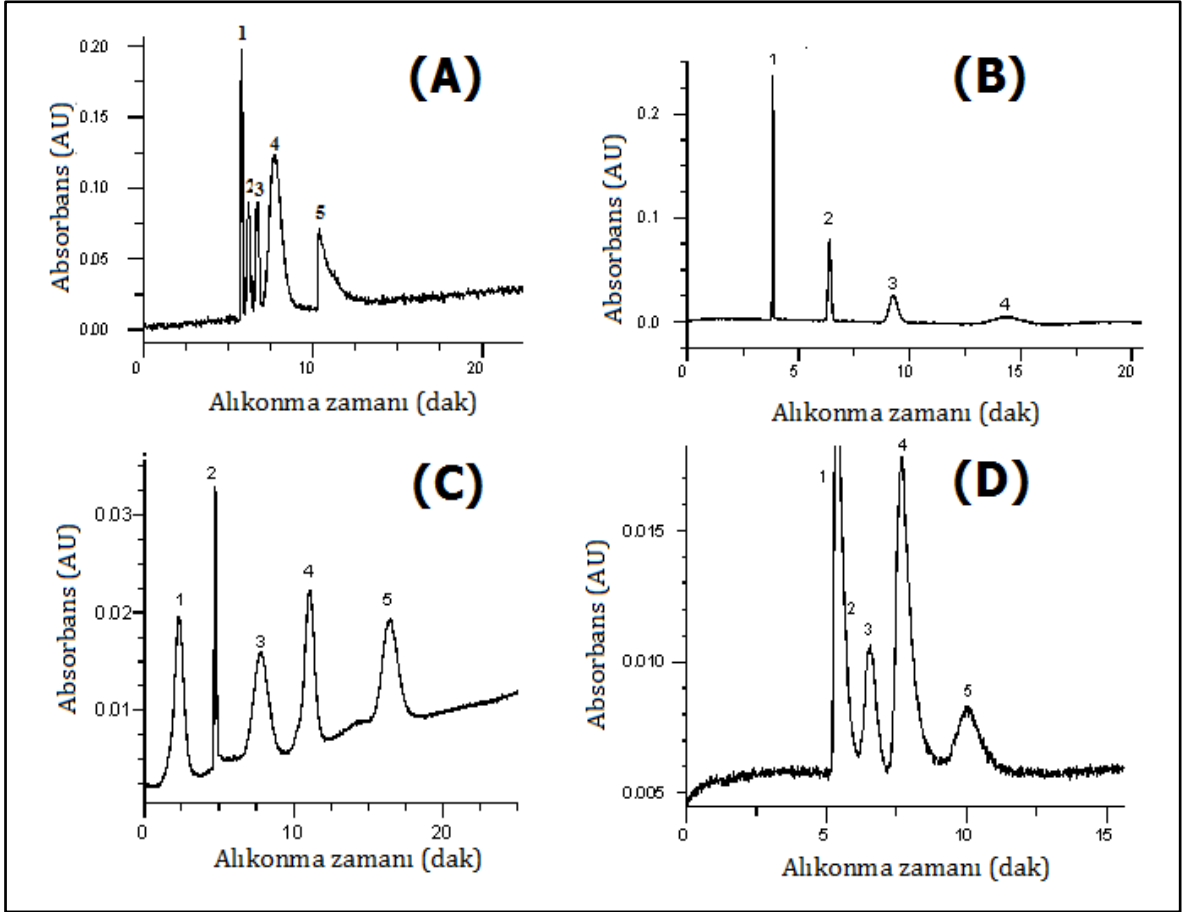
Şekil 4.4. BMA bazlı kolonların karakterizasyonu A) EOF değerleri, Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100 µm); enjeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; alıkonma faktörü, formamid B)MAGA içeriği etkisi

BMA bazlı monolitlerde gözenek yapıcı olarak genellikle 1-propanol ve 1,4-bütandiol kullanıldı [115]. Bu çalışmada hazırlanan BMA bazlı monolitlerde farklı oranlarda DMF ve fosfat tamponu gözenek yapıcı sistem olarak kullanıldı. Hazırlanan D, E, F, G kolonları farklı karışım oranlarında DMF ve fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı ve etkileri incelendi. SEM görüntüleri ve mikroskop altında incelenen kolon yapıları içerisinde en uygun gözenek yapıcı sistemin % 68 DMF içerdiği görüldü. DMF oranı artırıldığında kolonların geri basınç değerlerinin arttığı dolayısıyla kolon geçirgenliği düştüğü görüldü. % 68 DMF içeren E kolonun kromatografik performans yanında, daha yüksek geçirgenliğe sahip olduğu tesbit edildi. Elde edilen bu sonuçlar E kolonunun iyi performans ve yüksek EOF oluşturma potansiyeline olduğundan dolayı biyokromatografi uygulamaları için seçildi.

4.2. Poli(BMA-EDMA-MAGA) kolonu ile kromatografi çalışmaları

4.2.1. Fenolik bileşiklerin ayırımı

Fenoller çevresel kirlenici ve toksik özelliğe sahip olan bileşik sınıfıdır. Bazı fenolik bileşiklerin endüstriyel uygulamalarda ham madde olarak kullanılması dolayısıyla, sularda kirlenici özellik gösterirler. Çalışmanın bu bölümünde, amino asit bazlı monomer modifikasyonu ile sentezlenen ve optimize edilen kolon sulu çözeltiden fenolik bileşiklerin ayırımı için kullanıldı. Hareketli faz olarak %40:60 ACN/fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM) seçildi ve CEC sisteminde katodik EOF ayırımı çalışması yapıldı. Şekil 4.5-A'dan görüldüğü gibi fenolik bileşiklerin etkin ayırımı sağlandı. Fenolik bileşiklerin ayırma mekanizması nötral pH olması sebebi ile monolitik yapı ve bileşikler arasında hidrofobik etkileşimlerin gerçekleştiği görüldü. Fenolik bileşiklerin kısmi hidrofobik özelliklerine göre yani tiyüre<katekol<fenol<3-nitrofenol<α-naftol şeklinde elüsyon sırası gözlemlendi. Elde edilen bu sonuç literatür çalışmaları ile de uygunluk göstermektedir [29]. Sonuç olarak, E kolonuna CEC sisteminde +10 kV uygulaması ile 12 dakika içerisinde fenolik bileşiklerin etkin ayırımı sağlandı.



Şekil 4.5. BMA bazlı monolitik kolon ile kromatografi uygulamaları A) Fenolik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %40:60 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 10 kV; pik sırası, (1) tiyoüre (2) katekol (3) fenol, (4) nitrofenol, (5) α -naftol. B) Poliaromatik hidrokarbonların elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 15 kV; pik sırası, (1) tiyoüre, (2) naftalin, (3) fenantren, (4) piren. C) Bazik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %65:35 ACN/NaOH (pH 12.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) 3-nitroanilin, (2) tiyoüre, (3) N-metilanilin, (4) N,N-dimetilanilin, (5) N,N-dietilanilin. D) Asidik bileşiklerin elektrokromatogramı. Kromatografik koşullar; %45:55 ACN/Fosfat tamponu (pH 2.8, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) tiyoüre, (2) gentisik asit, (3) salisilik asit, (4) benzoik asit, (5) 4-hidroksibenzoik asit.

4.2.2. Poliaromatik (PAH) hidrokarbonların ayırımı

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) organik bileşiklerin eksik yanması sonucu ortaya çıkan toksik ve kansorejen etkiye sahip organik yapıda bileşiklerdir. Çalışmanın bu kısmında, hazırlanan E kolonu CEC sisteminde PAH uygulandı. Şekil 4.5-B'den görüldüğü gibi, kolona uygulanan +15 kV ile PAH ların yaklaşık 15 dakikada ayrıldığı görüldü. PAH ların ayrılma mekanizması da, alkil benzen ve fenollere benzer olarak bileşiklerin hidrofobisitelerinin önemli etkiye sahip olduğu görüldü. Bu sonuçlar, hazırlanan kolonun nötral bileşiklerin ayrılmasında yüksek derecede hidrofobik etkileşime sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Anilin türevlerinin ayırımı

Anilin türevleri sulu çözeltilerde bazik özellik gösteren organik bileşiklerdir. Bazik bileşiklerin ayırımında katyon değiştirici kolonlar kullanılmıştır [9]. Hazırladığımız kolonda MAGA yapısında bulunan karboksilik asit grupları kolona katyon değiştirici karakter kazandırmıştır. Hareketli faz olarak % 65:35 ACN/NaOH (pH 12.0, 10 mM) kullanıldığında etkin ayırım gözlenmedi. Ancak karışım oranları tersine çevrildiğinde yani %35:65 olarak değiştirildiğinde Şekil 4.5-C'den görüldüğü gibi bazik bileşiklerin ayırımı başarıyla sağlandı. Ayrıca 3-nitroanilin bileşiğinin tiyoüreden daha önce elüe olduğu görüldü. Bu sonuçlar % 35 ACN içeren hareketli fazın çok polar bir özellik göstermesi ve 3-nitroanilin diğer test edilen anilinlere göre daha polar olması sebebi ile daha erken elüsyonu görüldü. Kolonun ayırma performansının iyi derecede olmasının diğer sebebi ise monolitin yapısında bulunan MAGA dan kaynaklanan karboksilik asit gruplarının neden olduğu düşük hidrofilik karakterdir. Anilin türevlerinin ayrılmasında bileşiklerin kendi elektroforetik hareketleri ve hareketli faz içeriğinden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler önemli faktörlerdir.

4.2.4. Benzoik asit türevlerinin ayırımı

CEC sisteminde asitler EOF'a ters yönde hareket ettikleri için asidik bileşiklerin analizi oldukça zordur. Literatürde asidik bileşiklerin analizi için iyon etkisi baskılanarak düşük pH'ya ayarlanmış hareketli fazın ters faz CEC modunda kullanılması önerilmiştir [116]. Asidik bileşikler olarak, gentisik asit, salisilik asit, benzoik asit ve 4-hidroksi benzoik asit test bileşikleri olarak seçildi. Hareketli fazda kullanılan Fosfat tamponu pH 2.8'e ayarlandığında sistemin katodik EOF gösterdiği tesbit edildi. Hareketli faz olarak %45:55 ACN/fosfat tamponu (pH 2.8, 10 mM) kullanılarak Şekil 4.5-D'den görüldüğü gibi asidik bileşiklerin ayırımı gerçekleştirildi. Düşük pKa değerine sahip olan asitlerin sulu çözeltilerde daha yüksek negatif yük özelliği göstermektedir. Buna bağlı olarak asidik bileşiklerin elüsyon sırası tiyoüre<gentisik asit<salisilik asit<benzoik asit<4-hidroksi benzoik asit şeklinde görüldü. Ayrıca, hareketli fazda değişik ACN içeriği asidik bileşiklerin ayrılmasında etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, ayırma mekanizmasının daha çok elektroforetik hareket ve EOF'a bağlı olduğu göstermiştir.

Çizelge 4.1. % 60/40 (v/v) ACN/Fosfat tamponu (10 mM, pH 7.0) uygulanan voltaj; 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 27 cm (toplam uzunluk 36 cm)

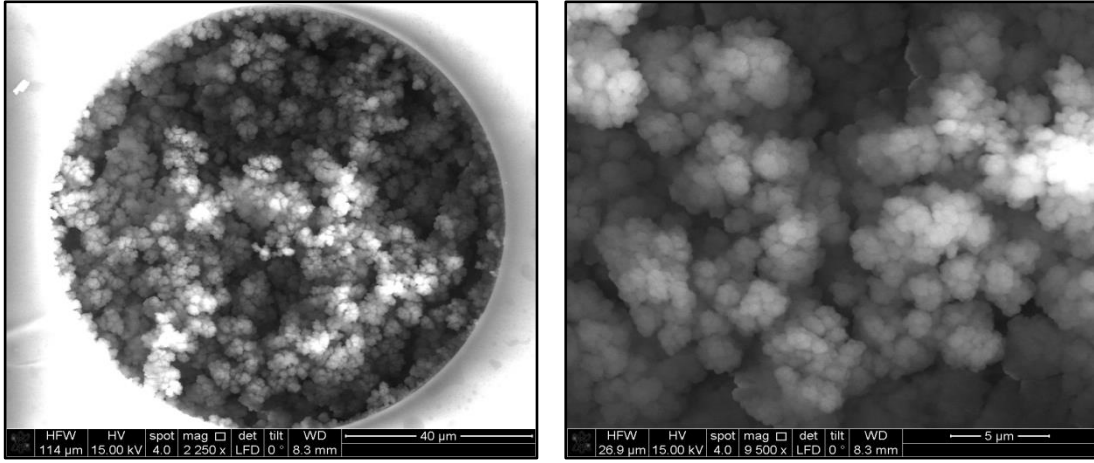
Bileşikler	Analizden analize tekrarlanabilirlik RSD (%)	Günden güne tekrarlanabilirlik RSD (%)
Thiourea	0.19	1.24
Benzene	0.38	1.18
Toluene	0.49	1.31
Ethylbenzene	0.53	1.23
Propylbenzene	0.56	1.30
Butylbenzene	0.66	1.28

4.2.5. Kolon verimliliği ve kararlılık alışmaları

Aynı koşullar altında hazırlanan kolonlar için gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik (run to run reproducibility) veya farklı günlerde yapılan analizlerin terarlanabilirliği (day to day reproducibility) gibi verimlilik analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi hesaplanan tekrarlanabilirlik değerleri % 1.4'den daha düşüktür. Ayrıca kolonların uzun süreli kullanım çalışmaları da yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kolonların uzun süreli kullanılabilirliğini göstermiştir.

