

**POLİ (AKRİLAT) BAZLI REAKTİF SABİT FAZLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE MİKRO-SIVI KROMATOĞRAFİSİ
SİSTEMİNDE KROMATOĞRAFİK PERFORMANSLARININ
TANIMLANMASI**

**DEVELOPMENT OF POLYACRYLATE BASED REACTIVE
STATIONARY PHASES AND DEFINITION OF
CHROMATOGRAPHIC PERFORMANCE IN MICRO-LIQUID
CHROMATOGRAPHY SYSTEM**

FATOŞ ÇİĞDEM KİP

PROF. DR. S. ALİ TUNCEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

FATOŞ ÇİĞDEM KİP'in hazırladığı “Poli (Akrilat) Bazlı Reaktif Sabit Fazların Geliştirilmesi ve Mikro-Sıvı Kromatografisi Sisteminde Kromatografik Performanslarının Tanımlanması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından ‘**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**’ nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ahmet R. ÖZDURAL

Başkan

.....

Prof.Dr. S. Ali TUNCEL

Danışman

.....

Prof.Dr. Tülay DURUSOY

Üye

.....

Prof.Dr. Deniz TANYOLAÇ

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Selçuk ÖZCAN

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Challenges are what make life interesting; overcoming them is
what makes life meaningful.*

~ Joshua J. Marine

*Her zaman her anımda olduğu gibi bu zorlu yolda da sonsuz sevgilerini,
anlayışlarını ve desteklerini benden esirgemeyen
Sevgili Eşim Tayfun Kip`e ve Canım Ailem'e..*

ETİK

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

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

beyan ederim.

02/02/2015

FATOŞ ÇİĞDEM KİP

ÖZET

POLİ (AKRİLAT) BAZLI REAKTİF SABİT FAZLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE MİKRO-SIVI KROMATOĞRAFİSİ SİSTEMİNDE KROMATOĞRAFİK PERFORMANSLARININ TANIMLANMASI

Fatoş Çiğdem Kip

Doktora, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Şubat 2015, 198 sayfa

Tez kapsamında, mikro-sıvı kromatografisinde hidrofilik etkileşim kromatografisi (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) modunda kullanılmak üzere eşboyutlu-gözenekli partikül formunda yeni sabit fazlar sentezlenmiştir. Sabit fazların sentezi için poli(3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) yeni bir çıkış materyali olarak seçilmiştir. Eşboyutlu-gözenekli formda poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir. Yöntemde, HPMA-Cl, akrilat bazlı çapraz bağlayıcı (etilen dimetakrilat (EDMA)) ile kopolimerleştirilerek, reaktif kloropropil grubu taşıyan, gözenekli partiküllerin eşboyutlu formda eldesi sağlanmıştır. Yöntemde, monomer faz bileşimi değiştirilerek farklı boy ve gözeneklilik özelliklerine sahip eşboyutlu-gözenekli partiküllerin eldesi sağlanmıştır. Partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope), gözeneklilik özellikleri ters büyüklükçe ayırma kromatografisi (inverse-size exclusion chromatography), özgül yüzey alanı ölçümleri ise BET yöntemi temelinde çalışan yüzey alanı ölçüm sistemi ile belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) için kullanılan polar ligandlar, boyut ve gözeneklilik özellikleri tanımlanan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. İlk olarak katyonik formda

TEA-OH, partiküllerin kloropropil grubu üzerinden tek basamaklı reaksiyon ile partikül yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır. Kolay bağlanma yöntemi ile poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin yüzeyinde oluşturulan polar formda triazol halkası diğer HILIC ligand türü olarak seçilmiştir. Son olarak poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) ile zwitteriyonik formda sülfobetain grubu içeren moleküler zincir oluşturulmuş ve HILIC deneylerinde ligand olarak kullanılmıştır.

Çalışmanın son kısmında, sentezlenen sabit fazların HILIC modunda kromatografik testlerinin yapılması için partiküller 2 mm iç çap değerine sahip paslanmaz çelik kolonlara basınç altında doldurulmuştur. Farklı kromatografik ligandlara sahip kolonlar; mikro-sıvı kromatografisi sisteminde uygun model analit karışımları ve hareketli faz kullanımı ile test edilmiştir. Kromatografik deneylerde, her bir mikrobor kolon için geri-basınç-akış hızı ilişkisi, hareketli faz akış hızı ve bileşiminin pik çözünürlüğü ve kolon verimine (teorik kademe sayısı, kademe yüksekliği) etkisi incelenmiştir. Partikül formundaki sabit fazlar, mikro-sıvı kromatografisi sisteminde HILIC modunda nükleotid, nükleosid, organik asit, akrilik bileşikler ve katekolaminlerin ayırımında başarıyla kullanılmış ve ayırımlarda 20-300 µm aralığında kademe yüksekliği değerleri elde edilmiştir.

Sonuçlar, mikro-sıvı kromatografisi için, yüksek ayırma verimine sahip, eşboyutlu-gözenekli formda partikül bazlı yeni mikrobor kolonların elde edildiğini göstermiştir. Böylece HILIC modunda, yüksek pik çözünürlüğü ile hızlı kromatografik analiz yapabilen, literatürde yaygın kullanılan sabit fazlara alternatif "partikül bazlı yeni bir mikrokolon ailesi" geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, hidrofilik etkileşim kromatografisi, mikro sıvı kromatografisi, sabit faz, 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat, reaktif kloropropil grubu, eşboyutlu-gözenekli partikül, mikrosüspansiyon polimerizasyonu, atom transfer radikal polimerizasyonu

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYACRYLATE BASED REACTIVE STATIONARY PHASES AND DETERMINATION OF THEIR CHROMATOGRAPHIC PERFORMANCE IN MICRO-LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM

Fatoş Çiğdem Kip

Doctor of Philosophy, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

February 2015, 198 pages

In the scope of thesis, monodisperse-porous particle based new stationary phases were synthesized for using in micro liquid chromatography in HILIC mode. Poly(3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), poly(HPMA-Cl-co-EDMA) was proposed as a new starting material for the synthesis of stationary phases. Monodisperse-porous poly(HPMA-Cl-co-EDMA) beads were synthesized by a new multistage-microsuspension polymerization technique. In the selected method, HPMA-Cl was copolymerized with a crosslinking agent (ethylene dimethacrylate (EDMA)) to form monodisperse porous polyacrylate based particles having reactive chloropropyl moiety. In the synthesis runs, poly(HPMA-Cl-co-EDMA) particles with different size and porous properties were obtained by changing monomer phase composition in the microsuspension polymerization. The size distribution and the surface morphology of particles were examined by scanning electron microscope (SEM). The porosity properties (i.e. average pore size, pore-size distribution, porosity, pore volume) were determined by inverse-size exclusion chromatography (ISEC) and the specific surface area was found by surface area and pore size analyzer using nitrogen adsorption-desorption method. In the second part, the chromatographic ligands used for HILIC mode were covalently attached onto the particles with suitable size and porosity properties. A

cationic ligand (TEA-OH) was covalently attached onto the particles via a simple and one-pot reaction via their chloropropyl functionality. Click chemistry and surface initiated-atom transfer radical polymerization (ATRP) were also applied for the generation of triazole ring and zwitterionic molecular brushes on the particles, respectively.

In the last part, the particles derivatized with different ligand were slurry packed under pressure to stainless steel columns 2 mm in diameter. The columns having different chromatographic ligands were tested in the micro-chromatography system by using appropriate analyte mixtures and mobile phases in HILIC mode. In the chromatographic experiments, the effects of mobile phase flow rate and composition on the column efficiency and the back-pressure flow rate relationship were investigated. Particle based stationary media were successfully used in a micro-chromatography system for HILIC separation of nucleotides, nucleosides, organic acids, acrylic compounds and catecholamines with the plate heights ranging between 20-300 μm .

The results indicated that new microbore columns containing monodisperse-porous microparticles with high separation efficiency and capable of performing chromatographic analysis with short analysis time and high peak resolutions were obtained. Hence “a new polymer based microcolumn family” for HILIC mode was developed.

Keywords: high performance liquid chromatography, hydrophilic interaction chromatography, micro-liquid chromatography, stationary phase, 3-chloro-2-hydroxypropyl methacrylate, reactive chloropropyl moiety, monodisperse-porous particles, microsuspension polymerization, atom transfer radical polymerization (ATRP)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, engin bilgi birikimi ve tecrübeleri ile tez çalışmalarımın başlamasına, şekillenmesine ve ilerlemesine büyük katkı sağlayan; sadece bilimsel alandaki deneyimlerini ve bilgisini paylaşmakla kalmayıp, her konudaki düşünce, yaklaşım ve tavsiyeleri ile beni yüreklendirip büyük hedeflere yönlendiren çok kıymetli danışman hocam Sn. Prof.Dr. S. Ali Tuncel'e teşekkürün az kalacağını düşünerek en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen ve akademik yaşantıma değerli katkılarından dolayı Dr. Bekir Çelebi'ye;

Dostluğumuzun ve kardeşliğimizin sadece laboratuvar duvarlarıyla sınırlı kalmadığı, birlikte her zorluğun üstesinden gelebildiğimizi ve mutluluklarımızı daha coşkulu yaşadığımızı gördüğüm, beni her zaman olduğu gibi bu dönemim boyunca da motive eden, destekleriyle ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan ve yaşamım boyunca da her zaman yanımda olmalarını istediğim canım kardeşlerim Arş.Gör.Dr. Aslıhan Gökaltun'a, Arş. Gör. Özlem Hamaloğlu'na, Arş.Gör. Dr. Özge Yüksel Orhan'a, Arş. Gör. Pınar Kodal'a, Selin Sağlam'a;

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, yardım ve desteklerini benden esirgemeyen, güler yüzleri ve anlayışlarıyla her zaman yanımda olan sevgili laboratuvar çalışma arkadaşlarım Ebru Sağ'a, Eda Öğüt'e, Gülçin Günal'a, Arş. Gör. Güneş Kibar'a, Arş. Gör. Hasan İlhan'a, Arş. Gör. Duygu Deniz Usta'ya, Kouros Salimi'ye, İlknur Durukan'a, Eda Beldek'e, Arş.Gör İlkay Koçer'e ve Erhan Şenlik'e;

Her zaman her anımda olduğu gibi bu zorlu yolda da sonsuz sevgilerini, anlayışlarını ve desteklerini benden esirgemeyen, hayallerime ve hedeflerime ulaşmam için birlikte her türlü zorluğun üstesinden gelebileceğimizi bana gösteren; hayatımdaki en büyük şanslarım canım eşim Tayfun Kip'e ve Canım Ailem'e,

Tez çalışmamı 112T461 nolu proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK ARAŞTIRMA DESTEK PROGRAMLARI BAŞKANLIĞI'na,

Ayrıca doktora eğitimim süresince bana sundukları yurt içi doktora bursu ile akademik yaşantım boyunca beni yüreklendiren ve maddi destek sağlayan TÜBİTAK BİLİM İNSANI DESTEKLEME DAİRE BAŞKANLIĞI'na,

SONSUZ ve EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2.1. Sıvı Kromatografisi.....	7
2.1.1. Tarihi ve Avantajları	7
2.1.2. HPLC Bileşenleri	9
2.1.3. Kromatografik Performans Parametreleri.....	13
2.1.4. Sıvı Kromatografisi Sistemleri.....	21
2.2. Mikro Sıvı Kromatografisi	23
2.3. Kolon Teknolojisi	24
2.3.1. Kolonların Sınıflandırılması	24
2.3.1.1. Açık Tübüler Kolon (OTC).....	25
2.3.1.2. Semi-Dolgulu Kapiler Kolonlar.....	26
2.3.1.3. Dolgulu Kapiler Kolonlar	26
2.3.1.4. Mikrobor Kolonlar	27
2.3.2. Mikrobor Kolon Tasarımı	28
2.4. Partikül Bazlı Sabit Fazlar	32
2.5. Polimerik Sabit Faz Sentesi.....	34
2.5.1. Dispersiyon Polimerizasyonu	34
2.5.2. Türevlendirilebilir Formda Eşboyutlu Partikül Sentezi.....	36
2.5.3. Eşboyutlu ve Gözenekli Partikül Sentezi İçin Kullanılan Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Yöntemleri.....	38

2.6. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi.....	40
2.6.1. Giriş	40
2.6.2. Tarihi.....	41
2.6.3. Mekanizması.....	41
2.6.4. HILIC için Kullanılan Hareketli Faz ve Sabit Fazlar.....	42
2.6.4.1. Hareketli faz	42
2.6.4.2 Sabit Faz	44
2.6.4.2.1. Silika ve Polimerik Bazlı Partikül Formunda Sabit Fazlar	44
2.6.4.2.2. Silika ve Polimerik Bazlı Monolit Formunda Sabit Fazlar.....	47
2.6.5. Literatürde Kullanılan HILIC Kolonlarının Performansları ve Uygulama Alanları	48
2.7. Canlı/Kontrollü Radikal Polimerizasyon Teknikleri (Living/Controlled Radical Polymerization Techniques)	53
2.7.1. Mekanizma	53
2.7.2. Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi Mekanizması (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT).....	54
2.7.3. Atom Radikal Transfer Polimerizasyonu (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP).....	55
2.8. Kolay Bağlanma (Click Chemistry) Yöntemi.....	58
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	61
3.1. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Sentezi.....	62
3.1.1. Materyal	62
3.1.2. Çıkış Lateksi Sentezi	63
3.1.3. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu.....	64
3.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi ve Karakterizasyonu ..	66
3.2.1. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi	66
3.2.1.1. TEA-OH Bağlanması	68
3.2.1.2. Kolay Bağlanma (Click Chemistry) Yöntemi ile Ligand Bağlanması	68
3.2.1.2. Zwitteriyonik Ligand Bağlanması	70
3.2.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Karakterizasyonu.....	75
3.2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopu.....	75
3.2.2.2. Ters Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC).....	77

3.2.2.3. BET Yüzey Alanı Ölçüm Cihazı ile Karakterizasyon.....	79
3.2.2.4. Elementel Analiz ile Ligand İçeriklerinin Tayin Edilmesi	80
3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC modunda Mikro-Sıvı Kromatografisi Performans Testleri	80
3.3.1. Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HPLC Kolonuna Dolgulanması	80
3.3.2. Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküller ile HILIC Deneyleri.....	82
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	87
4.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi için Sabit Faz Geliştirilmesi	87
4.1.1. Eşboyutlu-Gözenekli Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	87
4.1.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi ve Karakterizasyonu.....	91
4.1.2.1. TEA-OH Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Karakterizasyonu	91
4.1.2.2. Triazol Halka Formunda Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Kullanımı.....	93
4.1.2.3. Zwitteriyonik Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Karakterizasyonu	95
4.2. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Performans Testleri.....	100
4.2.1. TEA-OH Bağlı-Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC Modunda Sabit Faz Olarak Kullanılması ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar	100
4.2.2. Triazol Halkası Formunda Ligand Bağlı Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC Modunda Sabit Faz Olarak Kullanılması ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar	115
4.2.3. Zwitteriyonik Ligand Bağlı Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC Modunda Sabit Faz Olarak Kullanılması ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar ..	138
4.3. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları.....	167
5. SONUÇLAR	170
KAYNAKLAR.....	173
ÖZGEÇMİŞ	193