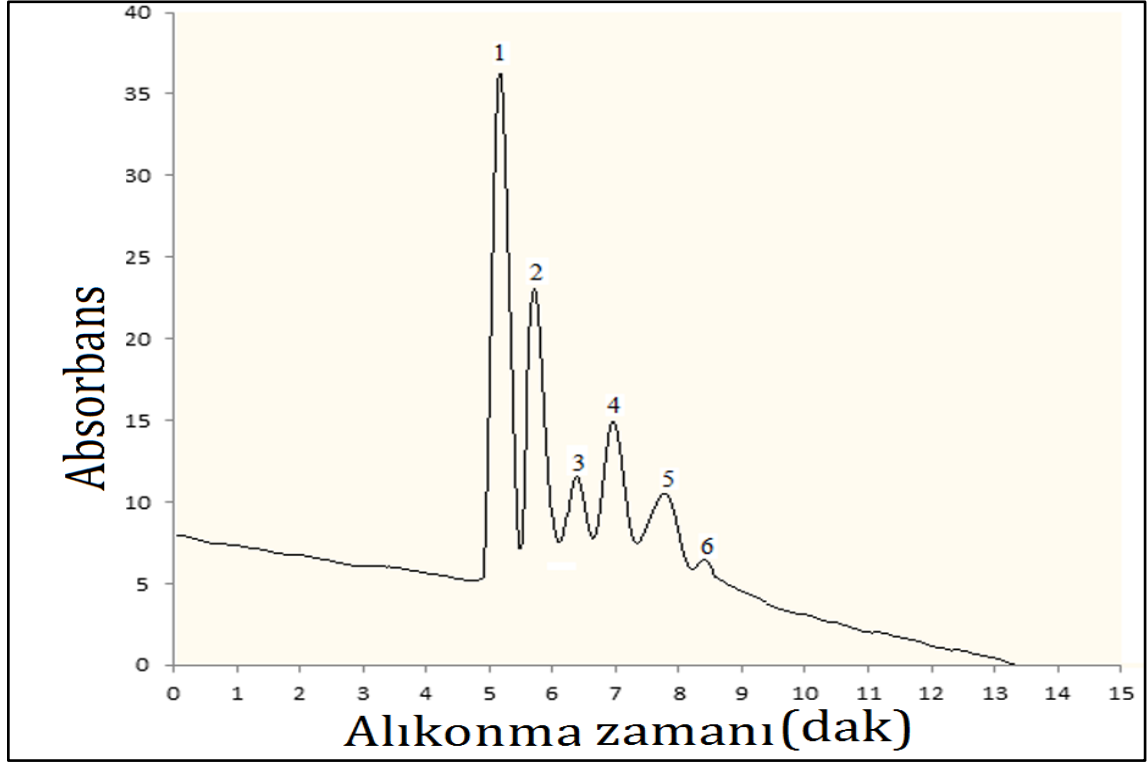
4.3.Poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması ve karakterizasyonu

Glikoprotein analizi için VPBA modifikasyonlu monolitik kapiler kolonlar literatürde sıklıkla yer almaktadır [117]. Genellikle bu çalışmalarda GMA bazlı reaktif monolitler hazırlanarak boronik asit ile modifikasyonu yapılmıştır. Glikoproteinler hidrofobisitesi yüksek ve boronat gibi diol yapılara afinite gösteren biyomoleküllerdir. Dolayısıyla bu çalışmada literatürde ilk olarak hidrofobik LMA monomeri ile boronat yapı içeren VPBA kullanılarak karışık mod bazlı monolitik kapiler kolon hazırlandı. Monolitik kapiler kolonların hazırlanmasında 1-propanol/PEG, 1-propanol/dodekanol, 1-metanol/PEG ve 1-metanol/dodekanol gibi farklı gözenek oluşturuvcu sistemler kullanıldı. Yapılan deneysel çalışmalarda kolonlarda en yüksek geçirgenlik 1-metanol/PEG sistemi kullanılarak elde edildi. Ayrıca seçilen gözenek oluşturuvcu sistemin monomer çözeltisi ile çözünebilirliğinin yüksek olduğu gözlemlendi. Uygun miktarlarda optimizasyonu yapılarak hazırlanan B kolonun geçirgenliğinin iyi olduğu görüldü. Daha sonra polimerizasyon çözeltisinde diğer oranlar sabit tutularak VPBA içeriği değiştirildi (kolon D, E ve F). E kolonunda daha yüksek geçirgenlik elde edildi. F kolonunda ise akış görülmedi. Bu sonuç fazla miktarda VPBA kullanılması, kolon gözeneklerini tıkadığı sonucunu ortaya koydu. D ve E kolonlarının yüzey alan ölçümleri BET sisteminde yapıldı ve sırasıyla 43.5, 54.8 m²/g olarak bulundu. Bu değer monolitik yapıda VPBA oranı arttıkça yüzey alanın arttığı görüldü. Ayrıca, E kolonu için yapılan geri basınç ölçümlerinde artan akış hızına paralel olarak artış gözlemlendi dolayısıyla kromatografik performansı yüksek olan E kolonu kromatografik uygulamalar için seçildi.



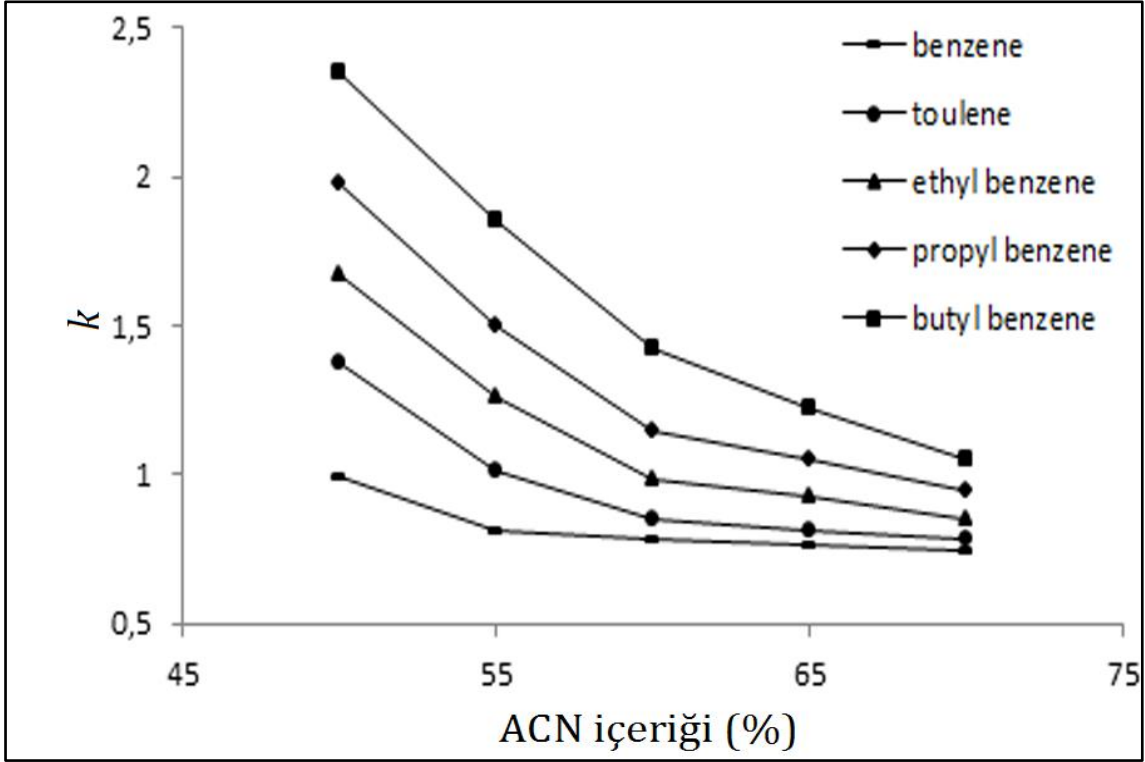
Şekil 4.6. Poli(LMA-EDMA-VPBA) kolonunun 2250x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri

E kolonu için poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik yapının 2250x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu görüntülerden monolitik yapının homojen bir dağılıma sahip olduğu ve partikül boyutlu agregatlardan oluştuğu görülmektedir. E kolonunun kromatografik karakterizasyonu için alkil benzenler test bileşikleri olarak kullanıldı.



Şekil 4.7. LMA bazlı kolonun kromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar %70:30 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/dak; uygulanan basınç, 8 MPa; pik sırası, 1) tiyoüre, (2) benzen, (3) toluen, (4) etilbenzen, (5) propilbenzen, (6) butilbenzen.

Hazırlanan monolitik kolonun yapısında hidrofobik LMA ve kısmi hidrofobik VPBA olduğundan dolayı, test bileşikleri ve monolit arasında hidrofobik etkileşimler gerçekleşebilir. Hareketli faz olarak % 70:30 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM) kullanıldı ve 4.7'den görüldüğü gibi Nano-LC sisteminde bileşiklerin etkin ayrımı gerçekleşti. Bileşiklerin elüsyon sırasının yapılarında bulunan karbon sayısına bağlı olması, ayırma mekanizmasında en önemli faktörün hidrofobik etkileşimler olduğunu göstermektedir. Hareketli fazda ACN içeriği değiştirilerek monolitik yapı ile test bileşikleri arasındaki hidrofobik etkileşimler incelendi. Şekil 4.8'den görüldüğü gibi hidrofobik etkileşimler artırıldığında (düşük organik içerik) bileşiklerin monolitik yapı ile etkileşimlerinin arttığı görüldü. Nano-LC sisteminde alkil benzenler için teorik tabaka sayısı 52000 plaka/m'e kadar elde edildi. Bu sonuç kolonun kromatografik performansının iyi derecede olduğunu göstermektedir.

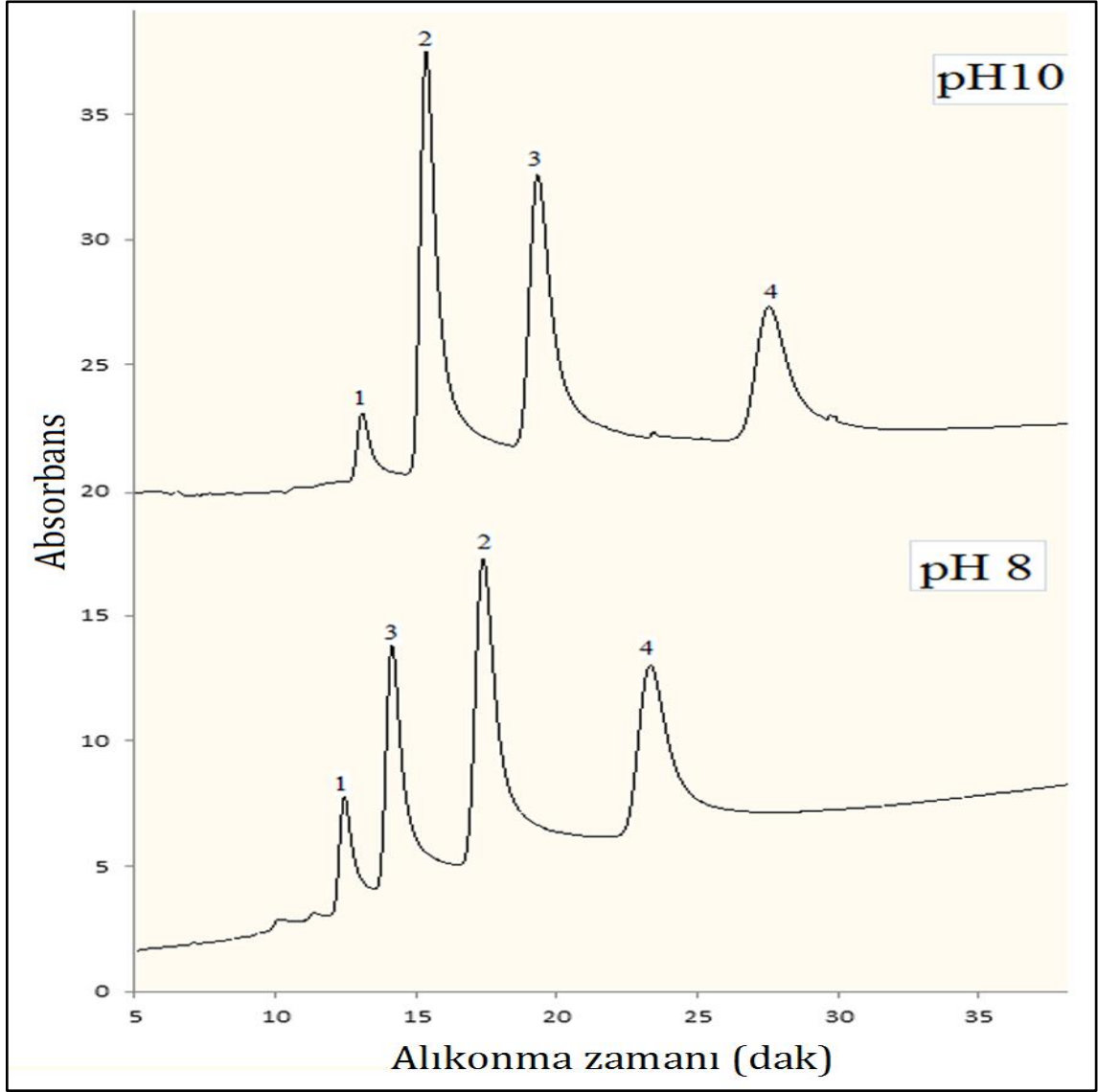


Şekil 4.8. ACN içeriği etkisi. Kromatografik koşullar ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/dak; uygulanan basınç, 8 MPa.