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Sıvı kromatografisi türlerinin kolon boyutu, hareketli faz akış hızı ve kolon ayırma verimi yönünden karşılaştırılması.....	22
Çizelge 2.2. Mikro-LC kolonlarının genel özellikleri	24
Çizelge 2.3. Farklı iç çap uzunluğuna sahip kolonlar için hareketli faz kullanımı .	29
Çizelge 2.4. Partikül yüzey alanının partikülün ortalama gözenek boyutu ile değişimi	32
Çizelge 2.5. Klasik HPLC sistemi için son yıllarda geliştirilen ve silika partikül içeren bazı HILIC kolonları ve taşıdıkları kromatografik ligandlar	45
Çizelge 2.6. Polar analitlerin HILIC modunda kromatografik ayırımında kullanılan kolonların analiz koşulları ve elde edilen sonuçlar	50
Çizelge 2.7. HILIC ticari kolonların nükleobaz, nükleosid ve nükleotid analiz uygulamaları	52
Çizelge 3.1. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu için deneysel koşulları	66
Çizelge 3.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül yüzeyinde kolay bağlanma yoluyla triazol halkasının oluşum prosedürü.....	70
Çizelge 3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller üzerinde ATRP başlatıcı sentezi için değişen ATRP koşulları.....	70
Çizelge 3.4. Zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirlerin partiküller üzerinde yüzey başlatıcılı ATRP yöntemi ile oluşumu.....	71
Çizelge 3.5. HILIC modunda yapılan kromatografik testlerde kullanılan analitlerin fiziksel özellikleri ve kimyasal yapıları	83
Çizelge 4.1. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin boy ve gözeneklilik özellikleri	89
Çizelge 4.2. Ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin gözeneklilik özellikleri ve ligand içerikleri	94
Çizelge 4.3. Zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin gözeneklilik özellikleri ve ligand içerikleri	97
Çizelge 4.4. TEA-OH-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller içeren kolonda	

farklı ACN/su ^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri	101
Çizelge 4.5. Test karışımı kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	103
Çizelge 4.6. Nükleotidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	107
Çizelge 4.7. Nükleosidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	109
Çizelge 4.8. TEA-OH-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda organik asit karışımı için farklı ACN/su ^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....	112
Çizelge 4.9. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımı için farklı ACN/su ^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....	117
Çizelge 4.10. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımı için farklı hareketli faz akış hızları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri	126
Çizelge 4.11. Katekolamin karışımı kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	132
Çizelge 4.12. PT-4 kodlu kolonda farklı ACN/su ^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....	135
Çizelge 4.13. Akrilik bileşikler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	137
Çizelge 4.14. Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak SI-ATRP ile elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonlarda nükleotid karışımı için farklı ACN/su ^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri.....	141
Çizelge 4.15. Nükleotidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri.	148
Çizelge 4.16. Nükleosidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	153
Çizelge 4.17. Polar organikler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ile alınan	

kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	159
Çizelge 4.18. Organik asitler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri	165
Çizelge 4.19. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon için test karışımı ile analizden analize ve günden güne bağlı standart sapma değerleri.....	167
Çizelge 4.20. PT-4 kodlu polar formda hidroksil gruplu HILIC kolon için nükleosid karışımı ile analizden analize ve günden güne bağlı standart sapma değerleri .	168
Çizelge 4.21. Zwitteriyonik ligand bağlı Cl-PTMS-b-ATRP kodlu HILIC kolon için nükleosid karışımı ile analizden analize ve günden güne bağlı standart sapma değerleri	169

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. Uluslararası hakemli dergilerde HILIC üzerine basılan makalelerin yıllara göre değişimi .	3
Şekil 2.1. Bir kromatografik kolon boyunca örnek karışımın hareketli faz içerisinde taşınması	8
Şekil 2.2. HPLC sistemini oluşturan birimler	9
Şekil 2.3. HPLC kolonlarında kullanılan sabit faz yapıları	11
Şekil 2.4. Pistonlu pompanın şematik gösterimi	12
Şekil 2.5. Altı-girişli valfte yükleme ve enjeksiyon anında örnek döngüsünün durumu	13
Şekil 2.6. X ve Z analitlerinin kolon içerisinde sabit faz ve hareketli faz içerisindeki hareketleri	14
Şekil 2.7. İki ardışık pik için teorik kademe sayısı değerinin hesaplanmasında kullanılan pik taban genişliklerinin ve alıkonma sürelerinin gösterimi	16
Şekil 2.8. Analitin kolon boyunca ilerlemesi sırasında pik genişlemesi nedenleri .	17
Şekil 2.9. İki ardışık pik için çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan pik taban genişliklerinin ve alıkonma sürelerinin gösterimi	19
Şekil 2.10. Kolona dolgulanmış (A) Monodispers (B) Polidispers partiküllerin görünümü	19
Şekil 2.11. HPLC ve μ HPLC sistemlerinde kullanılan kolonların karşılaştırılması A) Nano-akış μ HPLC kolonu 100 μ m i.d. x 5 cm B) Kapiler μ HPLC kolonu 75 μ m i.d. x 25 cm C) paslanmaz çelik μ HPLC kolonu 1 mm i.d. x 10 cm D) paslanmaz çelik HPLC kolonu 7.5 mm i.d. x 30 cm	22
Şekil 2.12. (A) Dolgulu (B) Açık tübüler kolonların kesit görüntüleri .	25
Şekil 2.13. Farklı iç çapa sahip kolonlar için alıkonma hacminin teorik kademe sayısı ile değişimi (L= 50 cm)	31
Şekil 2.14. Bağlantı noktalarında oluşan ekstra hacimlerin kromatografik analiz sonucu elde edilen piklere etkisi. Üst kromatogram: Yanlış yapılan bağlantı sonucu elde edilen pik, Alt kromatogram: Doğru yapılan bağlantı sonucu elde edilen pik	31
Şekil 2.15. A) Silika ve B) Polimerik bazlı partiküllerin SEM görüntüleri	34

Şekil 2.16. Polar sabit faz yüzeyinde, asetonitril ile zengin hareketli faz kullanımı sırasında su moleküllerinin oluşturduğu tabaka.....	42
Şekil 2.17. HILIC kolonunda kullanılan polar organik çözücülerin vitamin ayrımı üzerine etkisi. Analiz koşulları: kolon: Inertsil Diol (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), hareketli faz: 90/10 v/v organik çözücü/amonyum asetat (10 mM, pH 5.0). Analitler: (1) nikotinamid, (2) piridoksin (3) riboflavin (4) nikotinic asit (5) L-askorbik asit (6) tiyamine. Organik çözücüler: MeOH: metanol, IPA: izopropanol, ACN: asetonitril, THF: tetrahidrofuran	43
Şekil 2.18. Klasik radikal polimerizasyon genel mekanizması	56
Şekil 2.19. ATRP genel mekanizması	57
Şekil 2.20. Kolay Bağlanma Yöntemi Mekanizması	58
Şekil 2.21. Nükleotid ve nükleosidlerin kromatografik analizi A) 5 µm, 150 mm x 4.6 mm i.d., kolay bağlanma reaksiyonu ile silika üzerine lizin bağlanan kolon B) 5 µm, 150 mm x 4.6 mm i.d., Zwitteriyonik HILIC ticari kolon, C) 5 µm, 150 mm x 4.6 mm i.d., Atlantis HILIC-silika ticari kolon. Analiz koşulları:Akış hızı: 1 mL/dk, 30 °C, hareketli faz: ACN/su (85:15, v/v), UV: 254 nm, Pik sırası: 1) urasil, 2) adenozin, 3) üridin, 4) sitozin, 5) sitidin, 6) guanozin	60
Şekil 3.1. Poli (HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin sentezi amacıyla kullanılan monomer (A) HPMA-Cl ve çapraz bağlayıcı (B) EDMA	61
Şekil 3.2. Çok basamaklı mikrosüspanseyon polimerizasyonu yönteminin şematik gösterimi.....	65
Şekil 3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere TEA-OH bağlanması	68
Şekil 3.4. Kolay bağlanma reaksiyonu ile (A) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde azid grubunun oluşturulması (B) azid bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde triazol halkası içeren ligand formunun oluşturulması.....	69
Şekil 3.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere (A) TEA-OH bağlanması, (B) TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere ClPrTMS bağlanması.	72
Şekil 3.6. Cl içeren partiküllerin üzerinde ATRP prosesi ile zwitteriyonik poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.....	73
Şekil 3.7. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin BrIBuBr ile reaksiyonu (A) EDA bağlanması, (B) BrIBuBr bağlanması.....	74
Şekil 3.8. Br içeren partiküllerin üzerinde ATRP prosesi ile zwitteriyonik	

poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.....	74
Şekil 3.9. Cl içeren partiküllerin üzerinde direk ATRP prosesi ile zwitteriyonik poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.....	75
Şekil 3.10. Poli(HPMA-cl-co-EDMA) partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan Quanta 200 FEG SEM cihazı	76
Şekil 3.11. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ortalama gözenek boyutu, gözenek boy dağılımı ve gözeneklilik oranlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan HPLC sistemi	77
Şekil 3.12. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin yüzey alanlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan Quantochrome, Nova 2200e model Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (BET)	79
Şekil 3.13. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ligand içeriklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan CHNS/O Elementel Analiz (Thermo-Scientific, Flash 2000, A.B.D.) cihazı	80
Şekil 3.14. Mikro-sıvı kromatografisi sistemi (mikro-LC).....	82
Şekil 4.1. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin SEM fotoğrafları. HPMA-Cl/EDMA oranı (mL/mL): (A) 0.75/4.25, (B) 1.5/3.5, (C) 2.5/2.5, (D) 3.5/1.5, (E) 4.25/0.75. Büyütme oranı: Büyük resim: X20000, Küçük resim: X4000	88
Şekil 4.2. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ters büyüklükçe ayırma kromatografisi yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri	88
Şekil 4.3. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için kolon geri-basıncının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kolon: 50x7.8 mm i.ç., Hareketli faz: distile su	90
Şekil 4.4. TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı. Büyütme oranı: X19000	92
Şekil 4.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve TEA-OH ile türevlendirilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularanan mikrobör kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAc içeren 90/10 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300 x 2 mm iç çap.....	92

Şekil 4.6. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ve farklı koşullarda propargil alkol bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları. Partikül (A) Normal partikül, (B) PT-1 (60/50), (C) PT-2 (60/RT), (D) PT-3 (80/RT), (E) PT-4 (80/50)	94
Şekil 4.7. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve farklı koşullarda propargil alkol bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularanan mikrobor kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAc içeren 94/6 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300x2 mm iç çap.	95
Şekil 4.8. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları. Partikül türü (A) ClPrTMS-b-ATRP, (B) BrIBuBr-b-ATRP, (C) HPMA-Cl-b-ATRP partiküller.....	96
Şekil 4.9. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularanan mikrobor kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAc içeren 90/10 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300x2 mm iç çap.	98
Şekil 4.10. Ortalama molekül ağırlıkları Mw: 180-80.000 Da olan dekstran standartlar kullanılarak elde edilen kromatogramlar . Hareketli faz: su, Akış hızı: 0.1 mL/dk, Kolon: 50 x 7.8 mm i.d. Dedektör: RID	99
Şekil 4.11. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için dekstran standartlar ile elde edilmiş SEC kalibrasyon eğrisi.....	99
Şekil 4.12. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile test karışımının izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 260 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 96.5/3.5, (B) 95/5, (C) 92.5/7.5, (D) 90/10, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin.	100
Şekil 4.13. Test karışımı analit grubu ayrımında farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi.....	102
Şekil 4.14. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularanmış kolonda test karışımının izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi.	

Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin. 103

Şekil 4.15. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda test karışımının izokratik ayrımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir. 105

Şekil 4.16. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleotidlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. urasil, 2. adenin, 3. sitozin, 4. guanin. 106

Şekil 4.17. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleotidlerin izokratik ayrımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.16'da verilmektedir. 108

Şekil 4.18. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin. 109

Şekil 4.19. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayrımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.18'de verilmektedir. 110

Şekil 4.20. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile organik asitlerin izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 220 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 98.5/1.5 (B) 97.5/2.5, (C) 95/5, Pik

sırası: 1. Asetik asit, 2. p-toluik asit, 3. benzoik asit, 4. 4-klorobenzoik asit.....	111
Şekil 4.21. Organik asitlerin ayırımında ACN derişimi ile alıkonma faktörünün değişimi	112
Şekil 4.22. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda organik asitlerin izokratik ayırımına hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç ap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 220 nm, Pik sırası: 1. asetik asit, 2. p-toluik asit, 3. benzoik asit, 4. 4-klorobenzoik asit.	113
Şekil 4.23. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.22'de verilmektedir.	114
Şekil 4.24. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda farklı ACN/su oranları ile nükleosid karışımının izokratik ayırımı. Kolon: 300x2 mm iç ap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.4 mL/dk, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A), (D) 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4. adenzin, 5.guanozin. (B), (C) 1. toluen, 2. timidin, 3. adenzin, 4.guanozin.....	116
Şekil 4.25. (A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarında nükleosid karışımı ayırımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi	119
Şekil 4.26. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının ACN derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.24'te verilmektedir.....	121
Şekil 4.27. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.24'te verilmektedir.....	122
Şekil 4.28. (A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarında nükleosid bileşenlerin izokratik ayırımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç ap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A) 92.0/8.0 (B), (C), (D) 94.0/6.0 mL/mL, (UV) dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A), (D) 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4.	

adenozin, 5.guanozin. (B), (C) 1. toluen, 2. timidin, 3. adenozin, 4.guanozin.....	125
Şekil 4.29. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayrımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.28'de verilmektedir.....	129
Şekil 4.30. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayrımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.28'de verilmektedir.....	130
Şekil 4.31. PT-4 kodlu triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda katekolaminlerin farklı hareketli faz akış hızları ile izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli fazda ACN/pH4 20 mM amonyum asetat tamponu hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.2, (B) 0.3, (C) 0.4, UV dedektör, 270 nm, Pik sırası: 1. tiramin, 2. dopamin, 3. Norepinefrin.	131
Şekil 4.32. Triazol halkası bağlı -poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda katekolaminlerin izokratik ayrımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.31'de verilmektedir.....	133
Şekil 4.33. Triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile akrilik bileşenlerin izokratik ayrımı Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.4 mL/dk, UV dedektör, 260 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 90.0/10.0, (B) 92.0/8.0, (C) 95.0/5.0, (D) 97.0/3.0, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.....	134
Şekil 4.34. PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşen karışımı ayrımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi	135
Şekil 4.35. Triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşenlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95.0/5.0 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.1, (B) 0.2, (C) 0.3, (D) 0.4, (E) 0.5,	

UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.	136
Şekil 4.36. Triazol halkası bağlı -poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşenlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.35'te verilmektedir.	138
Şekil 4.37. Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak SI-ATRP ile elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonlarda farklı ACN/Su oranları ile nükleotid karışımının izokratik ayırımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 254 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP, (C) HPMA-Cl-b-ATRP, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. adenin, 4. guanin.....	140
Şekil 4.38. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımı ayırımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi.....	143
Şekil 4.39. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.37'de verilmektedir.	144
Şekil 4.40. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.37 'de verilmektedir.	145
Şekil 4.41. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonda nükleotid karışımının izokratik ayırımında hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A), (B) 90/10 mL/mL (C) 95/5 mL/mL, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. adenin, 4. guanin.....	147
Şekil 4.42. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP	

kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayrımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.41’de verilmektedir.....	149
Şekil 4.43. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayrımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.41’de verilmektedir.....	150
Şekil 4.44. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonda nükleosidlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, (UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A),(C) 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin (B) 1. timidin, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin.	152
Şekil 4.45. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleosid karışımının izokratik ayrımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.44’te verilmektedir.....	155
Şekil 4.46. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleosid karışımının izokratik ayrımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.44’te verilmektedir.....	156
Şekil 4.47. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonda polar organik karışımının izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A) 95.0/5.0 (B) 92.5/7.5 (C) 97.5/2.5 mL/mL, (UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.	158
Şekil 4.48. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında polar organik karışımının izokratik ayrımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.47’de	

verilmektedir	161
Şekil 4.49. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında polar organik karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.47'de verilmektedir	162
Şekil 4.50. Cl-PTMS-b-ATRP kolonda organik asitlerin izokratik ayırımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAç, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, UV dedektör, 214 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. dekanolik asit, 2. asetik asit 3. p-toluik asit, 4. benzoik asit.....	164
Şekil 4.51. Cl-PTMS-b-ATRP kolonunda organik asitlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe yüksekliğinin (B) kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.50'de verilmektedir.....	166

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔP	Kolon geri basıncı
ε	Toplam kolon gözenekliliği
η	Hareketli faz vizkositesi
v	Hareketli faz hacimsel akış hızı (m^3/s)
C_v	Boy dağılımı için değişim katsayısı
d_m	Medyan gözenek boyutu
D_n	Sayıca ortalama çap değerini (μm)
d_p	Partikül çapı (Ortalama partikül boyutu) (μm)
D_{pm}	Medyan gözenek çapı
F	Hareketli fazın akış hızı (mL/s)
h	Kademe yüksekliği
k	Alıkonma faktörü
k'	Analit kapasite katsayısı
K_0	Kolon geçirgenliği
L	Kolon uzunluğu
N	Teorik kademe sayısı
N_i	Analiz sayısı
pK_a	Asit ayrışma değeri
r	Kolon iç çapı
R	Pik çözünürlüğü
RT_i	i nolu alıkonma süresi
RT_n	Ortalama alıkonma süresi
S	Çözünürlük
T	Sıcaklık
t_R	Herhangi bir bileşenin kolon içerisinde alıkonma zamanı
t_0	Referans bileşenin kolon içerisinde geçirdiği süre
u	Hareketli faz lineer akış hızı (cm/s)

V _p	Kolondaki toplam partikül gözenek hacmi
V _R	Analitin kolondaki alıkonma hacmi
w	Pik taban genişliği
w _{1/2}	Pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini

Kısaltmalar

AB	Amonyum asetat tamponu
ACN	Asetonitril
AIBN	2,2'-Azobisisobutironitril
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (surface initiated-atom transfer radical polymerization)
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BiPy	Bipiridin
BrlBuBr	2-Bromoisobütrilbromür
BSS	Bağıl standart sapma
CEC	Kapiler Elektrokromatografi
Cl-Pr-TMS	Kloropropiltrimetoksisilan
CuBr	Bakır (I) bromür
DMAPS	[N,N-dimetil-N-(metakriloksietil)amonyum] propan sulfonat
DMSO	Dimetil sulfoksit
DVB	Divinilbenzen
DMF	Dimetil formamid
EB	Etil benzen
EC	Elektrokimyasal dedektör
EDA	Etilendiamin
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
GC	Gaz Kromatografisi
GMA	Glisidil metakrilat
FL	Floresans dedektör
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

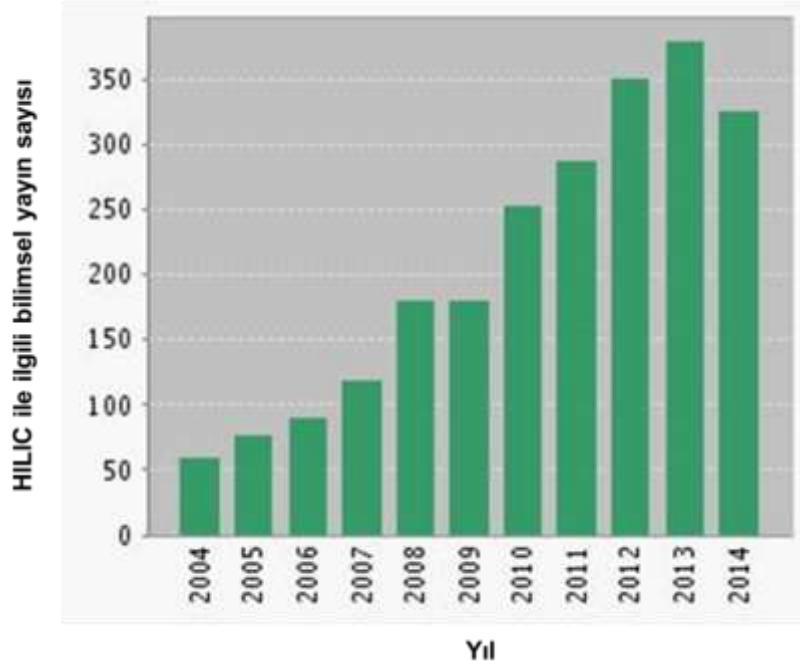
HPMA-CI	3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat
HMMAA	N-(hidroksimetil) metakrilamid
ISEC	Büyükölükçe Ayırma Kromatografisi
mikro-LC	Mikro sıvı kromatografisi
MeOH	Metanol
MESH	2-metakriloksietildimetil(3-sülfopropil) amonyumhidroksit
META	2-(metakriloksi)etiltrimetilamonyum metil sulfat
Nano-LC	Nano-Sıvı Kromatografisi
OTC	Açık tübüler kolonlar
ÖYA	Özgöl yüzey alanı (m ² /g)
PB	Sodium fosfat tamponu
Poli(CMS-co-DVB)	Poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen)
Poli(GDMA-co-EDMA)	Poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat)
PETA	Pentaeritrol triakrilat
RAFT	Tersinir Katımlı Ayrışmalı Zincir Tansfer Polimerizasyonu (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization)
RPC	Ters faz kromatografisi (reversed phase chromatography)
PVA	Poli(vinil alkol)
PVP-K30	Poli(vinil pirolidon)
RID	Refraktif indeks dedektörü
SD	Standart sapma
SEC	Ters Büyükölükçe Ayırma Kromatografisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SFRP	Kararlı Serbest Radikal Polimerizasyonu
SLS	Sodyum lauril sülfat
TBAI	Tetrabutilamonyum iyodür
TEA	Trietilamin
TEA-OH	Trietanolamin
THF	Tetrahidrofuran
UV	Ultraviyole-görünür bölge

1. GİRİŞ

Mikro-sıvı kromatografisi, klasik yüksek performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) alternatif olarak geliştirilen, düşük hacimli hareketli faz kullanımı ile hızlı ve yüksek çözünürlüklü kromatografik analizi hedefleyen en yeni sıvı-kromatografisi yöntemlerinden biridir. Günümüzde mikro-sıvı kromatografisi ile ilgili araştırma çalışmalarının bir bölümü kromatografik yöntem geliştirilmesine; bir bölümü ise mikro-sıvı kromatografisi için sabit faz tasarımına yönelik yapılmaktadır [1-34]. Bunlar içerisinde mikropartikül ve monolit formundaki sabit fazların tasarımı önemli yer tutmaktadır [19-34]. Ancak, yapılan çalışmalar, monolitik sabit fazların, kolon ayırma verimi yönünden mikropartikül formundaki sabit fazların gerisinde kaldığını göstermektedir [35]. Bu durum monolitik mikrobor kolonların henüz partikül bazlı mikrobor kolonlar kadar yaygınlaşmamasının en önemli nedenidir. Ayrıca 1 mm'den daha düşük bir çap değerine sahip monolitlerin sisteme montajının zorluğu ve mekanik dayanımlarının düşük olması yaygın kullanımın önündeki önemli engellerdir.

Kullanımda olan ve kataloglarda "microbore columns" olarak tanımlanan partikül bazlı mikrobor kolonlar günümüzde mikro-sıvı kromatografisi için en yaygın tercih edilen kolon türüdür. Klasik HPLC kolonları genelde 4.6 mm ve ya daha büyük iç çap değerlerine sahip olup, bu kolonlara boyutları çoğunlukla 5-10 mikron aralığında olan gözenekli polimerik veya silika bazlı dolgu malzemeleri doldurulmaktadır. Hızlı kromatografik analizin yüksek çözünürlükle yapılabilmesi için mikrobor kolonun yüksek ayırma verimine (yüksek teorik kademe sayısına) sahip olması gerekmektedir. Kolondaki sabit fazı oluşturan partiküllerin boyutunun olabildiğince küçük ve özgül yüzey alanının yüksek olması, kolon ayırma verimini arttıran en önemli iki faktördür [36-39]. Klasik HPLC kolonlarında 3 mikrondan daha küçük partikül kullanımı sonucu ortaya çıkan yüksek basınç düşmesi değerlerinde mevcut pompa sistemi ile çalışılmazken; mikro-sıvı kromatografisi sistemlerinde daha güçlü pompa kullanımı ile yüksek basınç düşmesi değerlerinde çalışmak mümkün olmaktadır. Böylece dar çaplı olan mikrobor kolonlarda 3-5 mikron aralığında ortalama boy değerine sahip dolgu malzemesi kullanılarak yüksek kolon verimine ulaşmak mümkün olabilmektedir [37,38].

Literatürde sıvı kromatografisi uygulamalarında kolon dolgu materyali olarak genellikle silika bazlı kolon materyallerinin tercih edildiği görülse de son yıllarda özellikle polimerik yapıda olan mikro-HPLC kolonlar üzerinde araştırma çalışmalarının yoğunlaştığı görülmektedir [40-44]. Polimerik dolgu materyallerinin küresel, gözenekli ve eş boyutlu (monodispers) formda kolayca sentezlenebilir olması, geniş bir pH aralığında kararlı olması ve kolay türevlendirilebilir olması bu ilgiyi arttıran faktörlerdir. Hidrofilik etkileşim kromatografisi (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) son yıllarda hızlı bir gelişim gösteren ve özellikle polar biyokimyasalların analizinde hızla yaygınlaşan yeni bir sıvı-kromatografisi tekniğidir. Yöntemde, polar (hidrofilik) ligand içeren sabit faz kullanılmakta ve polar formdaki analitler sabit fazla hidrofilik etkileşim derecesine bağlı olarak kolonda ayrılmaktadır. En yaygın ve klasik sıvı-kromatografisi tekniklerinden biri olan ters faz kromatografisinde (reversed phase chromatography, RPC) polar analitlerin, apolar formdaki sabit fazla, zayıf etkileşimi, kromatografik kolondan çabuk atılmalarına neden olmakta bu durum yöntemin polar bileşen analizinde kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu güçlüğü ortadan kaldırmak amacıyla, ters faz kromatografisine alternatif yeni bir teknik olarak geliştirilen HILIC ile ilgili sabit faz geliştirme çalışmaları, yöntemin özellikle nükleotid, peptid türü moleküller, bunların oligo formları, nükleosid, karbohidrat ve katekolamin türü polar biyokimyasalların analizinde avantajlı olduğunun anlaşılması ile son 5 yılda ciddi bir artış göstermiştir. Şekil 1.1'de uluslararası hakemli dergilerde HILIC üzerine basılan makalelerin yıllara göre değişimi verilmektedir [45,46]. Buradan görüldüğü gibi, HILIC üzerine yapılan araştırmalar özellikle son 5 yılda ciddi bir artış göstermiştir ve HILIC günümüzde üzerinde en fazla çalışılan ve gelişime açık kromatografik tekniklerden biri haline gelmiştir.



Şekil 1.1. Uluslararası hakemli dergilerde HILIC üzerine basılan makalelerin yıllara göre değişimi [46].

HILIC’te hidrofilik ligand içeren sabit faz kullanımı nedeniyle, sabit faz ile hidrofilik formdaki polar analitler arasında baskın bir etkileşim olmaktadır. Etkileşimin gücüne bağlı olarak analitler, en apolardan polara doğru artan sürelerde kolondan çıkmakta ve klasik kromatografik tekniklere kıyasla çok daha kolay ayrılabilir. Metodun özellikle polar formda biyokimyasal moleküllerin (peptid, nükleotid, nükleosid, karbohidrat vb.) analizinde kullanılabilmesi HILIC uygulamalarının son yıllarda hızla yaygınlaşmasını sağlamıştır. Böylece HILIC, en yaygın kromatografik tekniklerden biri olan ters faz kromatografisine alternatif, polar analit tayinine yönelik yeni bir kromatografik yöntem olarak ortaya çıkmıştır. HILIC üzerine yapılan araştırmalar, yeni sabit faz ve kromatografik yöntem geliştirme konularında yapılmaktadır.