4.4. Poli(LMA-EDMA-VPBA) kolonu ile kromatografi çalışmaları

4.4.1 Bazik bileşiklerin ayırımı

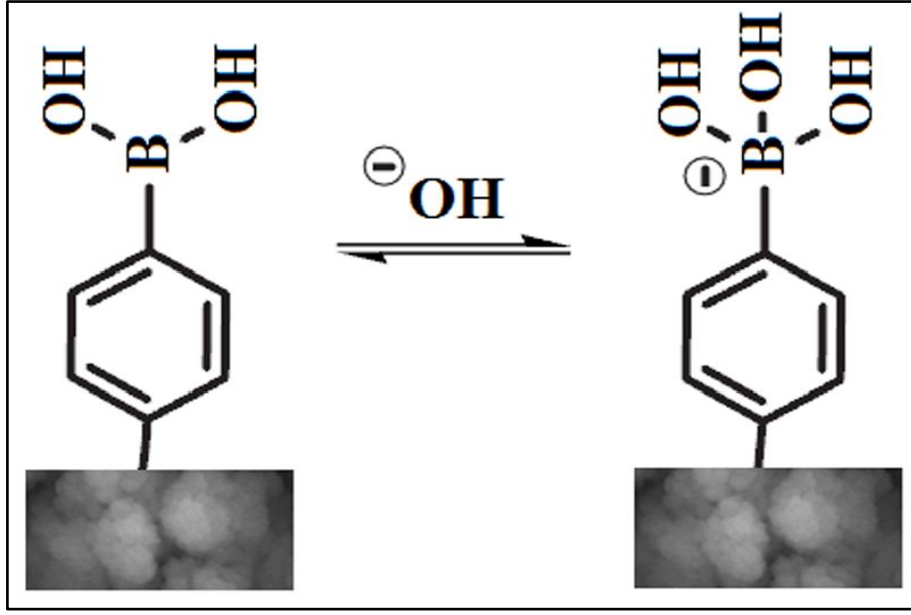
Boronik asit modifikasyonu ile hazırlanan kolonun hidrofobik etkileşmeler yanında iyonik etkileşmelerinde meydana gelmesi söz konusudur. Zayıf bir asit olan fenil boronik asit'in pKa değeri 8.66 dır. VBPA da bulunan boron atomu sp^3 hibritleşmesi gösterdiğinden, boron atomu bazik koşullarda negatif yük özelliği gösterir [118]. Monolitik yapıda bulunan boron atomunun genel iyonizasyonu, Şekil 4.9'da verilmiştir. Bazik bileşiklerin test edilmesi ile kolonun bu tür iyonik karakter özelliği incelenebilir. Bazik bileşikler olan, anilin, 3-nitroanilin ve α -naftilamin test bileşikler olarak seçildi. Nano-LC sisteminde, hareketli faz olarak %70:30 ACN:fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM) kullanıldı ve Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi kolonun etkin ayırma sağladığı görüldü.



Şekil 4.9. LMA bazlı monolitik kolon ile bazik bileşikler için pH 8.0 ve pH 10.0 değerlerinde elde edilen kromatogramlar. Kromatografik koşullar; %70:30 ACN/Fosfat tamponu (10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 MPa, pik sırası (1) tiyoüre, (2) anilin (3) 3-nitroanilin (4) α -naftil amin.

Monolitik yapıda hidrofobik etkileşimlerin azaltılması yani hareketli fazda organik içeriğin artırılması, iyonik etkileşimleri artırmış ve buna bağlı olarak bileşiklerin alıkonma zamanlarını uzatmıştır. Ancak iyonik etkileşimlerin en belirleyici özelliği hareketli fazın pH değeridir. Kolonun yapısında bulunan boronik asit pKa değerine bağlı olarak, hareketli fazın pH değeri artırılarak ayırma sağlandığında, Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi iyonik etkileşimlerin net olarak ortaya çıktığı görülmüştür. İlk

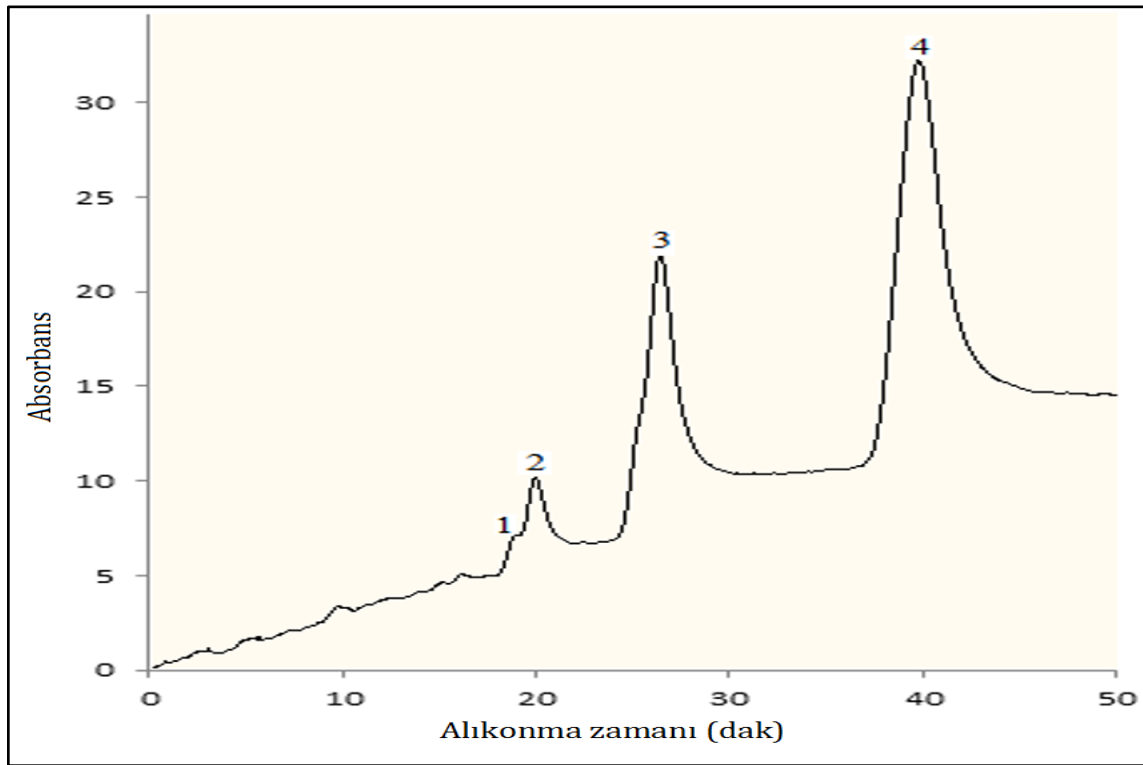
olarak bileşiklerin alıkonma zamanları artmıştır. Özellikle daha yüksek bazik karakterli ve yüksek iyonizasyona uğrayan 3-nitroanilin'in kolon içerisinde alıkonma zamanı daha fazla uzamıştır. Bu sonuç kolondaki boronik asidin, pH 10.0 da negatif olarak daha iyi iyonize olması ve pozitif yük özelliği gösteren 3-nitroanilin ile daha fazla etkileşime girdiğini göstermektedir. Monolitik kolonun böyle etkileşim göstermesi, hidrofobik karakter yanında, katyon değiştirici karaktere de sahip olduğunu gösterir.



Şekil 4.10. Poli(LMA-EDMA-VPBA) monolitik kolonun genel iyonizasyonu

4.4.2. Fenolik bileşiklerin ayırımı

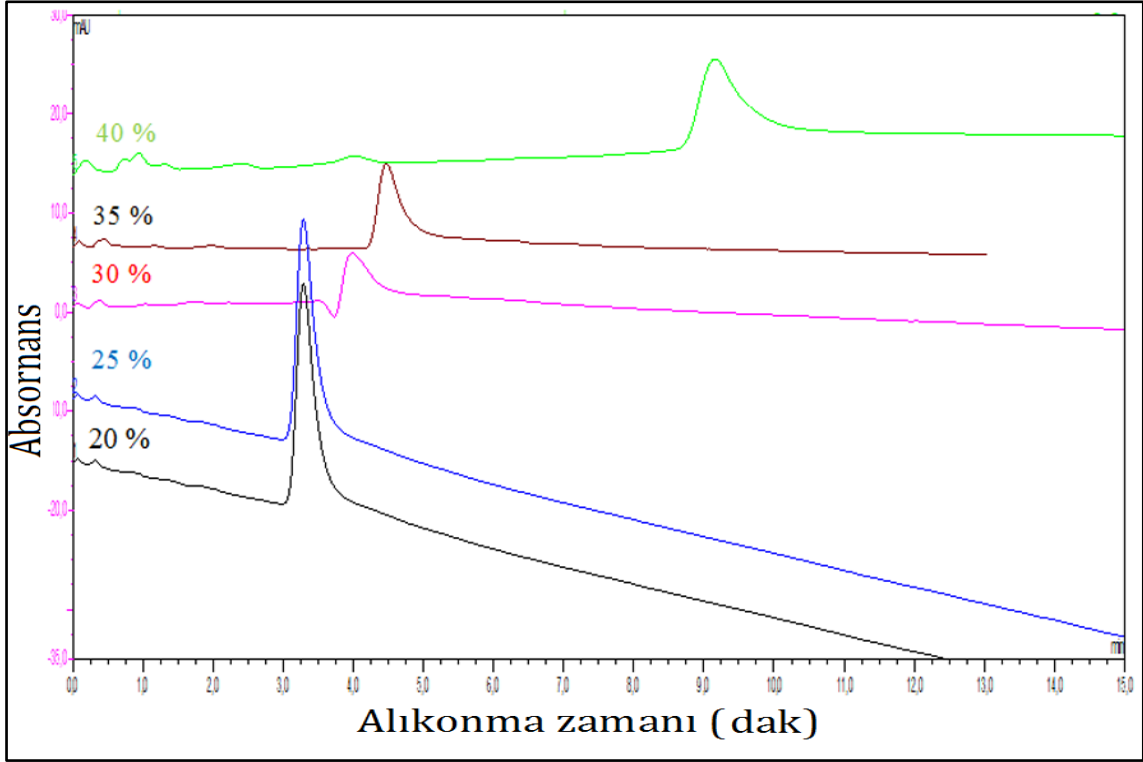
Boronik asit modifikasyonlu kolonlar özellikle yapılarında cis-diol fonksiyonel grupları bulunduran bileşikler için seçici özellikler gösterir [117]. Bazı fenolik bileşikler cis-diol yapılarıdır. Çalışmanın bu kısmında, bazı bağlanma izomerleri olan fenolik bileşiklerin monolitik yapı ile olan etkileşimleri incelendi. Katekol, 1,2-cis diol yapısında, hidrokinon ise 1,4 cis-diol yapısında olan bağlanma izomerleri fenolik bileşiklerdir. Hareketli faz olarak %60:40 ACN/fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM) kullanıldığında, test bileşikler olan tiyoüre, fenol, katekol ve hidrokinonu kolonun başarıyla ayırdığı görüldü. Özellikle katekol ve hidrokinon'un kolon ile etkileşimleri incelendiğinde, Şekil 4.11'den görüldüğü gibi 1,4-cisdiol olan hidrokinon, 1,2-cisdiol olan katekolden daha erken elüsyona uğradığı görüldü. Bu sonuçlar, kolonun yapısında bulunan boronik asidin 1,2-cisdiol yapılarıya özgü etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.11. LMA bazlı kolon ile fenolik bileşiklerin ayırımı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 Mpa, pik sırası (1) tiyoüre, (2) fenol, (3) hidrokinon, (4) katekol.

4.4.3. Protein analizi ve etkileşimleri

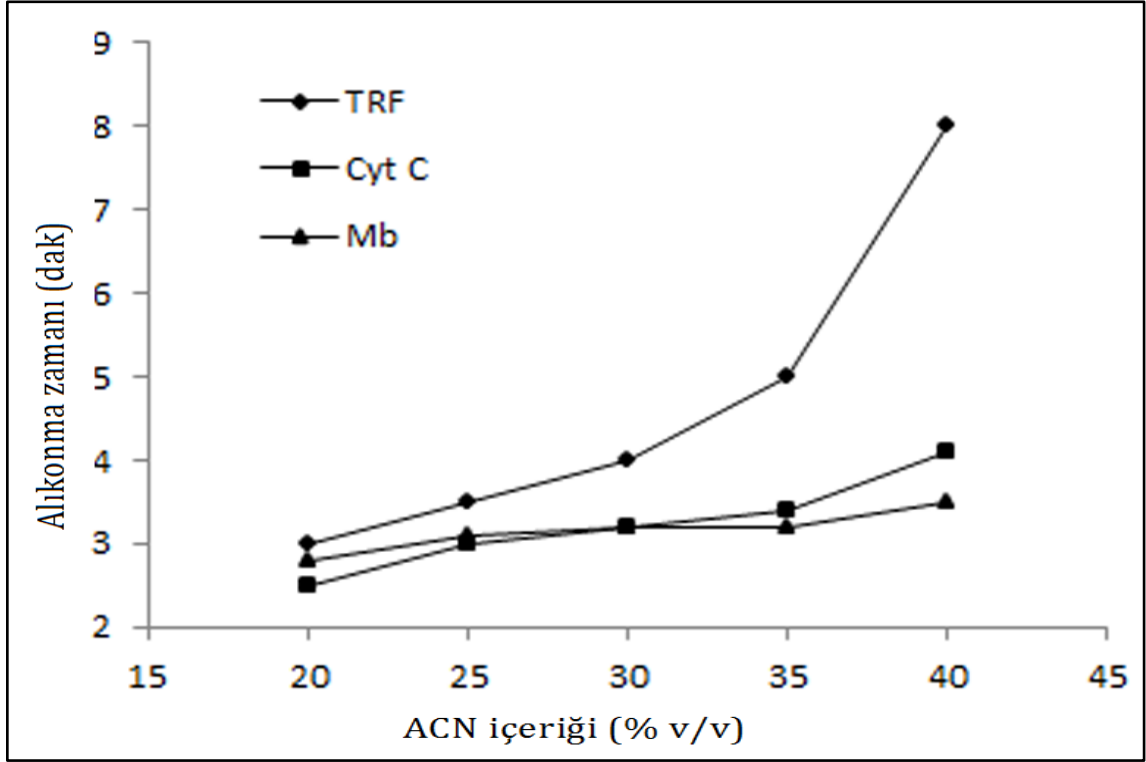
Boronat özelliğe sahip kolonlar glikoprotein afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılmıştır [119]. Çalışmada, hazırlanan monolitik kolonun boronik asit yapılı olmasından dolayı glikoprotein özellikli proteinler ile etkileşimi incelendi. Plazma glikoproteini olan transferrin, miyogloblin ve sitokrom c model proteinler olarak seçildi. %20:80 ACN/fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM) karışımı hareketli faz olarak kullanıldı. Trifloroasetik asit karşı iyon olarak proteinlerin monolitik yapı ile daha iyi etkileşim sağlayacağından, hareketli faz içerisine % 1 (v/v) oranında trifloroasetik asit ilave edildi. Nano-LC sisteminde ayrı ayrı proteinlerin uygulaması yapıldığında, Şekil 4.12'de verilen kromatogramlardan görüldüğü gibi demir bağlayıcı özelliğe sahip bir plazma glikoproteini [120] olan transferrinin diğer proteinlere göre azalan hidrofobik etkileşimlerle (artan ACN içeriği) daha fazla afinite gösterdiği görülmektedir. Buradan görüldüğü gibi ACN içeriği % 20 den % 40' a artırılması ile hidrofobik etkileşimlerin azalması ve boronat yapıdan kaynaklanan afinite etkileşimlerinin arttığı görülmüştür.