2006 yılından itibaren literatürde yer almaya başlayan partikül bazlı HILIC sabit fazlarının sentezine yönelik çalışmaların büyük bir kısmı klasik HPLC sistemine yönelik ve silika partikül bazlı olarak yapılmıştır. Bu çalışmalarda Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (surface initiated-atom transfer radical polymerization, ATRP) veya Tersinir Katımlı Ayrışmalı Zincir Transfer Polimerizasyonu (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT)

yöntemleri kullanılarak silika partiküller üzerinde hidrofilik ligandlar oluşturulmuştur [47-52]. Sıvı kromatografisi uygulamaları için poliakrilat bazlı sabit fazların, silika matrislere kıyasla daha yüksek kimyasal dayanıma sahip olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [53-56]. Geçmiş yıllarda farklı kromatografik modlar (özellikle ters faz kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi) için sabit fazların sentezinde başlangıç materyali olarak kullanılmak üzere eşboyutlu-gözenekli formda polimer bazlı, reaktif partikül türleri [poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) poli(GMA-co-EDMA) ve poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen)] poli(CMS-co-DVB) sentezlenmiştir [39,56-59]. Literatürde bu tür polimerik partiküllerin kullanıldığı ve HILIC için sabit faz eldesini amaçlayan yalnızca iki çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar 2011 yılında yayınlanmıştır [60,61]. Çalışmalardan birinde eşboyutlu-gözenekli formda poli(4-klorometilstiren-co-divinilbenzen), poli(CMS-co-DVB), diğerinde ise poli(glisidil metakrilat-co-etilen dimetakrilat), poli(GMA-co-EDMA) partiküller destek materyali olarak kullanılarak ATRP ile partiküller üzerine polimerik fırça (molecular brush) formunda hidrofilik ligandlar bağlanmış ve sabit fazlar, HILIC ile polar analit analizi için kullanılmıştır [60,61]. Türevlendirme için benzer şekilde klorometil grubunu kullanan poli(CMS-co-DVB) kopolimeri, aromatik benzen halkası içeren apolar ve hidrofobik formda bir yapıdır. Baz matrisin hidrofobik olması, analit ile sabit faz destek materyali arasındaki istenemeyen (özgül olmayan) etkileşimi arttıran bir faktördür [36-39]. Partikül bazlı destek materyalinin sentezi için tez kapsamında önerilen poli (3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-co-etilen dimetakrilat) ise poli(klorometilstiren-co-divinilbenzen) kopolimerine kıyasla daha polar, hidrofilik ve dolayısıyla HILIC sabit faz sentezine çok daha uygun yeni bir seçenek olacaktır. Ayrıca 2011 yılında yayınlanan polimerik partikül bazlı ayırma ortamları klasik HPLC sisteminde kullanıma yöneliktir. Literatürde, mikro-sıvı kromatografisi sisteminde HILIC uygulaması için geliştirilmiş polimerik partikül bazlı ayırma ortamları az sayıdadır.

Tez çalışmasında ilk kez kullanımı önerilen reaktif HPMA-Cl ile destek materyaline türevlendirme esnekliği kazandırılmış ve aynı polimere farklı ligandların bağlanması ile farklı polariteye sahip sabit fazlar elde edilmiştir. Bu özellik, destek materyalinin boyut, gözeneklilik özellikleri ve kimyasal yapısı sabit tutularak, değiştirilen ligand ile HILIC için kromatografik davranışın analizinde avantaj sağlayacaktır. Çalışmada seçilen polimerik yapının literatürde kullanılan reaktif

formlardan farklı 3 avantajı bulunmaktadır.

1) Yapının ana monomeri olan HPMA-Cl'de yer alan hidroksil grubu poliakrilat bazlı yapıya hidrofilitate kazandırmaktadır. Yapının polar ve hidrofilik özellikte olması, özellikle baz matris ile kromatografik ayrımı yapılacak analitler arasındaki özgül olmayan etkileşimlerin önlenmesini sağlamaktadır.

2) Polimerik yapı, farklı ligandların yapıya kovalent bağlanabilmesi için kolaylıkla reaksiyon verebilecek bir fonksiyonel gruba 'kloropropil grubuna' sahiptir. Yapısındaki klor, birçok kromatografik ligand ile ılımlı ve kolay kontrol edilebilir koşullarda doğrudan reaksiyon verebilmektedir.

3) Reaktif grup klor, karbonil grubuna ester bağıyla bağlı propil grubunun ucunda yer almaktadır. Bu durum, klor üzerinden bağlanacak ligandın ana zincirden herhangi bir uzatma kolu kullanımına gerek olmaksızın uzaklaşmasını sağlamaktadır. Bu şekilde ayırma ortamında ligand ile analit arasında sterik engellemeye dayalı bir etkileşim kısıtlaması da engellenmektedir.

Bu faktörler değerlendirildiğinde polar ve hidrofilik formda ve esnek bir türevlendirme şemasına sahip poli(HPMA-Cl-co-EDMA) eşboyutlu-gözenekli partikül formundaki destek materyallerinin HILIC sabit faz sentezi için şimdiye değin kullanılmayan ve son yıllarda yayınlanan çalışmalarında ilerisinde olan yeni bir materyal olduğu görülmektedir. Dolayısıyla mikro-sıvı kromatografisi için kullanıma uygun, yüksek ayırma verimine ve hızlı analiz yapabilme yeteneğine sahip yeni HILIC mikrobor kolonlarının sentezi orijinal ve yeni bir yaklaşımdır.

Tüm bu özellikler dikkate alınarak, tez kapsamında yeni bir kromatografik sistem (mikro-LC) için yeni bir kromatografik modda (HILIC) mikrobor kolon geliştirilmesi amaçlanmıştır. Mikrobor kolon (microbore column) eldesi için kullanılacak eşboyutlu-gözenekli formda poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, ilgili monomer/çapraz bağlayıcı (HPMA-Cl/EDMA) çiftine özgü çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon tekniği ile sentezlenmiştir. Sentezlerde monomer faz bileşimi (HPMA-Cl/EDMA mol oranı) değiştirilerek, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin mikrobor kolonda kullanıma uygun ortalama partikül boyu ve gözeneklilik özellikleri ile eldesi sağlanmıştır. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere, yapılarında bulunan "kloropropil" grubu üzerinden, HILIC için kullanılacak kromatografik ligandlar kovalent olarak bağlanmıştır. Bu amaçla, katyonik ve

zwitteriyonik formda kromatografik ligandlar seçilmiştir. Bu yaklaşım, yeni bir teknik olan HILIC'de kromatografik ligand etkisinin matrisin boyut ve gözenekilik özellikleri korunarak net gözlenmesine yardımcı olmuştur.

Eşboyutlu-partikül bazlı mikrobor kolonların, mikro-sıvı kromatografisi sisteminde HILIC modunda kromatografik performansları belirlenmiştir. Farklı kromatografik ligandlar içeren partikül bazlı kolonlar polar formda biyomoleküllerin (nükleotid, nükleosid, organik asit, polar bileşikler vb.) ayırımında kullanılmıştır. Kromatografik çalışmalarda farklı ligand türleri içeren mikrobor kolonlar için uygun hareketli faz bileşimi belirlenmiş ve kolon çalışma koşulları tanımlanmıştır. Her bir mikrobor kolon için izokratik durumda, teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi (van-Deemter grafiği) elde edilmiştir.

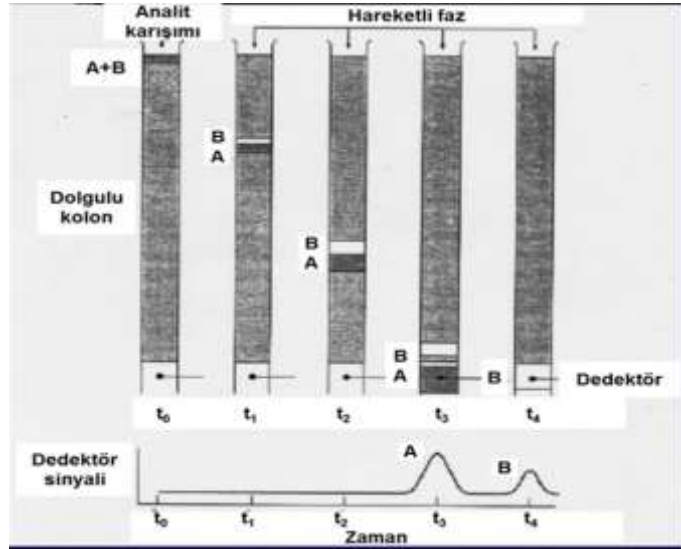
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sıvı Kromatografisi

2.1.1. Tarihi ve Avantajları

1906 yılında Tsweet tarafından yazılan bir makalede tanımlanmasından itibaren kromatografi kimyasal bileşiklerin birbirinden ayrılması için yaygın olarak kullanılmaktadır [62,63]. Kromatografi, homojen bir karışımın bileşenlerini, kimyasal veya fiziksel özelliklerindeki farklılıklara dayalı olarak birbirinden ayıran analitik bir yöntemdir. Bu yöntem, bir karışımda bulunan maddelerin biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması olgusuna dayanmaktadır. Hareket eden (akışkan) faz hareketli faz, gözenekli ortam ise sabit faz olarak adlandırılır. Sabit faz bir katı ise, farklı polaritelere sahip maddeler sabit faz yüzeyine farklı tutunma özellikleri gösterir. Eğer sabit faz bir sıvı ise karışımdaki maddelerin sabit faz üzerinden geçiş hızları, sabit faz ve hareketli fazlardaki çözünürlüklerine göre farklılık gösterir [64,65]. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi karışımdaki bileşenlerin, sabit faz ile etkileşiminden ötürü, kolon içerisinde geçirdikleri zaman değişmekte; bileşenler kolonu farklı zamanlarda terk ederek birbirlerinden ayrılmaktadır.

Sıvı kromatografisi, sıvı ortamda bulunan bileşenlerin nitel ve nicel analizi için en yaygın olarak kullanılan analiz yöntemidir. Bu yöntemin en yaygın -halen günlük kullanımda- olan formu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) olarak bilinmektedir. HPLC'nin büyük başarısını sağlayan en önemli özellikleri yenilenebilirlik, kromatografik yöntemde değişiklik yapabilme kolaylığı ve yüksek saflaştırma yeteneğidir. En mükemmel özelliği birbirine çok benzeyen ya da birbirinden çok farklı moleküller için bile belirli koşullar altında sağladığı olağanüstü çözünürlüktür.



Şekil 2.1. Bir kromatografik kolon boyunca örnek karışımının hareketli faz içerisinde taşınması [64]

1950'li yıllarda klasik sıvı kromatografisi, düşük tekrarlanabilirlik sağlayan ve analizcinin el becerisine dayalı bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Yöntem sabit faz olarak kullanılan dolgu maddesinin tanecik boyutu küçültülerek kolon veriminin önemli derecede arttırıldığı bir teknik haline dönüşmüştür. Modern kromatografi tekniğini geliştiren Martin ve Syngge, bu düşüncüyü 1941 yılındaki yayınlarında öngörmüşler ve yaptıkları çalışmalarla Nobel Ödülü'nü kazanarak kromatografide ilk önemli ilerlemeyi gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra 1960'lı yıllarda ayırma mekanizması ile ilgili geliştirdikleri yeni fikirlerle daha hızlı ve çözünürlük değeri daha yüksek kromatografik ayrımlar elde etmişlerdir [66].

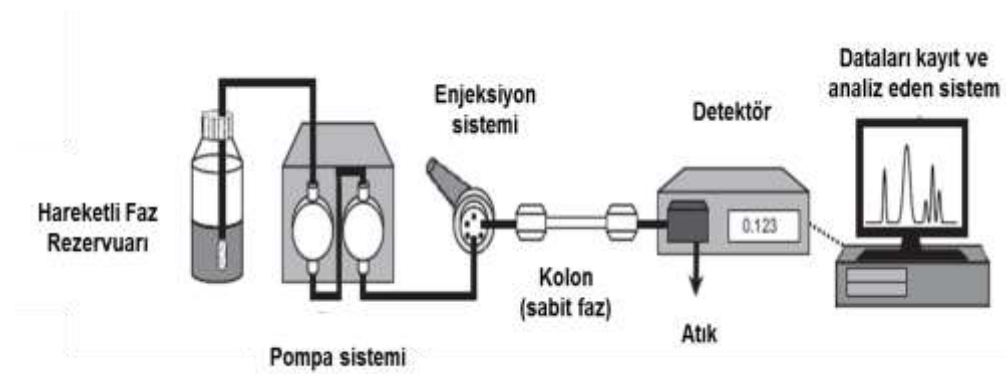
1960 yılından itibaren teorisi üzerinde çalışılarak sıvı kromatografisi alanında ilk modern cihaz Csaba Horvath tarafından geliştirilmiştir. Tekniğin kısa bir özetini 1966 yılında Nature dergisinde duyuran Horvath, aynı yıl Uluslararası Kromatografi Sempozyumu'nda tekniğin detaylarını açıklamış ve geliştirmiş olduğu cihaza bugün de evrensel olarak kullanılan 'yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)' adını vermiştir. Horvath, apolar sabit fazların ve polar hareketli fazların kullanıldığı ters faz kromatografisi teorisini ortaya koyarken, Kirkland silika partiküllere uzun zincirli hidrokarbon ve diğer bir grup organik molekülleri kovalent bağ ile bağlayarak sabit fazların gelişimine öncülük etmiştir [67]. 1971 yılında Kirkland ve Synder'in yayınladığı 'Modern Practice of Liquid

Chromatography' adlı kitap bu tekniğin anlaşılması ve yaygınlaşmasında önemli bir yere sahip olmuştur [62,63,67]. 1970'lerden günümüze, HPLC tekniği, laboratuvarlarda organik maddeler için ayırma, analiz ve saflaştırmanın vazgeçilmez seçeneği olmuş, özellikle de peptit ve proteinlerin karakterizasyonunda en önemli yöntem haline gelmiş ve biyolojik- biyomedikal bilimlerde son on yıldır çok hızlı sağlanan ilerlemelerde kritik rol üstlenmiştir. Böylece HPLC, molekül analiz ve saflaştırmalarında öncü teknik olarak günümüzde iyi bir yer edinmiştir [62,63,67].

HPLC tekniği, kullanılan diğer tekniklere göre üstün özelliklere sahiptir. HPLC sistemlerinde kullanılan sabit fazların geliştirilmesine yönelik çalışmalar, daha küçük boyutlara sahip kolonlar kullanılarak yüksek basınçta, daha kısa sürede daha yüksek verimle kromatografik analizler yapılabildiğini göstermektedir. Ultraviyole ve floresans dedektörler kullanılarak yüksek duyarlılıkta analit tayini yapılabilmekte ve kütle spektrometresi ile birlikte çok düşük derişimdeki analitlerin çözelti içerisindeki derişimleri belirlenebilmektedir [68].

2.1.2. HPLC Bileşenleri

HPLC cihazı; uygun bir çözüde çözülen örnek karışımını (analitleri) sıvı hareketli faz yardımıyla yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçirerek analitlerin ayrılması amacı ile en yaygın kullanılan cihaz haline gelmiştir. Modern HPLC sistemi Şekil 2.2'de gösterildiği gibi pompa, enjeksiyon sistemi, kolon (sabit faz), detektör, verileri kayıt ve analiz eden sistem olarak 5 ana kısımdan oluşmaktadır.