Şekil 4.12. Transferrin proteini için LMA monolitik kolonu ile farklı ACN miktarlarında etkileşim kromatogramı. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); % 0.1 TFA; akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç;8 MPa.

Model proteinlerin, hareketli faz içerisinde ACN içeriği artırıldığında (azalan hidrofobik etkileşimler) monolitik kolonla etkileşimleri ile ortaya çıkan alıkonma süreleri Şekil 4.13’de verilmiştir.

Miyogloblin ve sitokrom C den farklı olarak bir glikoprotein olan transferrinin monolitik yapı ile daha fazla etkileşime girdiği görülmektedir. Sonuçlardan anlaşılacağı gibi, hazırlanan kolonun yüksek derecede ters faz ve afinite etkileşim gösteren yapıya sahip yeni bir polimetakrilat bazlı monolitik kolon olduğu görülmektedir.



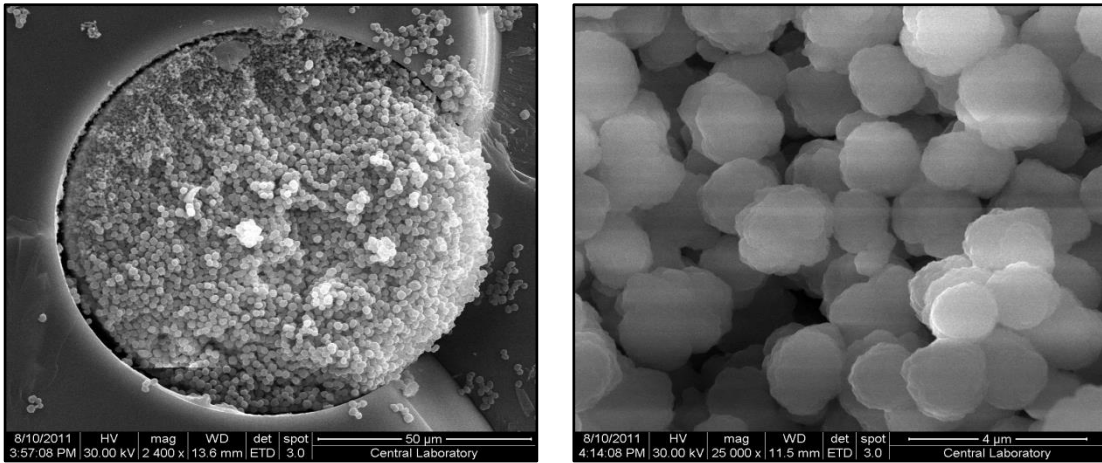
Şekil 4.13. Proteinlerin değişen ACN içeriği ile elde edilen alıkonma süreleri. Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); % 0.1 TFA; akış hızı, 0.02 mL/min, uygulanan basınç; 8 MPa.

4.4.4 Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları

Kromatografik uygulamalarda aynı koşullarda benzer kolonlar hazırlanmış çalışmalarda kullanılmıştır. Aynı koşullar altında hazırlanan kolonların analize tekrarlanabilirlik veya farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği gibi verimlilik analizleri yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik değerleri % 2 den daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar kolonun verimli ve uzun zaman kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

4.5. Poli(HEMA-EDMA-MAA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması ve karakterizasyonu

Bu çalışmada, HEMA bazlı monolitik kapiler kolonlar sentezlenmesi için hidrofilik karakterli HEMA ile benzer özelliğe sahip MAA polimerik monomerleri kullanıldı. Monolitik yapının optimizasyonu için gözenek yapıcı sistem ve monomer oranları kısmi oranda değiştirildi. Uygun koşullarda yapılan bazı denemeler ile geçirgenlik oranı yüksek olan A monolitik kolonu oluşturuldu. B ve C kolonları için gözenek oluşturuvcu sistem içeriği değiştirildiğinde geçirgenliğin daha düşük olduğu görüldü. C ve D kolonlarının içeriklerinden görüldüğü gibi, polimerizasyon çözeltisinde çapraz bağlayıcı oranı artırıldığında kolonlarda akış görülmedi. Bu sonuç gözeneklerin küçüldüğü ve daha sıkı bir yapı oluştuğu sonucunu ortaya koydu. 2 µL/dak akış hızı ile A kolonunda 35 bar geri basınç değeri görüldü. Bu değerlerden geçirgenlik 1.3 mm/s olarak hesaplandı. A kolonu için 2400x ve 25000x ölçekli SEM görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir. SEM görüntülerinden görüldüğü gibi kolon geniş gözenek kanalları içeren yaklaşık 2 µm boyutlu kürelerden oluşmuştur. Bu sonuçlar poli(HEMA-EDMA-MAA) kolonun gözenek ve yapısal karakteristik özelliğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Poli(HEMA-EDMA-MAA) kolonunun 2400x ve 25000x ölçekli SEM görüntüleri

4.6 Poli(HEMA-EDMA-MAA) kolonu ile kromatografi çalışmaları

4.6.1 Sülfonamidlerin hidrofilik etkileşimlerinin incelenmesi

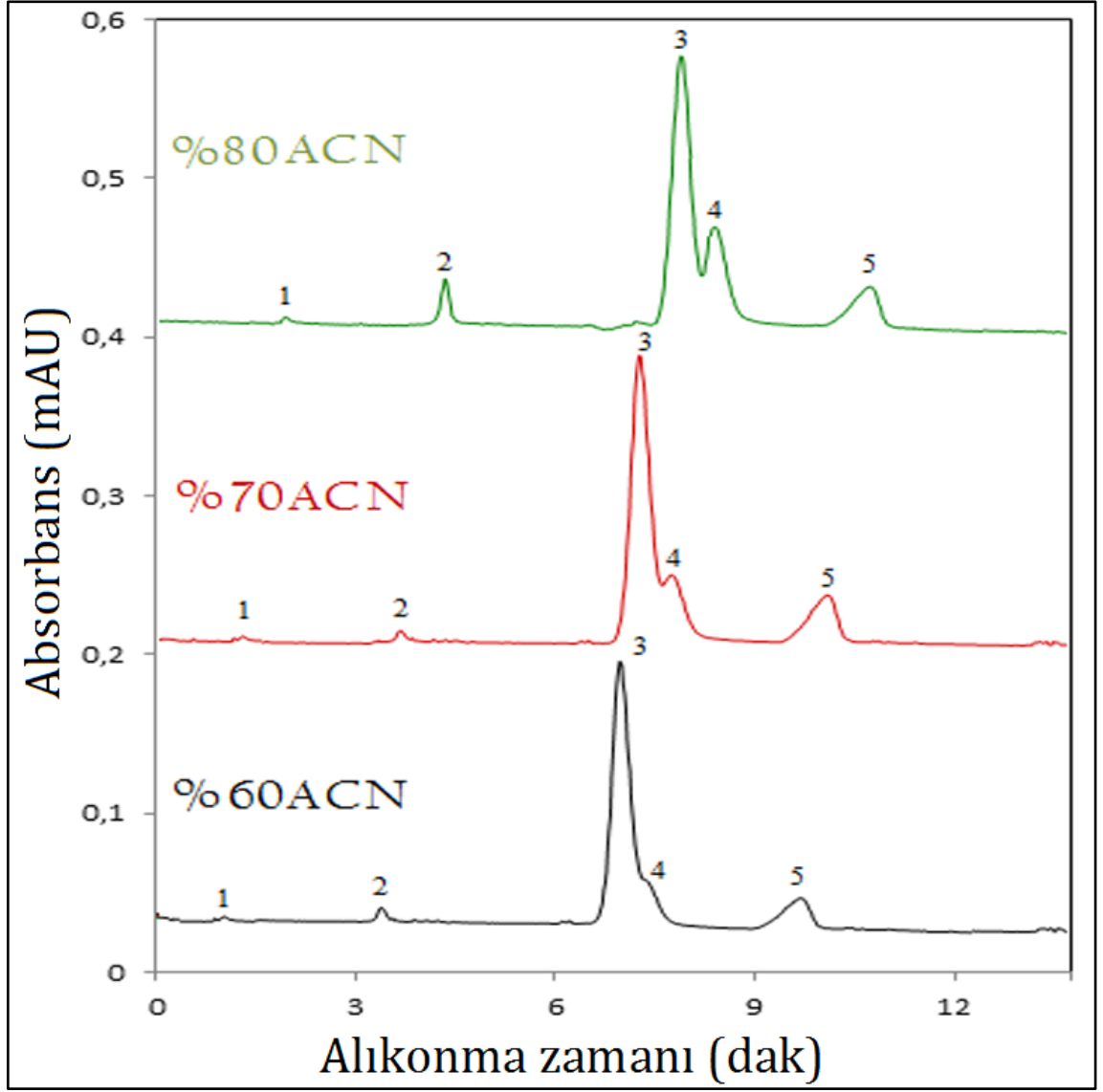
Hazırlanan kolon farklı sülfonamidlerin hidrofilik etkileşim kromatografisinde kullanıldı. Hidrofilik etkileşim hareketli fazda yüksek oranda organik faz içermesi ile meydana gelmektedir ve artan organik faz içeriğine paralel olarak analitlerin polar faz ile etkileşiminin artması beklenir [121]. Sülfonamidlerin pKa değerlerine bağlı olarak sulu çözeltilerden pozitif, negatif veya nötral olarak ayrılması sağlanabilir. Hazırlanan kolonda MAA bulunmasından dolayı düşük pH değerlerinde karboksil asit grupları zayıf iyonizasyona uğrar ve düşük dereceli katodik EOF olduğu gözlemlendi. Sülfonamidlerin artan pH değerlerine karşın alıkonma zamanlarının arttığı gözlemlendi. Genellikle sülfonamid antibiyotikleri pH 4.0 değerine yakın pH'larda nötral özellik gösterirler. Buna bağlı olarak pH 4.0 de yapısal özelliklerinden dolayı hidrofilik bir kolon içerisinde hidrofilik etkileşim yapabilirler.

Çizelge 4.2. Farklı pH değerlerinin sülfonamidlerin alıkonma süreleri üzerine etkisi. % 60/40 (v/v) ACN/Fosfat tamponu (10 mM) uygulanan voltaj; 20 kV, Etkin kolon uzunluğu: 27 cm (toplam uzunluk 36 cm), elektrokinetik enjeksiyon, 12 kV, 0.10 dak.

pH	SPRY t _R	SDZ t _R	SMZ t _R	SXZ t _R	SDX t _R
3.0	2.2	3.3	5.6	6.9	9.2
4.0	2.2	3.4	6.7	7.1	9.4
5.0	-	3.8	7.4	8.5	-
6.0	-	-	8.0	-	-
7.0	-	-	9.2	-	-

Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi zayıf asidik ve nötral koşullarda bazı sülfonamidlerin elüsyonu görülmedi. Bu sonuç zayıf EOF dan ileri gelmektedir. Ancak, EOF un artırılması durumunda ise (pH 7.0 veya daha yüksek) bu koşullarda negatif yük özelliği göstermelerinden dolayı sülfonamidlerin, EOF'a ters yönde hareketleri gözlemlendi. Ayrıca yüksek derecede iyonizasyona uğrayan sülfonamidlerin elektrokinetik olarak kolona girmediği belirlendi. En iyi sonuç pH 4.0 de elde edildiği için hidrofilik etkileşimler için bu pH değeri seçildi.

Hidrofobik etkileşimlerin tersine, hareketli fazda organik içerik arttıkça (genellikle % 60 veya daha fazla) monolitik yapı ile polar analitler arasında hidrofilik etkileşimler görülebilir [90]. Çalışmamızda, hareketli faz olarak %60:40 ACN/fosfat tamponu (pH 4.0, 10 mM) kullanıldı ve ayırma mekanizmasında Şekil 2.25'den görüldüğü gibi monolitik yapı ile test edilen sülfonamidler arasında daha çok hidrofilik etkileşimler meydana gelmiştir. Sülfonamidlerin elüsyon sıraları sırası ile SPRY, SDZ, SMZ, SXZ and SDX şeklinde gözlendi. Yine aynı şekilden görüldüğü gibi, ACN içeriği artırıldığında, analitlerin alıkonma zamanlarının artması ve aynı zamanda rezolüsyonun daha iyi olması kolonun hidrofilik karaktere sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. Sülfonamitlerin hareketli fazda %60-80 ACN içerikli elektrokromatogramları. Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 4.0, 10 mM); uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası, (1) SPRY, (2) SDZ, (3) SMZ, (4) SXZ, (5) SDX.