Şekil 2.2. HPLC sistemini oluşturan birimler [69].

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi bu yöntemde uygun çözücüde çözülen örnek karışımı (analitler), kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulan yüksek basınç farkı ile kolonda ilerlemektedir. Analitler kolondaki sabit faz ile etkileşimlerine göre kolonu farklı zamanlarda terketmektedir. Basınç farkı, kolon girişine bir pompa aracılığıyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompa sistemi HPLC sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistemde; hareketli fazın; enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır. Başlangıçta basınç; modern sıvı kromatografisinin temel kriteri olarak düşünülmekte ve bu nedenle sistem “Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi” olarak adlandırılmaktaydı [70]. Ancak bu tanımlamam günümüzde geçerliliğini yitirmiştir; çünkü yüksek performans yalnızca basınç değil farklı faktörler göz önüne alınarak değerlendirilmektedir.

Yüksek performans sağlayan faktörler ;

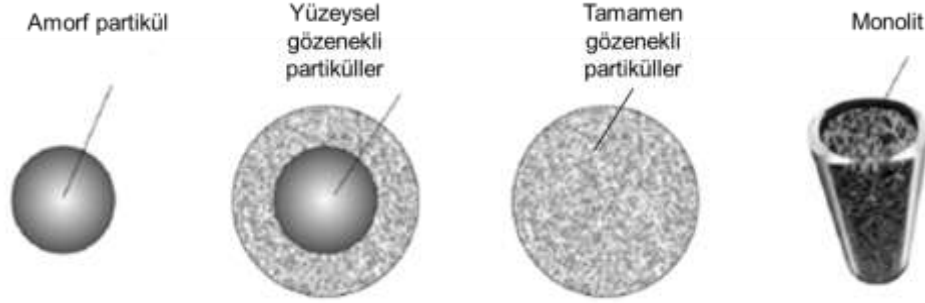
- Dar bir boy dağılım aralığında uygun partiküllerin kullanılması,
- Gözenek boyutu dağılımı,
- Yüksek basınçta kolon dolgulanması,
- Doğru, düşük hacimli örnek enjektörleri,
- Duyarlı dedektörler,
- Doğru pompalama sistemi kullanımı,

şeklinde sıralanmaktadır [70,71].

Kromatografik analiz, kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar. Enjeksiyon ünitesi basit olarak bir enjeksiyon valfi ve örnek haznesinden oluşur. Analiz, analit ve hareketli fazın kolona pompalanması ile devam eder. Ayrılan her bir analitin pikleri, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip analit miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Her bir analit için alınan dedektör cevabı bir kaydedici veya bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir. Sabit faz ve örneğin, hareketli faz ile etkileşimleri göç derecesini ve örnek bileşenlerin ayrılmasını belirler [65,72].

Kolonlar: Genellikle kimyasal aşınmaya ve yüksek basınca dayanıklı olmasından dolayı paslanmaz çelikten yapılmaktadır. Paslanmaz çeliğin bir diğer avantajı da sabit faz ile yoğun, düzgün ve homojen şekilde doldurulabilmesidir [73]. En sık

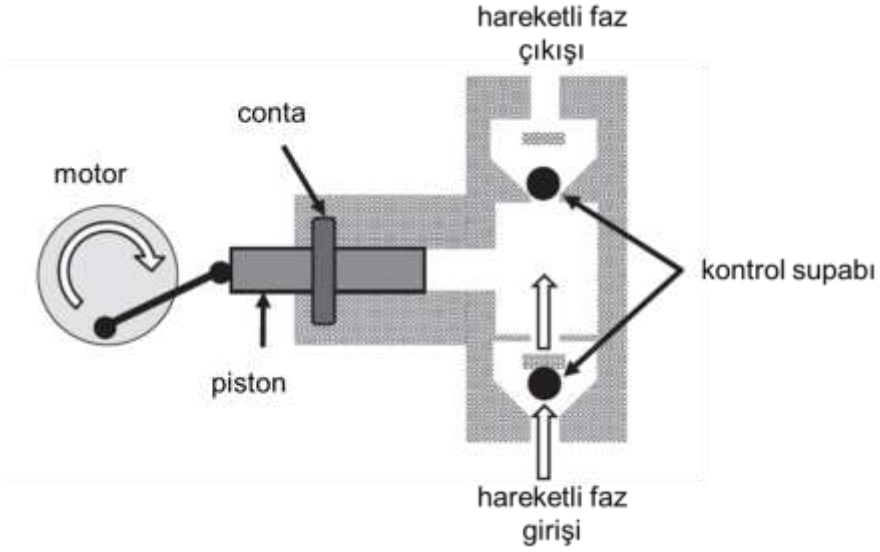
karşılaşılan sabit faz türleri; amorf partiküller, yüzeysel gözenekli partiküller, tamamen gözenekli partiküller ve monolitlerdir [73]. (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. HPLC kolonlarında kullanılan sabit faz yapıları [73]

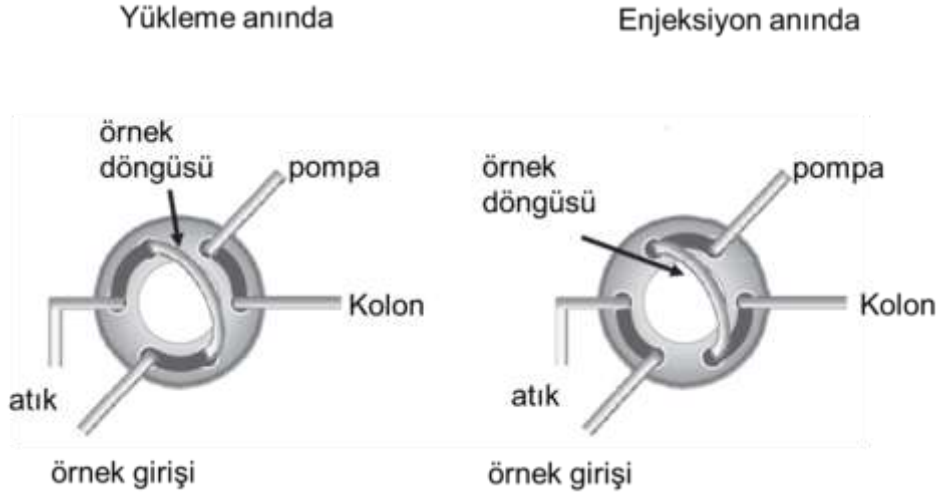
Amorf partiküller gözeneksiz bir tabakadan oluştuğu ve bu nedenle partikül gözenek içi difüzyon gerçekleşmediği için; bu sabit fazlar ile çok hızlı ayrımlar yapılabilmektedir. Fakat, gözenekli partiküller ile kıyaslandıklarında düşük yüzey alanlarına sahip olduklarından kolonda analitler için düşük alıkonma zamanı elde edilmekte ve bu nedenle kolona örnek yüklemesinde problem meydana gelmektedir [74]. Buna karşın gözenekli partiküllerin yüksek yüzey alanına sahip olması analitlerin alıkonma zamanını arttırmakta ve kolona örnek yüklemesi elverişli hale gelmektedir. Fakat gözenek içerisine doğru uzanan difüzyon yolu kolon verimini düşürmektedir. Monolitik dolgu malzemesi, birbirine kanallarla bağlanan sürekli gözeneklerden oluşmaktadır. Düşük kolon basıncı ile kısa sürede kromatografik ayırım sağlanabilmekte ve monolitik kolona yüksek örnek yüklemesi yapılabilmektedir. Partikül ve monolitik bazlı sabit fazlar için sıklıkla inorganik materyaller (silika, alüminyum, zirkonyum ve titanyum) ve ya organik polimerler kullanılmaktadır [74].

Pompa sistemi: Mikron boyutlu partiküller ile doldurulmuş kolonlarda akışı sağlayabilmek için gerekli olan sistemdir. HPLC pompaları vidalı (şırınga tipi) ve pistonlu pompalar olmak üzere iki türdür. Kontrol vanaları ve pistondan oluşan bu sistem ile akış dengesine ve kararlılığına hızlı bir şekilde ulaşılarak yüksek kolon geri basıncı dengelenmektedir. Pistonlu pompanın şematik gösterimi Şekil 2.4'te verilmektedir [73,75].



Şekil 2.4. Pistonlu pompanın şematik gösterimi [73]

Örnek enjeksiyon sistemi: Çözücü içinde hazırlanan uygun derişimdeki örneğin kolona transferini sağlayan bölümdür. Yüksek basınçlı pompa ile kolon arasında analiz sırasında pozisyon değiştiren bir enjeksiyon valfinden ve örnek haznesinden oluşmaktadır. HPLC sisteminde kullanılan üç tür enjeksiyon sistemi bulunmaktadır. Birinci türde enjeksiyon sırasında akış durdurulmakta ve örnek direkt sabit faz üzerine gönderilmektedir. İkinci türde örnek enjeksiyon öncesi hareketli fazda çözülerek bir şırınga ile valften enjekte edilmektedir. Örneğin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için örnek çok uçlu bir vananın içerdęi kangala verilmekte ve vananın pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın kangaldan geçmesi (enjeksiyon) sağlanmaktadır. Üçüncü ve en çok tercih edilen tür çok girişli valf kullanılmasıdır (Şekil 2.5) ve bu valfin kullanımı analizlerin tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır [73,75].



Şekil 2.5. Altı-girişli valfte yükleme ve enjeksiyon anında örnek döngüsünün durumu [73]

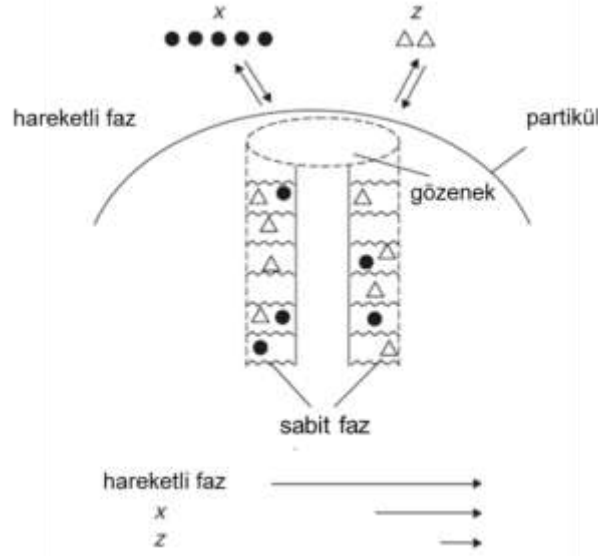
HPLC dedektörü: Kolondan ayrılan örnek bileşeninden alınan sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan cihazdır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, UV ışığın absorpsiyonuna (UV dedektörler) ve kırılma indisine (refraktif indeks dedektörler) dayanır. Daha az kullanılanlar floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve elektrik iletkenlik dedektörleridir. Ayrıca HPLC ile birlikte kütle spektrometresi kullanımı ile analiz edilen örneğin kimyasal yapısı hakkında daha fazla bilgi toplanabilmektedir [73].

Verileri kayıt ve analiz eden sistem: Detektörden gelen sinyallerin belli bir büyüklüğe çevrilmesini, verilerin saklanmasını ve işlenmesini sağlar. Böylece analiz sonuçları değerlendirilip kolon performans parametreleri hesaplanabilmektedir [73].

2.1.3. Kromatografik Performans Parametreleri

Kromatografik performans parametreleri, kolon dolgu materyali ve analitlerin etkileşimi sonucunda analitlerin değişen alıkonma sürelerine göre belirlenen, kolon performansının tespit edilmesi ve kıyaslanabilmesi için kullanılan boyutlu ve boyutsuz faktörlerdir. HPLC sistemlerinde yaygın olarak kullanılan kromatografik performans parametreleri aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmaktadır:

Alıkonma: Hareketli faz içerisinde kolona gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesidir. Bir kromatografi kolonunun iki çözünüeni ayrılmadaki verimliliği, iki türün akış sırasındaki bağıl hızlarına bağlıdır. Analitin kolondan göç hızı analitin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dengesine bağlıdır. Şekil 2.6'da X ve Y analitlerinin kolon boyunca ilerlerken fazlar arasında gerçekleşen kütle transferi ve difüzyon gösterilmektedir. X ve Z analitlerinin kolon içerisindeki alıkonmaları bu olaylara göre farklılık göstermektedir [75].



Şekil 2.6. X ve Z analitlerinin kolon içerisindeki sabit faz ve hareketli faz içerisindeki hareketleri [75]

Bu özellikten yola çıkılarak, belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için alıkonma zamanı (retention time- t_R) tanımı türetilmekte ve Eşitlik 2.1 ile hesaplanmaktadır. Bu kavram, belirli sabit deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terk etmesi için geçen sürenin bir fonksiyonudur. Bu süre yüzeyin hidrofobisitesi ve hareketli fazın kompozisyonu ile değişmektedir [76]. Burada iki tanım karşımıza çıkmaktadır.

t_0 = kolona ait ölü zaman (column dead time) yani sabit faz ile etkileşmeyen inert

bir referans analit için alıkonma süresi.

t_R = alıkonma zamanı (retention time), herhangi bir hareketli faz ile birlikte kolon içerisinde herhangi bir bileşiğin kaydedilen alıkonma süresi

$$t_R = t_0 + t'_R \quad (2.1)$$

Ayrılan analitin sabit ve hareketli fazda dağılımını (alıkonmasını) etkileyen faktörler şunlardır:

- Hareketli fazın kompozisyonu ve özellikleri
- Sabit fazın tipi ve özellikleri
- Sabit ve hareketli faz ile ayrılan örnek bileşenleri arasındaki moleküller arası etkileşimler
- Sıcaklık

Uygun bir kromatografik ayırma hareketli ve sabit faz özelliklerinin veya çalışma parametrelerinin değiştirilmesi ile elde edilir [73].

Alıkonma faktörü (k): Hareketli faz akış hızından, kolonun boyutlarından, sabit fazın boyutundan ve gözenekliliğinden bağımsız olarak sadece kolon içerisindeki sabit fazın hareketli faz içindeki analitler ile etkileşimine, yani sabit fazın polaritesine bağlı olarak değişen boyutsuz bir parametredir. Hidrofilik etkileşim kromatografisinde sabit fazın hidrofobitesini gösterir. Alıkonma faktörü Eşitlik 2.2.'de tanımlanmıştır [73].