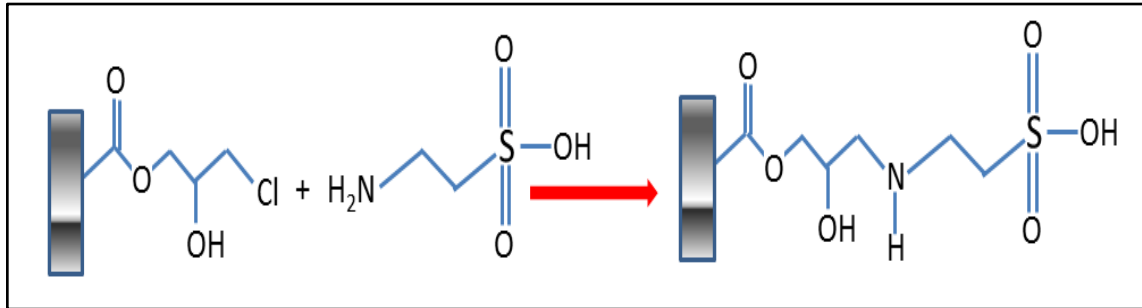
Sonuç olarak literatürde ilk olarak sülfonamit antibiyotiklerinin monolitik hidrofilik etkileşim davranışları incelenmiştir ve etkin sonuçlar elde edilmiştir.

4.6.2. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları

Poli(HEMA-EDMA-MAA) kolonun çalışmadan çalışmaya ve günden güne verimlilik çalışmaları sülfonamidler ile test edildi. Çalışmadan çalışmaya yapılan 10 analizde (n=10), sülfonamidlerin verimlilik değerleri sırası ile SPRY; 0.13, SDZ;0.28, SMZ;0.43, SXZ;0.51 ve SDX;0.67 olarak hesaplandı. Günden güne yapılan analizlerde ise SPRY; 1.20, SDZ;1.52, SMZ;1.47, SXZ;1.62 ve SDX; 1.34 olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar hidrofilik monolitin tekrar hazırlanabilirliği yanında, yüksek derecede verimli ve kararlı olduğu görülmüştür.

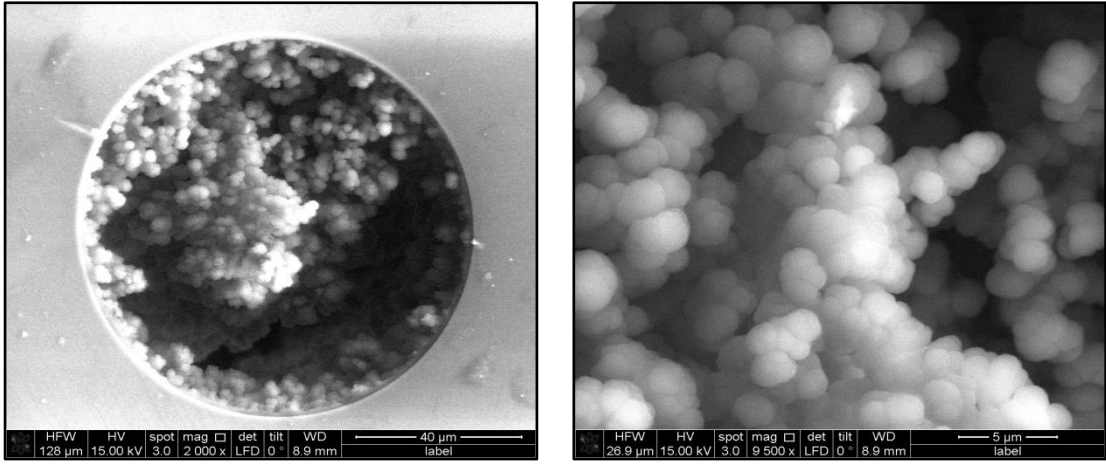
4.7.Poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kapiler kolonların hazırlanması, modifikasyonu ve karakterizasyon çalışmaları

Literatürde GMA bazlı monolitik kapiler kolonlar yaygın olarak hazırlanmış ve bazı hedef moleküle özgü kromatografik ligandlar kullanılarak modifikasyonları yapılmıştır [12]. Bu çalışmada literatürde ilk olarak HPMA-Cl bazlı yeni bir reaktif monolit hazırlanmış ve 2-amino sülfonik asitle (taurin) ile modifikasyonu yapılmıştır. Reaktif monolitin kimyasal modifikasyonu için yapılan tepkime Şekil 4.16'da verilmiştir. Hazırlanan monolitik yapıda gözenek oluşturuucu sistem olarak dodekanol ve izopropanol kullanılmıştır. Kolon μ HPLC pompasına bağlanarak 3 μ L/dak akış uygulandığında geri basınç değeri 2 bar olarak görüldü. Bu değer kolonun yüksek geçirgenliğe sahip olduğunu göstermektedir. Monolitin geçirgenliği 10,4 mm/s olarak hesaplandı. Kolonun geçirgenliğinin oldukça yüksek olduğu görüldü. Hazırlanan poli(HPMA-Cl-EDMA) kapiler kolonu ile daha sonra farklı miktarlarda taurin içeren sulu çözeltilerle modifikasyon çalışmaları yapıldı.



Şekil 4.16. Poli(HPMA-Cl-EDMA) bazlı reaktif monolitin taurin ile modifikasyon tepkimesi.

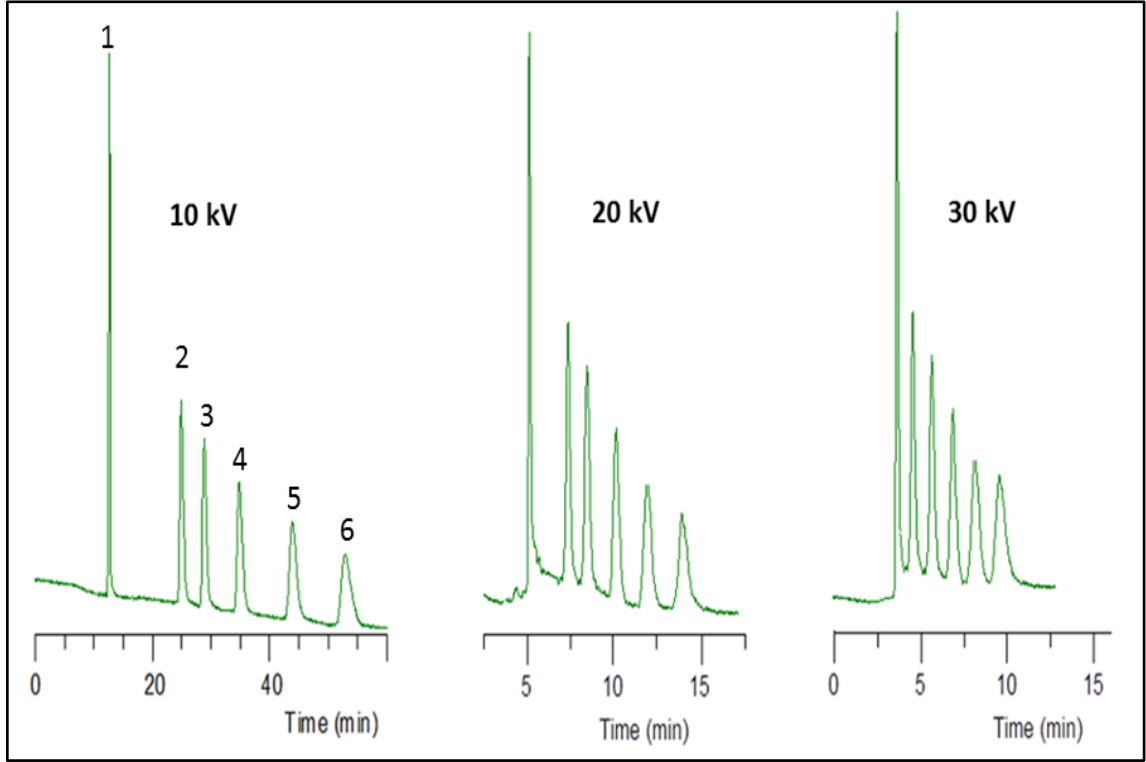
Yapılan elementel analiz çalışmaları sonrasında, kurutulmuş monolitik yapıda %0.67 (w/w) oranında kükürt içeriği saptanmıştır. 0.05g/mL derişimli çözelti ile 0.21 mmol/g taurin miktarının monolitik yapıya bağlandığı görüldü. Daha yüksek derişimli taurin kullanılması ise modifiye olan taurin miktarının değiştirmemiştir. Bu sonuç, kullanılan taurin miktarı kolonda maksimum bağlanma sağlamış ve doygunluğa ulaştığını ortaya koymuştur. Kolonda yapılan modifikasyon çalışması sonrasında geçirgenlik değeri 9.4 mm/s olarak hesaplanmış ve çok fazla değişmediği görülmüştür.



şekil 4.17. Taurin modifiye Poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonun 2000x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri

Taurin modifiye edilmiş kolonun 2000x ve 9500x ölçekli SEM görüntüleri şekil 2.27 de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi modifiye kolonun yaklaşık 1-2.5 µm boyutlu küresel partiküllerden oluşmuştur.

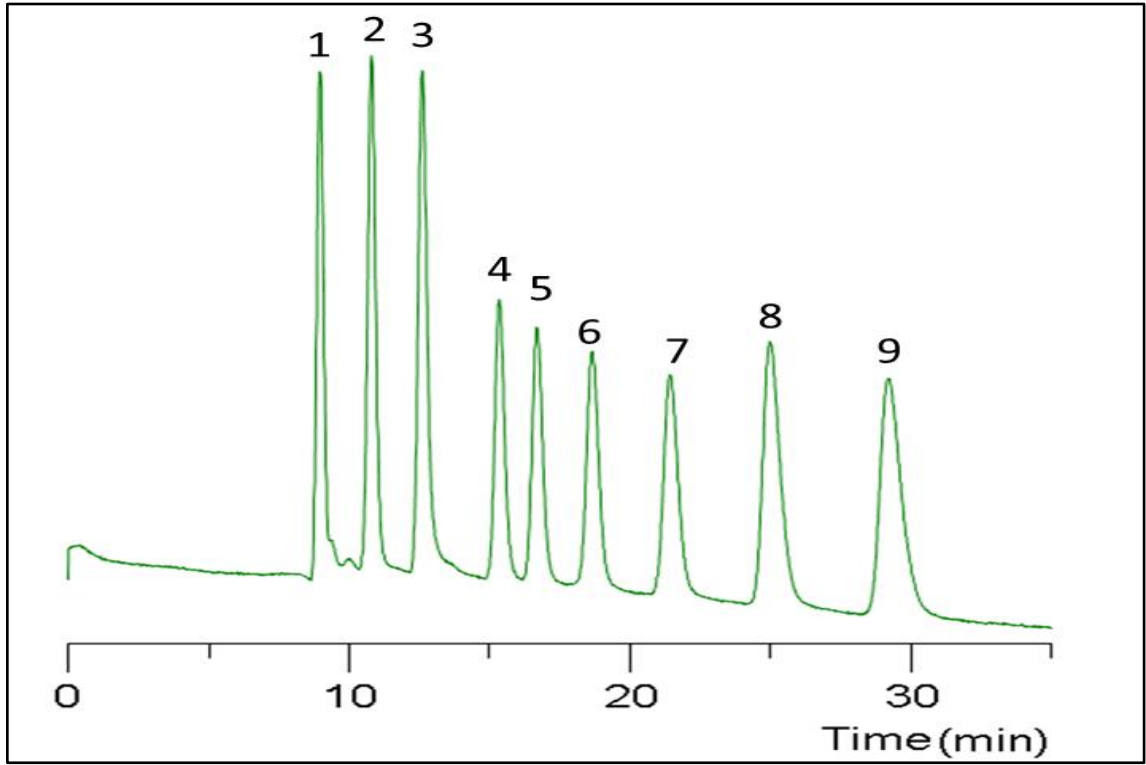
Taurin modifiye edilmiş kolonun elektrokromatografik karakterizasyonu için alkil benzenler kullanıldı. Hareketli faz olarak %60:40 ACN/fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM) kullanıldı. Analiz sırasında kolona +10 ve +30 kV arasında elektriksel alan (kV) uygulandığında, şekil 4.18'den görüldüğü gibi kolonun seçiciliği ve performansının yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, kolon bu koşullar altında CEC sisteminde katodik EOF göstermiştir.



Şekil 4.18. Taurin modifiye poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonun farklı voltaj içeren katodik EOF uygulamalı elektrokromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); enjeksiyon, 5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyoüre, (2) benzen, (3) toluen, (4) etilbenzen, (5) propilbenzen, (6) butilbenzen.

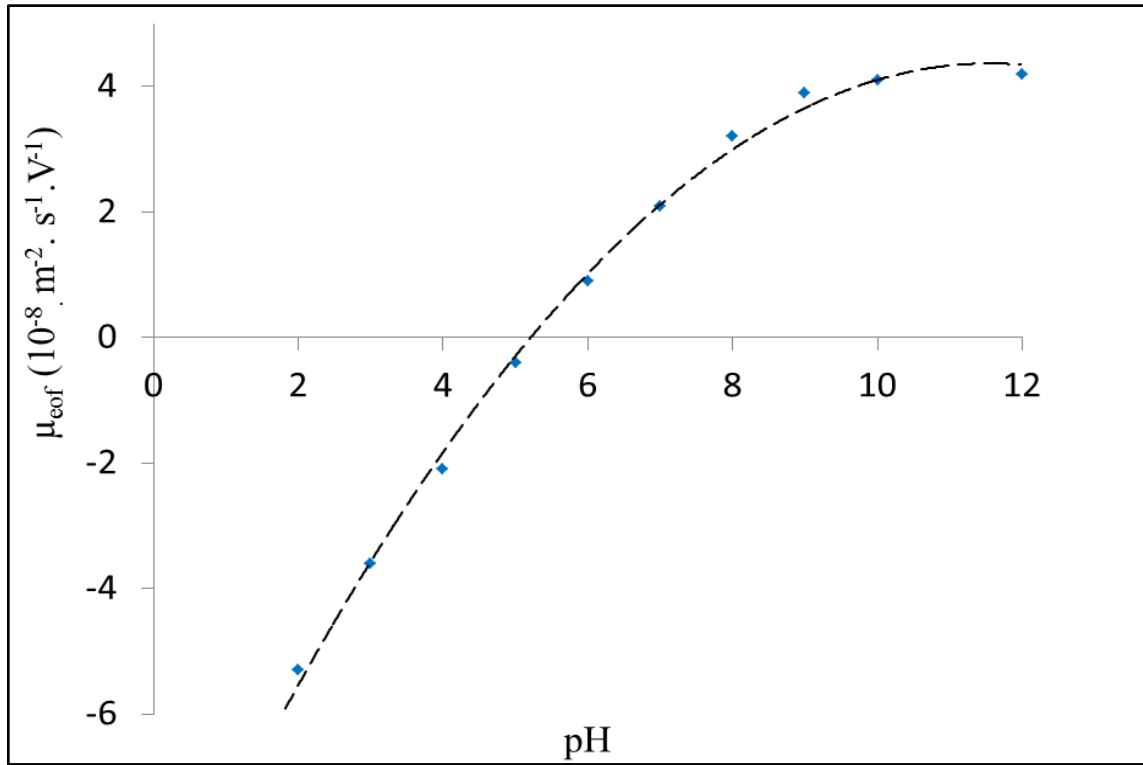
Aynı şekilden görüldüğü gibi, alkil benzenlerin elüsyon sırası yapılarındaki kısmi hidrofobisiteye göre gerçekleşti. +10 kV uygulandığında yaklaşık 60 dakika analiz süresi gözlenirken, +30 kV uygulandığında, seçicilik ve rezolüsyon kaybolmadan bu değer 12 dakikaya kadar düştüğü görüldü.