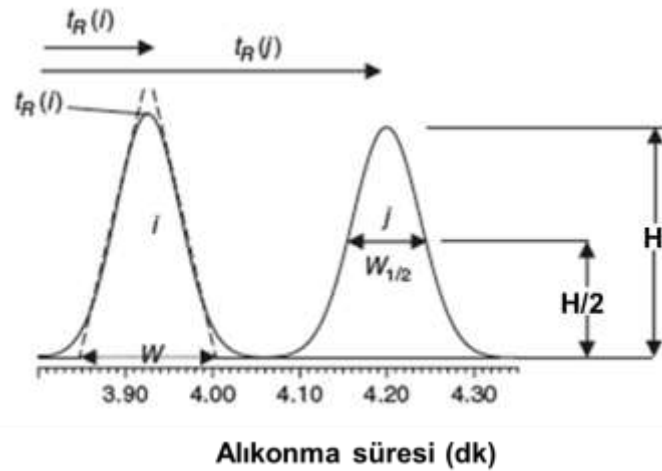
$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.2)$$

Başarılı bir kromatografik analizde k değerleri 1.5 ile 4 arasında değişmektedir. 1.5'tan küçük değerler analitlerin birbirlerinden yeterince iyi ayrılmadıklarını; 4 üzeri değerler ise analitlerin çok geç zamanlarda kolonu terkettiklerini, analiz süresinin uzadığını ve pik genişliklerinin arttığını göstermektedir. Kompleks kromatografik analizlerde bu değer 1 ile 10 arasında değişmektedir [73].

Teorik kademe sayısı veya kademe yüksekliği: Kromatografik sistemin ayırma performansını gösteren kolon verimliliğinin önemli bir ölçüsüdür. Teorik kademeleri, analitin kolon boyunca ilerlerken sabit faz ile etkileştiği tüm bölgelerin sayısı olarak düşünülebilir. Bir kolonda teorik kademe sayıları ne kadar fazla ise kolon verimi o kadar yüksektir demektir [73,76]. Şekil 2.7'deki veriler kullanılarak Eşitlik (2.3) yardımıyla hesaplanır:

$$N=5.54 \times (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.3)$$

Burada t_R ; bileşiğin alıkonma süresini ve $W_{1/2}$; pik yüksekliğinin yarısındaki taban genişliğini ifade etmektedir. Kolon boyu arttıkça teorik kademe sayısında da artış gözlenir.



Şekil 2.7. İki ardışık pik için teorik kademe sayısı değerinin hesaplanmasında kullanılan pik taban genişliklerinin ve alıkonma sürelerinin gösterimi [75]

Kademe yüksekliği,

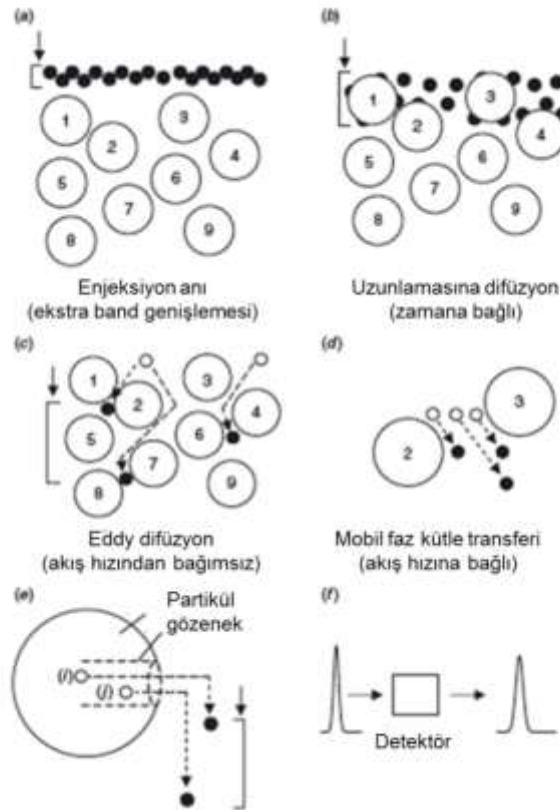
$$h = (L / N) \quad (2.4)$$

eşitliği ile gösterilmektedir. Burada h; kademe yüksekliği; L, kolon boyudur.

Bir kolonda N değeri büyüdükçe h değeri azalır. Daha düşük kademe yüksekliği ve

daha yüksek teorik kademe sayısı, yüksek verim ile kısa sürede kromatografik sonuçların elde edildiği anlamına gelmektedir. Partikül boyutunu küçülterek veya kolon boyunu uzatarak yüksek teorik kademe sayısı veya düşük kademe yüksekliği değeri elde edilir [73].

Pik genişliği (band genişlemesi) ve buna bağlı olarak teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliği, kromatografik analiz koşullarına (analiz sıcaklığı, kolon boyutu, partikül boyutu, basınç vs.) bağlı olarak değişmektedir. Şekil 2.8a-e'de analitin kolon boyunca ilerlemesi sırasında pik genişliğine neden olan olaylar gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Analitin kolon boyunca ilerlemesi sırasında pik genişlemesi nedenleri

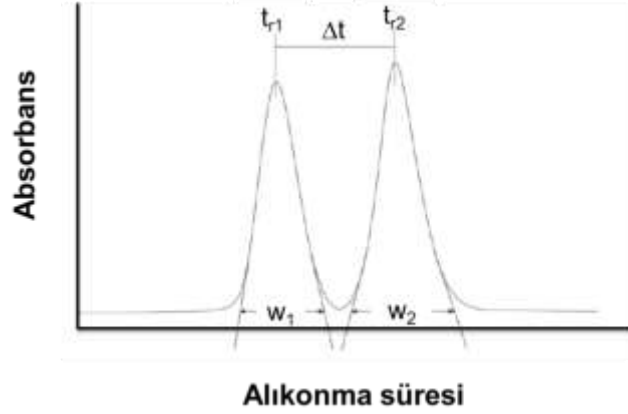
2.8a'da analitlerin kolona enjeksiyon anı görülmektedir. Enjeksiyon anında, kolona girmeden önce, analitler enjeksiyon hattında küçük de olsa belirli bir hacimde bulunurlar. Bu hacim ekstra bir pik genişlemesine yol açsa da gözardı edilmektedir. 2.8b'de analitlerin kolon boyunca, bölgeler arasındaki derişim farkına

bağlı olarak meydana gelen, hareketini göstermektedir. Bu olay difüzyon prosesi olarak tanımlanmaktadır. Bu sırada oluşan pik genişlemesi süreye bağlı olarak artar; dolayısıyla yüksek akış hızlarında analitlerin kolonda kalma süreleri azalacağından pik genişlemesi de azalmış olur. 2.8c'de Eddy difüzyonu gösterilmektedir. Eddy difüzyonu ile partiküller arasında hareketlenen analitler şekildeki gibi bir dağılım göstererek pik genişlemesine neden olur. Bu hareket, hareketli faz akış hızından bağımsız olup; eğer kolon düzgün ve homojen biçimde dolgulanmış ise azalmakta böylece pik genişlemesi de buna bağlı olarak önlenmiş olmaktadır. 2.8d'de gösterilen hareketli faz kütle aktarımı hareketli faz akış hızının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Kolondaki partikül çapına, kolon çapına ve akış hızına bağlı olarak değişir. Yüksek akış hızlarında, hareketli faz çok daha hızlı kolondan geçeceğinden, hareketli faz içerisinde kalan ve onunla birlikte kolondan çıkan analitler pik genişlemesine neden olmaktadır. 2.8e'de sabit faz kütle transferi görülmektedir. Analitlerin absorpsiyonu ve desorpsiyonu için gerekli süre ile doğrudan orantılıdır. Bazı analitler partikül gözeneklerine difüzlenerak kolonda daha fazla zaman geçirip kolonu geç terkederken; bazı analitler için bu süre daha kısa olur ve daha önce kolondan çıkarlar. Bu olay hareketli faz akış hızı ile doğrudan orantılıdır. Son olarak 2.8f'de analitler detektöre ulaşır. Sonuç olarak; kolon uzunluğunun artmasıyla ve hareketli fazın akış hızının artmasıyla pik genişliği artmaktadır. Bunun tam tersi olan durumlarda pik genişliği daralır ve sivrilir. İdeal bir bant dar ve sivri olmalıdır [75].

Pik çözünürlüğü: Ardışık iki pikin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığını gösteren önemli bir parametredir. Kromatografik analiz sonucu elde edilen iki ardışık pik için çözünürlük değeri,

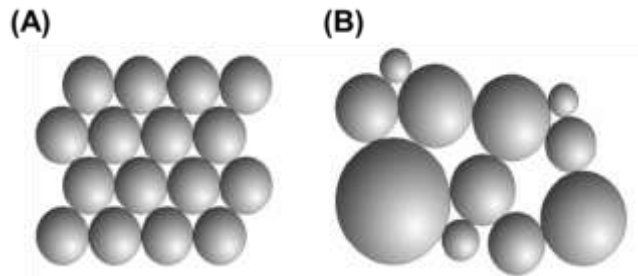
$$R = 2 \times [(t_{r2}) - (t_{r1})] / (W_1 + W_2) \quad (2.5)$$

Eşitliği ile hesaplanır. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi, 1. pikin 2. pike göre (2/1) çözünürlük değeri hesaplanmasında, (t_{r1}) ve (t_{r2}) noktaları sırasıyla 1 ve 2 pikleri için alıkonma zamanlarını göstermektedir. W_1 ve W_2 ise yine sırasıyla 1 ve 2 pikleri için taban genişliğini ifade etmektedir. Başarılı bir kromatogramda pik çözünürlük değerlerinin $R \geq 1.5$ olması istenir [73,77].



Şekil 2.9. İki ardışık pik için çözünürlük değerinin hesaplanmasında kullanılan pik taban genişliklerinin ve alıkonma sürelerinin gösterimi [73]

Kolon Geçirgenliği: Kromatografik kolonların akışa karşı gösterdiği direnci tanımlamaktadır. Partikül dolgulu kolonlarda olması gereken en önemli özellik partikül boyutunun eş ve partiküllerin kolon içerisine homojen şekilde doldurulmuş olmasıdır. Monodispers (eş boyutlu) partiküller ile doldurulmuş kolonlarda polidispers (farklı boyutlu) partiküller ile doldurulmuş kolonlara kıyasla, kromatografik analizde daha düşük kolon basıncı ve daha yüksek kolon verimi elde edilmektedir. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi polidispers partikül dolgulu kolonda büyük ve çok sayıda boşluklar oluşmakta, bu da kolon verimini olumsuz şekilde etkilemektedir. Aynı zamanda kolon tekrarlanabilirliğinin yüksek olması için de partiküllerin eş boyutlu olması ve kolona düzgün ve homojen şekilde dolgulanması gerekmektedir [78,79].



Şekil 2.10. Kolona dolgulanmış (A) Monodispers (B) Polidispers partiküllerin görünümü [80]

Kolon geçirgenliği, kolondaki hareketli faz akış hızı ve basınç düşmesi değerleri kullanılarak Darcy eşitliği (Eşitlik 2.6) ile hesaplanmaktadır [80].

$$v = \frac{\Delta P \cdot K_0 \cdot r^2}{\eta \cdot L} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikte K_0 (m²); kolon geçirgenliğini, v (m³/s); hareketli fazın akış hızını, η (Pa.s); hareketli fazın viskozitesini, L (m); kolon uzunluğunu, ΔP (Pa); kolonun geri basıncını ve r (m); kolonun i çapını ifade etmektedir [80]. Eşitlikten de görüldüğü gibi geçirgenlik, kolon boyutuna ve kolon basıncına bağlıdır. Kolon basıncını düşürebilmek için hareketli faz olarak düşük viskoziteli organik bir czc kullanılır [81,82].

Tekrarlanabilirlik: Kromatografi çalışmalarında aynı koşullar altında alınmış olan ölçümlerdeki değişim olarak tanımlanmaktadır. Analiz şartlarından, kromatografik sistemden veya kolon dolgu materyalinin sentezinden kaynaklanabilecek olan nedenlerden dolayı tekrarlanabilirlik analizlerinde farklı sonuçlar alınabilmektedir. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde analizden analize tekrarlanabilirlik, farklı günlerde yapılan günden güne tekrarlanabilirlik veya aynı koşullarda sentezlenen kolonlar ile kolondan kolona tekrarlanabilirlik olmak üzere farklı şekillerde tanımlanabilmektedir. Tekrarlanabilirlik, Eşitlik 2.7, 2.8, 2.9 yardımı ile hesaplanmaktadır.

$$RT_n = \frac{\sum N_i RT_i}{\sum N_i} \quad (2.7)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (RT_i - RT_n)^2}{(\sum N_i - 1)}} \quad (2.8)$$

$$\% BSS = \frac{SD}{RT_n} \quad (2.9)$$

Tekrarlanabilirlik, bağıl standart sapma, (BSS) ile ifade edilir ve elde edilen değerin % 4'ün altında olması istenir [83]. Eşitlikte RT_n ; farklı analizler için belirli bir analit ile elde edilen sayıca ortalama alıkonma süresi, SD; standart sapma, BSS; bağıl standart sapma, N_i ; analiz sayısını, RT_i ise i no'lu analitin alıkonma süresini ifade etmektedir.

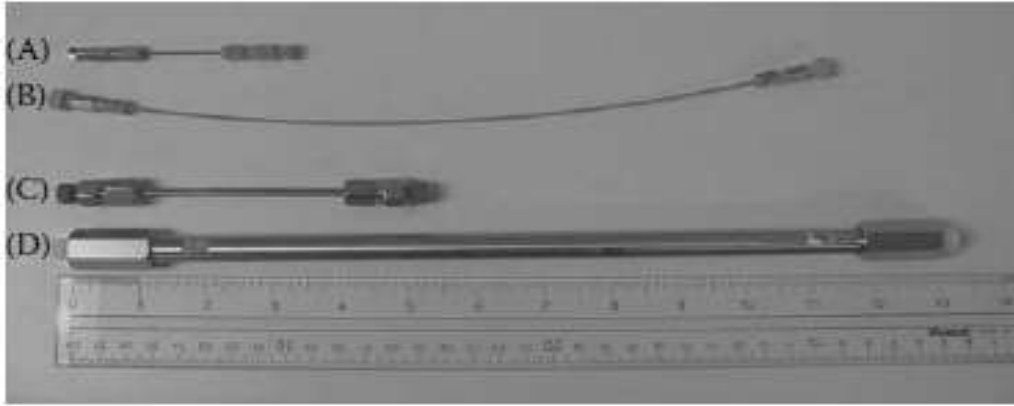
2.1.4. Sıvı Kromatografisi Sistemleri

Sıvı kromatografisinin geliştirilmekte olan formları, Nano-sıvı kromatografisi, Mikro-sıvı kromatografisi ve Kapiler Elektrokromatografi şeklinde sıralanabilir. Bu kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması kolon iç çapı, hareketli faz akış hızı ve kolon ayırma verimi dikkate alınarak yapılmaktadır. Sıvı kromatografik yöntemleri bu özelliklerine göre listeleyen sınıflama Çizelge 2.1'de verilmektedir. Burada, HPLC'nin geliştirilmiş formları olan 3 yöntemin (nano-sıvı kromatografisi, mikro-sıvı kromatografisi ve kapiler elektrokromatografi) klasik HPLC'ye kıyasla teorik kademe sayısı veya kademe yüksekliği şeklinde ifade edilen ayırma verimi yönünden çok daha iyi olduğu görülmektedir. Kolon ayırma verimi genellikle kolonun birim uzunluğundaki teorik kademe sayısı veya kademe yüksekliği cinsinden ifade edilmektedir. Çizelge 2.1'den görüldüğü gibi teorik kademe sayısının yüksek veya kademe yüksekliğinin düşük olması, kolon ayırma veriminin yüksek olması anlamına gelmektedir. Şekil 2.11'de sıvı kromatografisi sistemlerinde kullanılan kolonlar gösterilmektedir.

Kolon verimini yüksek olması kromatografik analizin kısa sürede yüksek pik çözünürlüğü ile yapılabilmesini sağlamaktadır. Yüksek kolon verimi eldesi sağlayan en iyi yöntem kapiler elektrokromatografi de elektroosmotik akışa bağlı olarak, iyonize gruplar içeren bileşiklerin tayininde sorunlar yaşanması, nano-kromatografide ise akış yolunun darlığı nedeniyle oluşan tıkanma problemleri bu sistemlerin günümüzde yaygınlaşmasına engel oluşturmaktadır. Bu nedenle kapiler kromatografi, nano-sıvı kromatografisi ve elektrokromatografiye göre daha yaygın kullanımda olan ileri yöntem, mikro-sıvı kromatografisidir [66,84].

Çizelge 2.1. Sıvı kromatografisi türlerinin kolon boyutu, hareketli faz akış hızı ve kolon ayırma verimi yönünden karşılaştırılması

Sistem	Kolon iç çapı (mm)	Hareketli faz akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$)	Teorik kademe sayısı (kademe/m)	Kademe yüksekliği (μm)
Klasik HPLC	2.0-10.0	200-10000	5.000-50.000	20-200
Nano-sıvı kromatografisi (Nano-LC)	0.01-0.15	0.01-0.10	10.000-100.000	1-100
Mikro-sıvı kromatografisi (kapiler ve semi-mikro-LC dahil)	0.10-2.00	0.1-200	10.000-100.000	10-100
Kapiler elektrokromatografi (CEC)	0.05-0.1	Elektroosmotik akış	100.000-500.000	2-10



Şekil 2.11. HPLC ve μHPLC sistemlerinde kullanılan kolonların karşılaştırılması
A) Nano-akış μHPLC kolonu 100 μm i.d. x 5 cm B) Kapiler μHPLC kolonu 75 μm i.d. x 25 cm C) paslanmaz çelik μHPLC kolonu 1 mm i.d. x 10 cm D) paslanmaz çelik HPLC kolonu 7.5 mm i.d. x 30 cm [66]

2.2. Mikro Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), hem akademik hem de ticari alanda analitik laboratuvarlarında kullanılan standart bir ayırma tekniği haline gelmiştir. Ancak HPLC sisteminin yüksek miktarda solvent tüketimi, fazla miktarda örnek kullanımı, algılama duyarlılığının düşük olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Mikro-sıvı kromatografisi, klasik yüksek performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) alternatif olarak geliştirilen, düşük hacimli hareketli faz kullanımı ve 0.5-2.1 mm arasında kolon içi çapına sahip kolonlar ile çalışma imkanı sunan, hızlı ve yüksek çözünürlüklü kromatografik analizi hedefleyen yeni sıvı-kromatografisi yöntemlerinden biridir.

İlk olarak 1967'de mikro sıvı kromatografisi, Horvath ve arkadaşları tarafından kullanılmaya başlanmış ve 0.5-1.0 mm iç çapa sahip paslanmaz çelik kolonlara doldurulmuş 30 μm boyutundaki partiküller ile nükleotidlerin ayırımı gerçekleştirilmiştir [86-88]. Nükleotidlerin hızlı ayırımına rağmen büyük boyuttaki partiküller ile doldurulmuş kolonlarla yapılan çalışmalarda düşük verim elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle daha sonraki yıllarda birçok araştırma grubu kolon ve partikül boyutunun küçültülmesi, kolon malzemesi ve sabit faz sentezi hakkında çeşitli çalışmalarda bulunmuşlardır. Ishii ve arkadaşlarının Teflon tüplerde (0.5 mm i.d.) sentezledikleri dolgulu kapiler HPLC kolonunu analitik uygulamalarda kullanıp, sonuçları mikro akış detektörleriyle izlemeleri kromatografide dolgulu kapiler kolon kullanımının temelini oluşturmaktadır [66]. Scott ve arkadaşları 1 mm iç çapına sahip kolonlar kullanarak yüksek verimli kromatografik sonuçlar elde etmişler, mikro sıvı kromatografisi cihazının tasarımına, kolon dolum prosedürlerinin geliştirilmesine ve sistem çalışma koşullarını optimize etmeye yönelik çalışmalarda bulunmuşlardır [66]. Novotny ve ekip arkadaşları kolon iç çapını 50-200 μm ye düşürerek kolonu, 10-100 μm çapa sahip partiküller ile doldurmuşlardır. Daha sonra yaptıkları çalışmalar ile 30 μm çapa sahip partiküller ile doldurulmuş 70 μm iç çapa sahip kolonlar kullanılarak yüksek basınca gerek duyulmadan yüksek verim elde edilebilir olduğunu göstermişlerdir. [66,85].

2.3. Kolon Teknolojisi

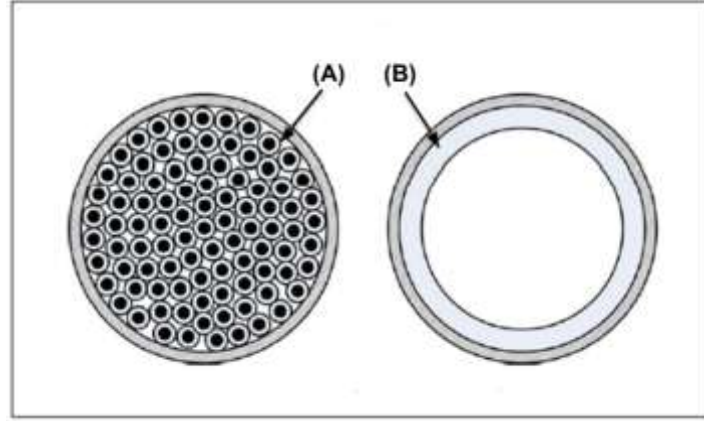
2.3.1. Kolonların Sınıflandırılması

Mikro sıvı kromatografisinin en önemli parçası örnek analitlerinin kromatografik ayrımının gerçekleştirildiği yer olan kolonlardır. Kolonların birbirleriyle karşılaştırmaları ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi, termodinamik ve kinetik özellikleri göz önünde tutularak yapılmaktadır. Alıkonma faktörü, k , seçicilik, α ve pik asimetrisi gibi parametreler kolonların termodinamik; kademe yüksekliği, h , geçirgenlik ve ayırma verimi gibi parametreler ise kolonların kinetik özelliklerinin bir göstergesidir. [89].

Mikro sıvı kromatografisinde kullanılan kolonlar, iç çaplarına ve kolonlardan geçen hareketli fazın akış hızlarına göre 4 sınıfa ayrılırlar. Bunlar Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi mikrobör kolonlar (1-2 mm i.d.), dolgulu kapiler kolonlar (0.1-0.5 mm i.d.), semi dolgulu kapiler kolonlar (0.02-0.1 mm id.) ve açık tübüler kapiler kolonlardır (0.01-0.075 mm i.d.) [85]. Şekil 2.12'de dolgulu ve açık tübüler kolonların kesit görüntüleri verilmektedir.

Çizelge 2.2. Mikro-LC kolonlarının genel özellikleri [90,94]

Tür	Uzunluk (m)	İç çap (mm)	Akış hızı ($\mu\text{L}/\text{dk}$)
Mikro-bör	0.1-1	1-2	5-200
Dolgulu Kapiler	0.1-2	0.1-0.5	0.1-20
Semi Dolgulu Kapiler	1-100	0.02-0.1	0.1-2
Açık Tübüler	1-100	0.01-0.075	0.05-2



Şekil 2.12. (A) Dolgulu (B) Açık tübüler kolonların kesit görüntüleri [93].

2.3.1.1. Açık Tübüler Kolon (OTC)

Açık tübüler kolonlar, 10-20 μm iç çapa sahip silika kapiler kolon iç yüzeyi 1 μL kadar kalınlıkta sıvı ile kaplanmış kolonlardır. Bu tür kolonlardaki basınç düşüşü ihmal edilebilir düzeyde olduğundan boyları çok uzundur. (10-100 m). Kapiler kolonlarda 0.1-1.5 mm kalınlığında uçucu olmayan sıvı tabaka ince bir film halinde kolon çeperlerine emdirilir. Üç tipi vardır:

1. WCOT (Wall-Coated Open Tubular): Sıvı faz ince film halinde iki ucu açık tüp şeklindeki kolonun çeperlerine kaplanmıştır.
2. SCOT (Support-Coated Open Tubular) : Sıvı faz ince film halinde destek katısı üzerine emdirilerek kolona doldurulmuştur.
3. FSOT (Fused-Silica Open Tubular): Kuartz kullanılarak yapılmıştır.

Bu kolonlar ilk kez 1957'de gaz kromatografisinde (GC) kullanılmış, yaklaşık 20 yıl sonra da sıvı kromatografisinde kullanılmaya başlanmıştır. Kolon sentezi için monomer ve monomer miktarına göre daha az miktarda çapraz bağlayıcı içeren monomer çözeltisi, başlatıcı ve çözücü ile birlikte kolona basınç altında enjeksiyon edilir ve in-situ polimerizasyon yöntemi ile uygun sıcaklıkta polimerizasyon gerçekleştirilir. Sıcaklık, polimerizasyon süresi ve kolon iç yüzeyi gibi parametreler bu tür kolonların kromatografik performansını önemli ölçüde (örn: alıkonma faktörü) etkilemektedir [91,92].

Kennedy ve Jorgenson hücre analizi için açık tübüler kolonları etkili bir şekilde

kullanmışlardır. Kolonlarda az miktarda örnek kullanımı gereksinimi, sabit fazın örnek bileşenlerini iyi çözmesi ve kullanılan detektörlerin bu kolonlar için iyi duyarlılıkta olmaları, hücre analizinin başarılı yapılabilmesini sağlamaktadır. Saito ve arkadaşları açık tübüler kolonların kullanımı üzerine çalışmıştır [66]. Yapılan çalışmalar kolonların etkili bir şekilde kullanılabilmesi için kolon iç çapının 10 µm'den küçük olması gerektiğini göstermiştir. Bu boyutlara sahip kolonlar ile çalışmak güç olduğundan, 1990'lardan sonra bu kolonlar ile yapılan çalışmalar giderek azalmıştır [66].

2.3.1.2. Semi-Dolgulu Kapiler Kolonlar

Semi-dolgulu kolonlar, mikro kapiler kolonlardır ve ilk kez Tsuda ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [95,96]. Bu tür kolonlar 10-100 µm çapındaki dolgu materyalinin silika kaplier tüplere doldurulmasıyla hazırlanmaktadır. Kapiler kolonların iç çapları, dolgu materyalinin boyutlarının yaklaşık 2 veya 3 katı olmalıdır (50-200 µm). Sentezlenen tüm kolonlar ile yüksek çözünürlükte kromatografik ayrımlar elde edilse de, yüksek kademe yüksekliği değeri ve uzun analiz süreleri nedeni ile fazla tercih edilmemektedir [97,98].

2.3.1.3. Dolgulu Kapiler Kolonlar

Dolgulu kolonlar, hazırlanışının kolay olmasından ve açık tübüler kolonlara göre üstünlüklerinin bulunmasından dolayı tercih edilen kolonlardır [97]. Mikro-sıvı kromatografisinde kullanılan dolgulu kapiler kolonlar, genellikle alkilenmiş silika partikülleri veya in-situ polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen polimerik materyali sabit faz olarak kullanan kolonlardır [66]. Literatürde, dolgulu kapiler kolonların sentezi, kapiler kolon ve geleneksel kolonların karşılaştırılması, monolitik kolonlarda sabit faz olarak kullanılan organik polimerler, mikrobor ve monolitik kapiler kolonlarının kromatografik verimlerinin karşılaştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır [99].

Dolgulu kapiler kolonların, mikro sıvı kromatografisinde tercih edilmelerinin çok çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Bu tür kolonların tercih nedenleri arasında

dolumlarının kolay olması, daha uzun kolon boylarının kullanılabilir olması ve kolon dolgu materyali boyutunun 5 mikrona kadar çıkması ile halen düşük kademe yüksekliği değeri ve yüksek teorik kademe sayısı değeri (100.000 plaka/m) elde edilebilmesi, yapıldığı silika malzemenin geleneksel kolonların yapıldığı paslanmaz çelik malzemesine göre avantajları bulunmasıdır [66]. Açık tübüler kolonlar ile karşılaştırıldıklarında 5 mikron boyutunda dolgu materyali ile doldurulmuş 15 mikron iç çapa sahip kolonlarla bile çalışma imkanının bulunması, dolgu materyalinin çeşitliliği ve örnek yükleme kapasitesinin fazla oluşu yönünden dolgulu kapiler kolonların üstünlükleri bulunmaktadır. Fakat açık tübüler kolonlara kıyasla düşük geçirgenlik özelliklerinin bulunması bazı analizlerin yapılmasını zorlaştırmaktadır [66]. Dolgulu kapiler kolonlar ile yapılan çalışmalar kolon ve dolgu materyalinin boyutlarının küçültülmesine yönelik çalışmalardır. Kennedy ve Jorgenson kolon iç çapını 20-50 μm 'ye; daha sonra Hsieh bu değeri daha da düşürerek (12-33 μm) başarılı ve verimli kromatografik sonuçlar elde etmişlerdir [100].