Zwitteriyonik karakterli kolonlar katodik EOF yanında anodik EOF da göstermesi gerekir [29]. Buna bağlı olarak, çalışmada hazırlanan taurinli kolon zwitteriyonik yapıda olduğundan, CEC sisteminde hem katodik hemde anodik EOF göstermesi beklenmektedir. Anodik EOF uygulaması için hareketli faz olarak %50:50 ACN/fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM) koşullarında sistemde negatif voltaj uygulayarak kolonun davranışı incelendi. Burada düşük pH kullanılmasının amacı, taurin yapısındaki amin gruplarının protonasyonunu sağlamaktır. Şekil 4.19'dan görüldüğü gibi, -20 kV ile anodik EOF uygulamasında kullanılan alkil benzen türevlerinin etkin ayrımı sağlanmıştır.



Şekil 4.19. Taurin modifiye edilmiş poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonun anodik EOF uygulamalı elektrokromatografik karakterizasyonu. Kromatografik koşullar; %60:40 ACN/Fosfat tamponu (pH 7.0, 10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); uygulanan voltaj, -20 kV; enjeksiyon, -5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; pik sırası, (1) tiyoüre, (2) fenol, (3) benzaldehit, (4) benzen, (5) toluen, (6) etilbenzen, (7) propilbenzen, (8) butilbenzen, (9) pentil benzen.

Monolitik yapıda zayıf anodik EOF oluşumu bileşiklerin alıkonma sürelerinin kısmi olarak uzamasına neden olmuştur. Monolitik yapının hem katodik ve hem de anodik EOF oluşturması zwitteriyon karakterli olduğunu göstermektedir. Kolonun farklı pH değerlerine karşı EOF karakterizasyonu Şekil 4.12’de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi, hareketli faz asidik koşullarda, aminlerin protonasyonu ile anodik EOF ve bazik koşullarda ise monolitik yapıdaki sülfonik asitlerin iyonizasyonu ile de katodik EOF göstermiştir. Hareketli faz pH 5 değerine yaklaştığında ters EOF (reverse EOF) oluşmuştur. Bu sonuçlardan, hareketli fazda değişen pH ya bağlı olarak anodik ve katodik EOF oluşumu sağlanması kolonun hidrofilik ve zwitteriyonik karakterli olduğunu göstermiştir.

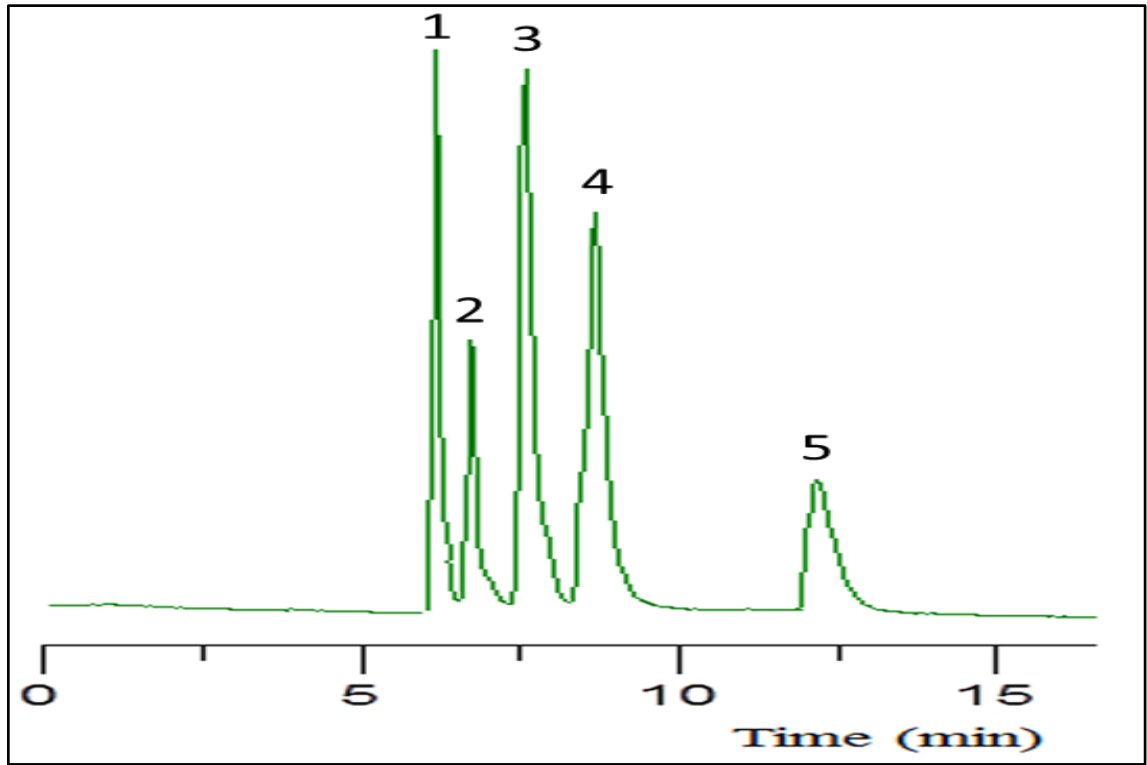


Şekil 4.20. Taurin modifiye poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu için farklı pH'larda EOF değerleri. %50:50 ACN/Fosfat tamponu (10 mM); etkin kolon uzunluğu 27 cm, toplam kolon uzunluğu, 36 cm (iç çap 100); uygulanan voltaj, -20 kV; enjeksiyon, -5 kV 3 s; dalgaboyu, 200 nm; kolon sıcaklığı 25°C; alıkonma faktörü, tiyoüre.

4.8 Taurin modifiye poli(HPMA-Cl-EDMA) kolonu ile kromatografi çalışmaları

4.8.1. Fenolik bileşiklerin ayrımı

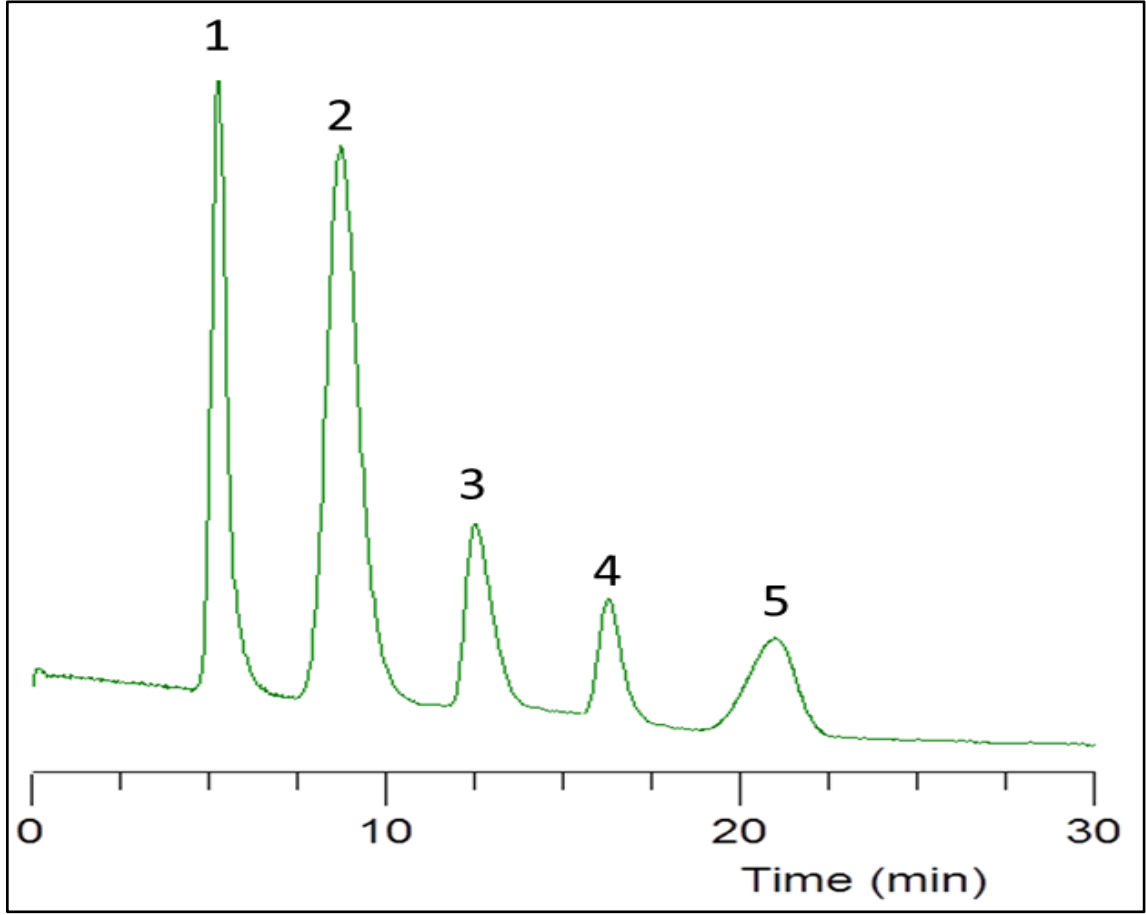
Hazırlanan taurin modifiye kolon fenolik bileşiklerin kromatografik ayrımında kullanıldı. % 50:50 ACN/fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM) karışımı hareketli faz olarak kullanıldı. CEC sisteminde katodik EOF'lu yapılan analizde fenollerin ayrımı gözlemlendi. Hareketli fazda ACN içeriği değiştirilerek yapılan ayırma çalışmalarında, Şekil 4.21'den görüldüğü gibi, %35 ACN içeriğinin daha iyi ayırma sağladığı görüldü. Bu sonuç, ayırma alkil benzenlere benzer olarak fenollerin hidrofobisitelerinin etkili olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu sonuç, kolonun ters faz modunda da çalışabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.21. Taurin modifiye poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu ile fenolik bileşiklerin ayrılması. Kromatografik koşullar; %35:65 ACN/Fosfat tamponu (pH 8.0, 10 mM); dalga boyu, 200 nm; uygulanan voltaj, 20 kV; pik sırası (1) tiyoure, (2) fenol, (3) katekol, (4) hidrokinon, (5) α -naftol.

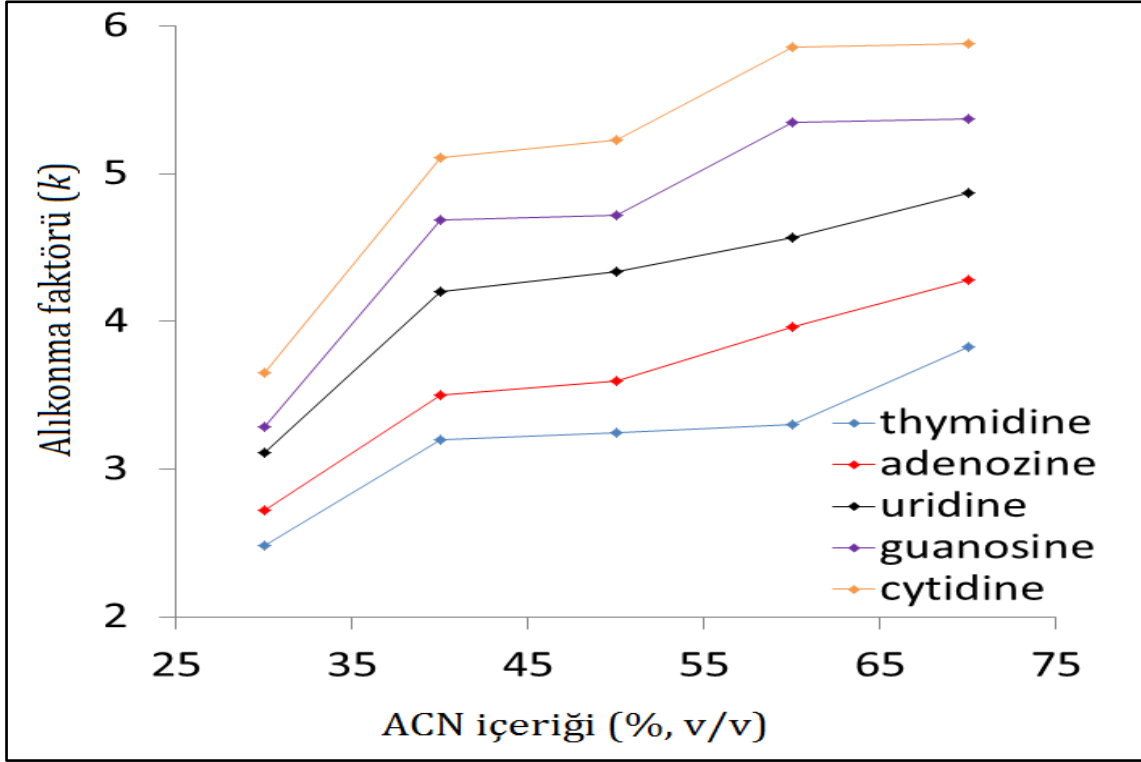
4.8.2. Nükleozidlerin ayrımı

Sıvı kromatografi uygulamalarında nükleosidler yaygın olarak analiz edilmişlerdir [122]. Genellikle bazik karakterli olan nükleosidler anyon değiştirici kolonlarda oldukça iyi ayrılırlar. Çalışmamızda, hazırladığımız kolonun anyon değiştirici özelliği de olduğundan, CEC sisteminde uygun koşullarda polar nükleosidlerin ayırma çalışmalarında kullanılabileceği öngörüldü. Hazırlanan zwitteriyonik kolon nükleosidlerin hidrofilik ayrımında kullanıldı. Hidrofilik etkileşim koşulları dikkate alınarak, hareketli faz %60:40 ACN/fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM) şeklinde ayarlandı. CEC sisteminde anodik EOF koşullarında yapılan ayırmada, şekil 4.22'den görüldüğü gibi nükleosidlerin etkin ayırım gerçekleşti. Rezolüsyonu artırmak için pH 2.5-5.0 koşullarında yapılan çalışmalarda, artan pH nın rezolüsyonu artırmadığı görüldü. Bu sonuç kolonun zayıf anodik EOF oluşturması ve artan pH ile anodik EOF 'un dahada azalması ile açıklandı. Bileşiklerin yapı ile etkileşimlerini incelemek için hareketli fazda ACN içeriği artırılarak analizler yapıldığında, artan ACN içeriğine bağlı olarak bileşiklerin yapı ile etkileşimleri ile beraber alıkonma zamanlarını arttırdığı şekil 4.23'de görülmektedir.



Şekil 4.22. Taurin modifiye poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu ile fenolik bileşiklerin ayrılması. Kromatografik koşullar; %35:65 ACN/Fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM); dalga boyu, 260 nm; uygulanan voltaj, -20 kV; hidrodinamik enjeksiyon, 600 mBar, 0.1 dak, pik sırası; (1) timidin, (2) adenzin, (3) uridin, (4) guanozin, (5) sitidin.

Bu tür etkileşimlerin artmasının temel nedeni yapı ile nükleosidlerin arasında meydana gelen hidrofilik etkileşimlerdir. Ayırma mekanizmasında iyonik etkileşimlerin yanında hareketli faz içeriğinde % 60 ACN olması bize kolonun hidrofilik etkileşim karakterine sahip olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde hareketli fazda organik içerik miktarının artırılması ile nükleosidlerin alıkonma zamanlarının artması kolondaki hidrofilik etkileşimlerden kaynaklanması yukarıda ifade edilen sonucu doğrulamıştır. Bu çalışmalar ile reaktif poli(HPMA-Cl-EDMA) monolitik kolonu literatürde ilk olarak hazırlanmış ve modifiye edilerek biyokromatografi uygulanabilirliği gösterilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan taurin modifiye monolitik yapının hidrofilik uygulamalarda kullanılabileceği görülmüştür.



Şekil 4.23. ACN içeriği etkisi. Kromatografik koşullar; ACN/Fosfat tamponu (pH 2.5, 5.0 mM); dalga boyu, 260 nm; uygulanan voltaj, -10 kV, hidrodinamik enjeksiyon, 600 mBar, 0.1 dak.

4.8.3. Kolon verimliliği ve kararlılık çalışmaları

Aynı şartlarda ve benzer modifikasyon koşullarında 6 farklı kolon hazırlanmış elektrokromatografik karakterizasyon yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan kolon verimliliği ve yeniden hazırlanabilirliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmadan çalışmaya (run to run analysis) yapılan analizlerde %0.8 ve günden güne yapılan analizlerde (day to day analysis) % 2 den daha düşük RSD değerleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar taurin modifiye kolonun yüksek derecede verimli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Tennikova, T.B., Belenkii, B.G., Svec, F., High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. *Journal Liquid Chromatography* 13, 63, **1990**..
- [2] Svec, F., Frechet, J.M.J., New design of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis. *Science* 273, 205, **1996**.
- [3] Strancar, A., Koselj, P., Schwin, H., Josic, D., Application of Compact Porous Disks for Fast Separations of Biopolymers and In-Process Control in Biotechnology. *Analytical Chemistry* 68, 3483-3488, **1996**.
- [4] Ericsson, C., Hjerten, S., Reversed-Phase Electrochromatography of Proteins on Modified Continuous Beds Using Normal-Flow and Counterflow Gradients. Theoretical and Practical Considerations. *Analytical Chemistry* 71, 1671, **1999**.
- [5] Zou, H., Huang, X., Ye, M., Luo, Q., Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 954, 5-32, **2002**.
- [6] Hilder, E.F. , Svec, F., Frechet, J.M.J., Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 1044, 3-22, **2004**.
- [7] Smith, N. W., Jiang, Z., Developments in the use and fabrication of organic monolithic phases for use with high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 1184; 416-440 **2008**.
- [8] El Rassi, Z. Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. *Electrophoresis* 31, 174- 1191. **2010**.
- [9] Wu, R., Hu, L., Wang, F., Ye, M., Zou, H. Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation. *Journal of Chromatography A* 1184, 369-372, **2008**.
- [10] Qu, J., Zhang, Z., Lin, H., Dong, J., Wu, M., Zou, H., Preparation and application of hydrophobic hybrid monolithic columns containing polyhedral oligomeric silsesquioxanes for capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 33, 1660- 1668, **2012**.
- [11] Zhu, G., Zhang, L., Yuan, H., Liang, Z., Zhang, W., Zhang, Y., Recent development of monolithic materials as matrices in microcolumn separation systems. *Journal of Separation Science*. 32, 792-803, **2007**.
- [12] Vlakh, E.G. Tennikova, T.B. Preparation of methacrylate monoliths. *Journal of Separation Science*. 30, 2801-2813, **2007**.

- [13] Aydoğan, C. Yılmaz, F. Denizli A. Cation exchange/hydrophobic interaction monolithic chromatography of small molecules and proteins by nano liquid chromatography, *Journal of Separation Science* **36**, 1685-1692, **2013**.
- [14] Chen, X., Dennis Tolley, H., Lee, M. L., Monolithic capillary columns synthesized from a single phosphate-containing dimethacrylate monomer for cation-exchange chromatography of peptides and proteins, *Journal of Chromatography A*, **1218**, 4322, **2011**.
- [15] Kunkel, H.G. Tselius, A. Electrophoresis of proteins on filter paper *The Journal of general physiology*. **35**, 89-118, **1951**.
- [16] Jorgenson, J.W., Lucas, K.D., Zone electrophoresis in Open Tubular Glass Capillaries. *Analytical Chemistry* **53**, 1298-1302, **1981**.
- [17] Grant, I.H., Capillary electrochromatography, *Methods in Molecular Biology* **52**, 197-209, **1996**
- [18] Engelke, J.L., Strain, H.H., Electrical Mobility of Phosphate Ions in Paper Electrochromatography. *Analytical Chemistry*, 1872-1874, **1939**.
- [19] Mould, D.L. Synge, R.L. Separations of polysaccharides related to starch by electrokinetic ultrafiltration in collodion membranes. *Biochemistry Journal*, **58**(4) 571-585, **1954**.
- [20] Pretorius, V., Hopkins, B.J., Schieke, J.D., Electroosmosis. A new concept for high-speed liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **99**, 23-30, **1974**.
- [21] Knox, J.H., Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems. *Journal of Chromatography A* **680**, 3-13, **1994**.
- [22] Euerby, M.E. 2.9. Capillary electrochromatography (CEC). 2.9.1 Separation, detection and determination of impurities by CEC. *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **4**, 346-358, **2000**.
- [23] Jiskra, J. Claessens, H.A., Cramers, C.A., Stationary and mobile phases in capillary electrochromatography (CEC) *Journal of Separation Science* **26**, 1305-1330, **2003**.
- [24] Xie, R., Oleschuk, R., Photoinduced polymerization for entrapping of octadecylsilane microsphere columns for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry*, **79**, 1529-1535, **2007**.
- [25] Smith, N., Capillary Electrochromatography, Beckman Coluter, İngiltere (Sf:3)
- [26] Aydoğan, C., Çelebi, B., Denizli A., Tuncel A., A new zwitterionic CEC stationary phase based on reactive poly(3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith (submitted).

- [27] Chen, X, Tolley, H.D., Lee M.L. Preparation of zwitterionic polymeric monolithic columns for hydrophilic interaction capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **34**, 2088-2096, **2011**.
- [28] Liu Z, Peng Y, Wang T, Yuan G, Zhang Q, Guo J, Jiang Z. Preparation and application of novel zwitterionic monolithic column for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **36**, 262-269, **2013**.
- [29] Fu, H., Xie, C., Dong, J., Huang, X., Zou, H., Monolithic column with zwitterionic stationary phase for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry*, **76**, 4876-4874, **2004**.
- [30] Karenga, S.M. *Neutral monolithic capillary columns with alkyl and aryl ligands for reversed-phase capillary electrochromatography*, Doctor of Philosophy, Oklahoma State University, Oklahoma, USA, **2010**.
- [31] Karlsson, K. E., Novotny, M., Separation Efficiency of Slurry-Packed LC Microcolumns with Very Small Inner Diameters. *Analytical Chemistry* **60**, 1662 – 1665. **1988**.
- [32] Borges, J.H., Aturki, Z., Rocco, A., Fanali, S., Recent applications in nano liquid chromatography, *Journal of Separation Science* **30**, 1589-1610, **2007**.
- [33] Villalba, R., Pancorbo, A.C., Ferraros, C.O., Menéndez, J.A., Carretero, A.S., Gutiérrez, A.F., Uptake and metabolism of olive oil polyphenols in human breast cancer cells using nano-liquid chromatography coupled to electrospray ionization–time of flight-mass spectrometry *Journal of Chromatography B* **898**, 69-77, **2012**.
- [34] Thomas, D., Eberle, M., Schiffmann, S., Zhang, D.D., Geisslinger, G., Ferreirós, N., Nano-LC–MS/MS for the quantitation of ceramides in mice cerebrospinal fluid using minimal sample volume. *Talanta* **116**, 912-918, **2013**.
- [35] Rocco, A., Marusca, A., Fanali, S., Enantioseparations by nano liquid chromatography, *Journal of Separation Science* **36**, 421-444, **2013**.
- [36] Gritti, F., Guiochon, G., Heterogeneity of the adsorption mechanism of low molecular weight compounds in reversed-phase liquid chromatography *Analytical Chemistry* **78**, 5823 – 5834, **2006**.
- [37] Guiochon, G., Foreword, *Journal of Chromatography A* **1142** (1 SPEC. ISS.), pp. 1, **2007**.
- [38] Dionex Co. (Sunnyvale, CA, USA) under the trade name ProSwift.
- [39] Colin, H., Schmitter, J.M., Guiochon, G., Liquid chromatography of azarenes. *Analytical Chemistry* **53**, 625 – 631, **1981**.

- [40] Guiochon, G., Comparison of the theoretical limits of separating speed in liquid and gas chromatography *Analytical Chemistry* 52, 2002-2008, **1980.**
- [41] Guiochon, G., Conventional packed columns vs. packed or open tubular microcolumns in liquid chromatography *Analytical Chemistry* 51, 1318-1325, **1981.**
- [42] Kimata, K., Hosoya, K., Araki, T., Tanaka, N. [2-(1-pyrenyl)ethyl]silyl silica packing material for liquid chromatographic separation of fullerenes. *Journal of Organic Chemistry* 58, 282-283, **1993.**
- [43] Nakanishi, K., Minakuchi, H., Soga, N., Tanaka, N. Structure Design of Double-Pore Silica and Its Application to HPLC. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 13, 163-169, **1999.**
- [44] Go, H., Sudo, Y., Hosoya, K., Ikegami, T., Tanaka, N. Effects of Mobile-Phase Composition and Temperature on the Selectivity of Poly(N-isopropylacrylamide)-Bonded Silica Gel in Reversed-Phase Liquid Chromatography *Analytical Chemistry* 70, 4086-4093, **1998.**
- [45] Svec, F., Frechet, J.M.J., Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis *Chemistry of Materials* 184, 707-715, **1995.**
- [46] Svec, F., Frechet, J.M.J., Continuous rods of macroporous polymer as high performance liquid separation media, *Analytical Chemistry* 64, 820, **1992.**
- [47] Unger, Lamotte, S., K.K., Machtejevas, E., *Column Technology in Liquid Chromatography* Chapter 3, Merk KGaA Darmstadt, Germany. **2012.**
- [48] Unger K.K, Skudas R, Schulte M. Particle packed columns and monolithic columns in HPLC a comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A* 1184, 393. **2008.**
- [49] Neue U.D., *HPLC columns: theory, technology and practice*. New York:Wiley-VCH; **1997.**
- [50] Namera, A., Nakamoto, A., Saito, T., Miyazaki, S., Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications. *Journal of Separation Science* **34**, 1-24, **2011.**
- [51] Chadds F., *Comparison guide to C18 reversed phase columns*. PA: MAC-MOD Analytics; June **2008.**
- [52] Neue U.D., Stationary phase characterization and method development. *Journal of Separation Science* 30,164. **2007.**

- [53] Engelhardt, H., Jungheim, M.. Comparison and characterization of reversed phases. *Chromatographia* 29,59.1990.
- [54] Sander LC, Wise SA. Synthesis and characterization of polymeric C18 stationary phases for liquid chromatography. *Analytical Chemistry*,56, 504, 1984.
- [55] Altria K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary Electrochromatography *Journal of Chromatography A*, 856, 443–463, 1999.
- [56] Christodoulou, C.P-K., Zhu, X., Warner, I.M., Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 24, 3917–3934, 2003.
- [57] Chen, J.L. Comparison of succinate- and phthalate-functionalized etched silica hydride phases for open-tubular capillary electrochromatography *Journal of Chromatography A*, 1216, 6236-6244, 2009.
- [58] Cheong, W.J., Ali, F., Kim, Y.S., Lee, J.W. Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science *Journal of Chromatography A*, (inpress) 2013.
- [59] Xu, L., Sun,Y. Protein separation by open tubular CEC employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows. *Journal of Chromatography A*, 1183, 129-134, 2008.
- [60] Guihen, E., Glennon,J.D., Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillaryelectrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1044, 67, 2004.
- [61] Aydoğan, C., Çetin, K., Denizli, A., Novel tentacle-type polymer stationary phase grafted with anion exchange polymer chains for open tubular CEC of nucleosides and proteins. *Analyst* (in revision) 2013.
- [62] Zhang, S., Huang, X., Zhang, J., Horvath, C., Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith *Journal of Chromatography A*, 948, 465- 477 2000.
- [63] Forster, S., Kolmar, H., Altmaier, S., Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1265, 88– 94, 2012.
- [64] Luo, Q., Yue, G., Valaskovic, G.A., Gu, Y., Wu, S.L., Karger, B.L., On-line 1D and 2D porous layer open tubular/LC-ESI-MS using 10-microm-i.d. poly(styrene-divinylbenzene) columns for ultrasensitive proteomic analysis. *Analytical Chemistry*, , 79, 6174-6181, 2007.
- [65] Kubin, M., Spacek P. Chromecek, R., Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Coll. Czechosl. Chem. Commun.* 32, 3881-3887, 1967.

- [66] Lin, H., Ou, J., Tang, S., Zhang, Z., Dong, J., Liu, Z., Zou, H. 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**.
- [67] Urban, J., Jandera, P., Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 31,2521-2540. **2008**.
- [68] Dario, R., Tim, A., Causon, J., Hilder, E.F., Recent developments and future possibilities for polymer monoliths in separation science, *Analyst*, **137**, 22, 5179, **2012**.
- [69] Aydoğan, C., Denizli, A., Preparation and electrochromatographic characterization of methacrylate-based weak cation exchange columns for capillary electrochromatography, *Analyst*, **138**, 7, 2118-2125, **2013**.
- [70] Vlakh, E.G., Tennikova, T.B., Applications of polymethacrylate-based monolithsinhigh-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2637-2650, **2009**.
- [71] Huck, C.W., Stecher, G., Bakry, R., Bonn, G.K., Recent progress in high-performance capillary bioseparations. *Electrophoresis*,24, 3977-3987, 2003.
- [72] Zhao, L., Qin, H., Wu, R., Zou, H., Recent advances of mesoporous materials in sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1228, 193-204, **2012**.
- [73] Bedair, M., El Rassi, Z. Affinity chromatography with monolithic capillary columns: II. Polymethacrylate monoliths with immobilized lectins for the separation of glycoconjugates by nano-liquid affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1079, 236-245, **2005**.
- [74] Pan, Z., Zou, H., Mo, W., Huang, X., Wu, R. Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography *Analytica Chimica Acta* 466, 141-150, **2002**.
- [75] Krajnc, P., Leber, N., Stefanec, D., Kontrec, S., Podgornik, A., Preparation and characterization of poly(high internal phase emulsion)methacrylate monoliths and their application as separation media. *Journal of Chromatography A* 1065, 69-73, **2005**.
- [76] Preparation of glycerol dimethacrylate-based polymer monolith with unusual porous properties achieved via viscoelastic phase separation induced by monodisperse ultra high molecular weight poly(styrene) as a porogen Aoki, H., Kubo, T., Ikegami, T., Tanaka, N., Hosoya, K., Tokuda, D., Ishizuka, N., *Journal of Chromatography A* 1119, 66 – 79, **2006**.

- [77] Bakry, R., Bonn, G. K., Mair, D., Svec, F., Monolithic porous polymer layer for the separation of peptides and proteins using thin-layer chromatography coupled with MALDI-TOF-MS. *Analytical Chemistry* 79, 486 – 493, **2007**.
- [78] Peters, E. C., Svec, F., Frechet, J. M. J., Rigid Macroporous Polymer Monoliths. *Advanced Materials* 11, 1169 –1181. **1999**.
- [79] Gu, B., Armenta, J., Lee, M. L., Preparation and evaluation of poly(polyethylene glycol methyl ether acrylate-co-polyethylene glycol diacrylate) monolith for protein analysis. *Journal of Chromatography A*,1079, 382 –391, **2005**.
- [80] Ritter, H.L., Drake, L.C.,Pore-size distribution in porousmaterials.*Industrial Engineering Cemical Analysis* 17, 782-786,**1945**.
- [81] Vlakh, E.G. Tennikova, T.B., Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths: I. Preparation of heterogeneous biocatalysts, *Journal of Separation Science* **36**,110-127, **2013**.
- [82] Aydoğan, C., Tuncel, A., Denizli, A., Polymethacrylate-based monolithic capillary column with weak cation exchange functionalities for capillary electrochromatography, *Journal of Separation Science* 36, 1010-1016, **2012**.
- [83] Aydoğan C. Yılmaz, F., Çimen, D., Uzun, L. Denizli, A.,Enantioseparation of aromatic amino acidsusing CEC monolith with novel chiral selector, N-methacryloyl-L-histidine methyl ester *Electrophoresis* 34, 1918-1925, **2013**.
- [84] Zhong,H., El Rassi Z., Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including N-glycans, *Journal of Separation Science* 32, 1, **2009**.
- [85] Kishore, K.R., Tetala, T.A., Beek, V., Bioaffinity chromatography on monolithic supports, *Journal of Separation Science*, **33**, 3, **2010**.
- [86] Arrua,R.D., Causon,T.J., Hilder, E.F., Recent developments and future possibilities for polymer monoliths in separation science, *Analyst* **137**, 22, 5179, **2012**.
- [87] Jiang, Z., Smith, N.W., Ferguson, P.D., Taylor, M.R., Preparation and characterization of long alkyl chain methacrylate-based monolithic column for capillary chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 39-45, **2007**.
- [88] Lee, D., Svec, F., Frechet, J.M.J., Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins. *Journal of Chromatography A*,1051, 53-60, **2004**.

- [89] Hemström, P., Nordborg, A., Irgum, K., Svec, F., Frechet, J.M.J., Polymer-based monolithic microcolumns for hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Separation Science* 29, 25-32, **2006**.
- [90] Jiang, Z., Smith, N.W., Liu, Z., Preparation and application of hydrophilic monolithic columns *Journal of Chromatography A*,1218, 2350-2361, **2011**.
- [91] Holdsvendova, P., Suchankova, J., Buncek, M., Backovska, V., Coufal, P., Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 23-29, **2007**.
- [92] Tsujioka, N., Hira, N., Aoki, S., Tanaka, N., Hosoya, K., A New Preparation Method for Well-Controlled 3D Skeletal Epoxy Resin-Based Polymer Monoliths *Macromolecules* 38, 9901-9903, **2005**.
- [93] Liu, Z., Peng, Y., Yuan, G., Zhang, Q., Guo, J., Jiang, Z.J., Preparation and application of a novel zwitterionic monolithic column for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* 29, 262-269, **2013**
- [94] Gusev, I., Huang, X., Horvath, C., Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*,855, 273-290, **1999**.
- [95] Wieder, W., Bisjak, C.P., Buci, Ch.W., Bakry, R., Bonn, G.K., Monolithic poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) capillary columns functionalized to strong anion exchangers for nucleotide and oligonucleotide separation *Journal of Separation Science* 29, 2478-2484, **2006**.
- [96] Mallik, R., Hage, D.S., Affinity monolith chromatography *Journal of Separation Science* 29, 1686-1704, **2006**.
- [97] Arrua, R.D., Igarzabal, C.A., Macroporous monolithic supports for affinity chromatography. *Journal of Separation Science* 34, 1974-1987, **2011**.
- [98] Desire, C.T., Arrua, D., Talebi, M., Lacher, N.A., Filder, E.F., Poly(ethylene glycol)-based monolithic capillary columns for hydrophobic interaction chromatography of immunoglobulin G subclasses and variants. *Journal of Separation Science* 36, 2782-2792, **2013**.
- [99] Denizli, A., Pişkin, E., Dye ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*. 49,391-416, **2001**.

- [100] Lin, Z., Yang, F., He, X., Zhao, X., Zhang, Y., Preparation and evaluation of a macroporous molecularly imprinted hybrid silica monolithic column for recognition of proteins by high performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, 1216, 8612-8622, **2009**.
- [101] Zheng, C., Huang, Y-P., Liu, Z-S., Recent developments and applications of molecularly imprinted monolithic column for HPLC and CEC. *Journal of Separation Science*, 34, 1988-2002, **2011**.
- [102] Zheng, C., Huang, Y-P., Liu, Z-S., Synthesis and theoretical study of molecularly imprinted monoliths for HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 2147-2161.
- [103] Esteban, A.M., Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *Trends Analytical Chemistry*, 45, 169-181, **2013**.
- [104] Schweitz, L., Spegel, P., Nilsson, S., Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 22, 4053-4063, **2001**.
- [105] Wei, S., Mizaikoff, B., Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations. *Journal of Separation Science*, 30, 1794-1805, **2007**.
- [106] Qin, F., Xie, C., Yu, Z., Kong, L., Ye, M., Zou, H., Monolithic enantiomer-selective stationary phases for capillary electrochromatography *Journal of Separation Science*, 29, 1332-1343, **2006**.
- [107] Mangelings D., Heyden Y.V., Enantioselective capillary electrochromatography recent developments and new trends. *Electrophoresis* 32, 2583–2601, **2011**.
- [108] Messina, A., Flieger, M., Bachechi, M., Sinibaldi, M.. Enantioseparation of 2-aryloxypropionic acids on chiral porous monolithic columns by capillary electrochromatography. Evaluation of column performance and enantioselectivity *Journal of Chromatography A* 1120, 69-74, **2006**.
- [109] Zheng, Y., Wang, Xi, Ji, Y., Monoliths with proteins as chiral selectors for enantiomer separation. *Talanta* 91, 7-17, **2012**.
- [110] Pfaunmiller, E.F., Hartmann, Dupper, C.M., Soman, S., Hage, D.S., Optimization of human serum albumin monoliths for chiral separations and high-performance affinity chromatography *Journal of Chromatography A* 1269, 198-207, **2012**.
- [111] Chankvetadze, B., Monolithic chiral stationary phases for liquid-phase enantioseparation techniques *Journal of Separation Science*, 33, 305-314, **2010**.

- [112] Aydoğan, C., Denizli, A., Electrochromatographic Enantioseparation of Amino Acids Using Polybutylmethacrylate-Based Chiral Monolithic Column by Capillary Electrochromatography. *Chirality* 24, 606-609, **2012**.
- [113] Bristow, P. A., Knox, J. H., Standardization of test conditions for high performance liquid chromatography columns *Chromatographia* 10, 279–288, **1977**.
- [114] Ludewig, R., Nietzsche, S., Scriba, G. K. E., A weak cation-exchange monolith as stationary phase for the separation of peptide diastereomers by CEC. *Journal of Separation Science*, 34, 64-69, **2011**.
- [115] Eelting, S., Hilder, E. F., Geiser, L., Svec, F., Frechet, J. M. J., Rozing, G. P., Schoenmakers P. J., and Kok, W. T., Controlling the surface chemistry and chromatographic properties of methacrylate-ester-based monolithic capillary columns *via* photografting *Journal of Separation Science*, 30, 407-413, **2007**.
- [116] Cikaló, M. G., Bartle, K. D., Robson, M. M., Myers, P., Euerby, M. R., Capillary Electrochromatography. *Analyst* 123, 87R, 57–65, **1998**.
- [117] Li, H., Liu, Z., Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 37, 148-161. **2012**.
- [118] Bromba, C., Carrie, P., Chuti, J. K. W., Fyles, T. M., Phenyl boronic acid complexes of diols and hydroxyacids. *Supramolecular Chemistry* 21, 81–88, **2009**.
- [119] Liu, Y. C., Ren, L. B., Liu, Z., A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of *cis*-diol biomolecules. *Chemical Communications* 47, 5067–5070. **2011**.
- [120] Crichton, R.R., Charloteaux-Wauters, M., Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry* 164 (3), 485–506, **1987**.
- [121] Khasay, G., Song, H., Schepdael, A.V., Cabooter, D., Adams, E., Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*(in press) **2013**.
- [122] Fan, H., Yang, E.Q., Li, S.P., Determination of purine and pyrimidine bases in natural and cultured *Cordyceps* using optimum acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45, 141-144, **2007**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Cemil Aydoğan
Doğum Yeri : Őiran
Medeni Hali : Evli
E-posta : aydoganc@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacettepe Üniversitesi,Kimya Bölümü Beytepe/ANKARA

Eğitim

Lise : Őiran Lisesi
Lisans : Kafkas Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Eczacılık Temel Bilimleri ABD
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya
Bölümü, Biyokimya ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

Deneyim alanları

Kromatografik sistemler
(HPLC, Nano-LC, CEC) Kapiler elektroforez, CE-MS
Biyomolekül analizi,

Tezden Üretilmiş yayınlar

1)Aydoğan, C., Tuncel, A., Denizli A., Polymethacrylate-based monolithic capillary column with weak cation exchange functionalities for capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science* 2012, 35, 8, 1010–1016.

2)Aydoğan, C., Denizli A., Preparation and electrochromatographic characterization of methacrylate-based weak cation exchange columns for capillary electrochromatography. *Analyst* 2013, 138, 2118-2125.

3)Aydoğan C., Yılmaz F., Denizli A., Cation exchange/hydrophobic interaction monolith chromatography of small molecules and proteins by nano liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 2013, 36, 1685-1692.

4)Aydoğan, C., Çelebi, B., Denizli A., Tuncel A., A new zwitterionic CEC stationary phase based on reactive poly(3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith (sunuldu)