2.3.1.4. Mikrobor Kolonlar

HPLC'de kullanılan 4-5 mm iç çapa sahip dolgulu kolonlara karşılık, 1979'da Scott ve Kucera 0.5-2 mikron iç çapa sahip mikrobor kolonlar ile daha verimli sonuçlar elde edildiğini göstermişlerdir [101]. Çalışmada kullanılan kolonlar paslanmaz çelikten yapılmış olup; kolon başında ve sonunda, enjeksiyondan kolona veya kolondan detektöre gidebilecek safsızlıkları önlemek amacıyla 2 mikron çapında gözeneklere sahip fritler kullanılmıştır. Mikrobor kolon kullanımı özellikle az miktarda çözücü kullanımı yönünden önemli fayda sağlamaktadır. Geleneksel HPLC kolonlarında yüksek kolon verimi elde edebilmek için uzun kolonlara ihtiyaç vardır; ancak analiz süresi kolon uzunluğuna bağlı olarak artmaktadır. Scott ve Kucera, yaptıkları çalışmalar ile 10 μm çapa sahip silika partiküller ile doldurulmuş kolonlarda 20 μm 'nin altında plaka sayısının elde edilemediğini göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, optimum boyutlarda mikrobor kolon kullanımı ile çok düşük kademe yüksekliği değerlerine ulaşıldığını ve bu nedenle kompleks bileşiklerin ayrımındaki uzun analiz sürelerinin tolere edilebilir olduğunu vurgulamışlardır [101]. Bu çalışma ile birlikte mikrobor kolon tasarımına ve kullanımına yönelik

çalışmalar literatüre girmeye başlamıştır [102,103]. Günümüzde özellikle mikrosıvı kromatografisi için geliştirilen mikrobor kolonlar (diğer adı ile “mikrokolonlar”) ticari kataloglarda yaygın bir şekilde yerlerini almışlardır

2.3.2. Mikrobor Kolon Tasarımı

Kolon boyutlarını küçültmek kromatografik analizlerde pratik ve teorik açıdan avantajlar sağlamaktadır. Bu nedenle kolon tasarımı yaparken bazı önemli parametreler göz önünde bulundurulmalıdır. Kolon uzunluğu (L), kolon çapı (r), partikül çapı (d_p), gözeneklilik (ϵ), kullanılacak olan hareketli faz doğrusal akış hızı (u) kolon tasarımı sırasında dikkat edilmesi gereken önemli hidrodinamik parametrelerdir. Kolon verimliliğini gösteren kademe yüksekliği (Height Equivalent to Theoretical Plate, h) ve teorik kademe sayısı (N) ise kinetik parametrelerdir. Başarılı bir kromatografik ayırım için, kullanılan kolonun tasarımı, tüm bu parametreler düşünülerek yapılmalıdır [104].

Kolon uzunluğunu sabit tutarak kolon çapını azaltmak, toplam kolon hacminde değişime neden olacaktır. Toplam kolon hacmi, partiküller arası ve partikül gözenek boşluklarının hacmi ile kolona doldurulmuş partiküllerin hacminin toplamını ifade etmektedir. Kolon içerisindeki boşluk hacmi kolon toplam hacmine bölündüğünde kolon gözenekliliği (ϵ) elde edilmektedir [104]. Kolon giriş ve çıkışına kütle denkliği uygulandığında hareketli faz hacimsel akış hızının (F) (mL/s), hareketli faz doğrusal akış hızına (u) (cm/s), kolon gözenekliliğine (ϵ) ve kolon çapına (r) bağlı olduğu anlaşılmaktadır [104]. (Eşitlik 2.9)

$$F = u \pi r^2 \epsilon / 4 \quad (2.9)$$

Analitin kolondaki alıkonma hacmi (V_R), kolon çapının karesine ve analitin kolondaki alıkonma süresine (t_R) bağlı olarak değişmektedir. Eşitlik 2.10'da görüldüğü üzere kolon çapı küçüldükçe hareketli faz akış hızı azalacağından analiz süresince kullanılan hareketli faz miktarı da azalacaktır [104].

$$V_R = F t_R = u \pi r^2 \varepsilon t_R / 4 \quad (2.10)$$

Çizelge 2.3'te 50 cm uzunluğunda farklı kolon iç çap uzunluklarına sahip kolonlar verilmektedir. Burada görüldüğü gibi kolon iç çap uzunluğu küçüldükçe hareketli faz kullanım miktarı % 98 oranında azalmaktadır.

Çizelge 2.3. Farklı iç çap uzunluğuna sahip kolonlar için hareketli faz kullanımı [104]

Kolon iç çapı (mm)	Akış hızı (mL/dk)	% Hareketli faz kullanımı
4.6	1.00	100.0
2.0	0.19	18.9
1.0	0.05	4.7
0.7	0.02	2.3
0.5	0.01	1.2

Kolon giriş-çıkışında oluşan basınç farkı (ΔP), Darcy Eşitliğine göre, hareketli faz doğrusal akış hızına (u), kolon uzunluğuna (L) ve hareketli fazın viskozitesine (η) bağlıdır [104]. (Eşitlik 2.11)

$$\Delta P = u \eta L / K_0 \quad (2.11)$$

Burada K_0 sabittir.

Synder, kolon verimini gösteren kademe yüksekliğini (h) Eşitlik 2.12 ile açıklamaktadır.

$$HETP = C u^{0.4} d_p^{1.8} \quad (2.12)$$

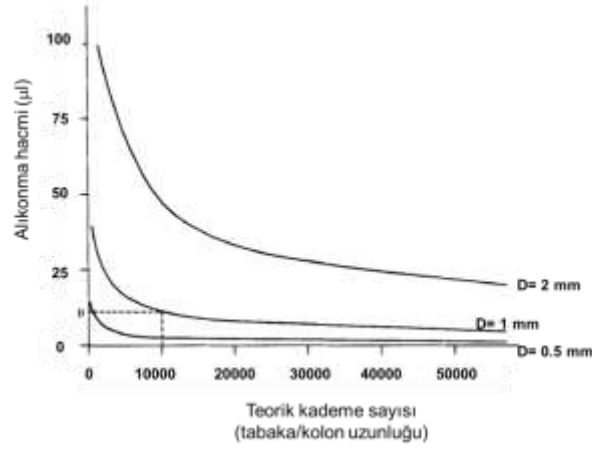
Burada C analit türüne özgü bir sabittir.

2.10, 2.11, 2.12 eşitliklerinin birleştirilmesi ile ortaya çıkan Eşitlik 2.13 kolon veriminin (N) ve analiz süresinin (t_R) hangi parametrelerle değiştiğini göstermektedir.

$$N/t_R = K_0 \Delta P / \eta L C u^{0.4} dp^{1.8} (1+k') \quad (2.13)$$

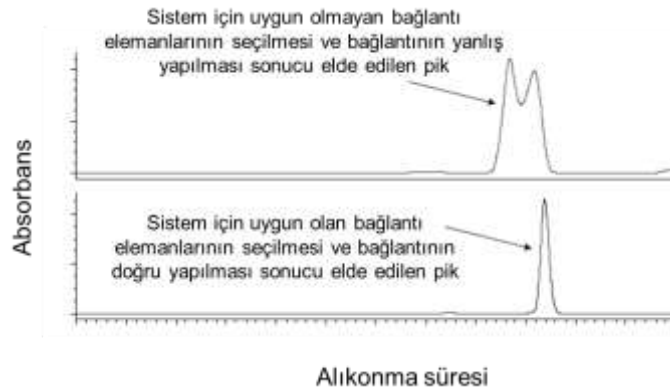
Buada k' analit kapasite katsayısı olarak tanımlanmaktadır [104]. Eşitlik 2.13'e bakıldığında, düşük viskoziteye sahip hareketli faz ile çalışılan yüksek basınçlı sistemlerde, çapları oldukça küçük partiküllerin sabit faz olarak kullanıldığı kısa kolonlar ile daha kısa analiz süresinde daha yüksek verimli ayırma elde edilebileceği görülmektedir [104].

Analiz süresini ve verimliliği etkileyen diğer bir parametre ise sistemde oluşan ölü hacimdir. Sistemde oluşan ölü hacim, analitlerin kolondan dedektöre ulaşması için gereken süreyi yani analitlerin alıkonma sürelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Ölü hacim kolon çapına, kolon uzunluğuna ve toplam kolon gözenekliliğine bağlı olarak değişmektedir. Ölü hacmi azaltmak için kolon çapı ve kolon uzunluğu azaltılmalıdır. Ancak kolon uzunluğu azaldıkça analiz sonucunda elde edilecek piklerdeki band aralığı artacaktır. Bu nedenle pik band aralığının genişlemesini önlemek için kullanılacak dedektör hücre hacmi de azaltılmalıdır. Kirkland ve arkadaşları yaptıkları çalışmada detektör hücre hacminin analitlerin alıkonma hacminin 1/10'i kadar olması durumunda pik band genişlemesinin önlendiğini göstermişlerdir. Çalışmada elde ettikleri, Şekil 2.13'te gösterilen grafiğe bakıldığında 50 cm uzunluğundaki bir kolonda, detektör hücre hacminin analitlerin alıkonma hacminin 1/10'i olduğu durumlarda, kolon iç çapı küçüldüğünde daha düşük analit alıkonma hacminde daha yüksek verim elde edildiği görülmektedir. Yapılan çalışmanın sonucunda 50 cm x 1 mm i.d. boyutlarında bir kolon kullanarak yapılan kromatografik analizde 11 μ L alıkonma hacmine sahip bir analit için 10000 teorik kademe sayısı elde etmek isteniliyorsa detektör hücre hacminin yaklaşık 1 μ L olması gerektiği belirlenmiştir [104].



Şekil 2.13. Farklı iç çapa sahip kolonlar için alıkonma hacminin teorik kademe sayısı ile değişimi (L= 50 cm) [104]

Hareketli faz kaçaklarını ve bu nedenle oluşan pikleri önlemek için pompanın çıkışı-kolon giriş ve kolon çıkışı- detektör girişi arasındaki bağlantıların dikkatli yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bağlantı elemanlarının hareketli fazdan etkilenmeyen, yüksek basınçlara dayanıklı ve kullanılan sisteme uygun boyutlara sahip olması gerekmektedir. Sistem için uygun olmayan bağlantı elemanlarının seçilmesi ve bu bağlantı elemanlarının sisteme yanlış monte edilmesi bağlantı noktalarında ölü zamanlara ve bunlar da Şekil 2.14'te gösterildiği gibi pikin şeklinde bozunma ve kolon veriminde düşüğe neden olmaktadır [69].



Şekil 2.14. Bağlantı noktalarında oluşan ekstra hacimlerin kromatografik analiz sonucu elde edilen piklere etkisi. Üst kromatogram: Yanlış yapılan bağlantı sonucu elde edilen pik, Alt kromatogram: Doğru yapılan bağlantı sonucu elde edilen pik [69].

2.4. Partikül Bazlı Sabit Fazlar

Sıvı kromatografisi konusunda yapılan çalışmaların çoğu yeni bir sabit faz sentezine yöneliktir. 1950'li yıllarda sabit faz olarak kullanılan partiküllerin şekilleri bozuk ve boyutları 50-100 mikron arasında değişirken; günümüzde küre biçiminde, eş boyutlu ve 5 mikron veya daha küçük boyutlu partikül sentezi giderek yaygınlaşmıştır [106].

Kromatografik analizin yüksek verimlilikte gerçekleşebilmesi için partikül boyutunun küçük olması kadar partikül yüzey alanının da yüksek olması gerekmektedir. Yüksek yüzey alanı, partikül gözenekliliği ve gözenek boyutu ile doğru orantılı olarak değişmektedir [106]. Partikül yüzey alanının gözenek boyutu ile değişimi Çizelge 2.4'te verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi, mikrogözenekli partiküllerde yüzey alanı yüksektir; ancak bu partiküllerde gözenek boyutundan dolayı analitin gözenek içi difüzyonu yavaşlamakta bu da alıkonma süresini etkilemekte ve analiz sonucunda piklerde bant genişlemesi görülmektedir [106].

Çizelge 2.4. Partikül yüzey alanının partikülün ortalama gözenek boyutu ile değişimi [107]

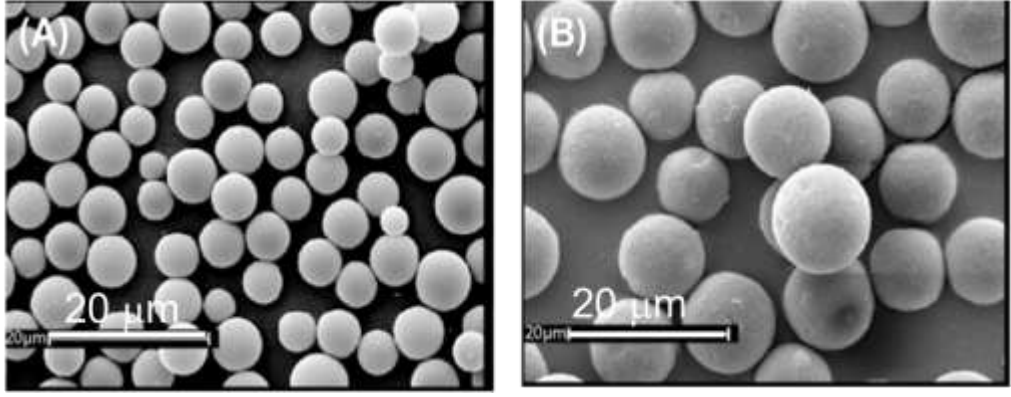
Partikül yüzey alanı (m ² /g)	Ortalama gözenek boyutu (nm)
<500	2 (mikrogözenek)
50-500	2-50 (mezogözenek)
<50	>50 (makrogözenek)

Partikül bazlı sabit fazlar, polimerik partikül bazlı ve silika partikül bazlı sabit fazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Gözenekli silika partiküller sıvı kromatografisinde yaygın kullanılan sabit fazlardır. Klasik sol-jel metodu ile sentezlenen silika partiküllere oktadesil grubu kovalent olarak bağlanarak elde edilen C18 grubu içeren silika bazlı partiküller HPLC kolonlarında kromatografik ayırım için kullanılmaktadırlar. Silika partiküllerin mekanik dayanımı yüksektir ve bu partiküller ile pH 2-8 aralığında rahatlıkla

çalışılabilmektedir [106]. Jorgenson, ilk kez ortalama partikül boyutu 1.5 µm olan silika bazlı kolonlar kullanarak küçük molekülü analitlerin ayrımını kısa zamanda yüksek verimde yapmayı başarmıştır [108]. Ancak gözenekli silika partiküllerin eş boyutlu üretimi zor olduğundan genellikle sentezlenen partiküllerin boyutları geniş aralıkta dağılım göstermektedir [80].

Polimerik partikül bazlı sabit fazlar iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve afinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [109]. Geniş pH aralığında kullanım olanakları, yüksek basınca dayanıklı olmaları, yüzey modifikasyonlarındaki çeşitlilik ve kolaylık polimerik partiküllerin en önemli avantajlarıdır [110,111]. Ng ve arkadaşları, 69 MPa basınca dayanıklı kopolimer partikülleri divinilbenzen'i (DVB) çapraz bağlayıcı olarak kullanarak gözeneksiz formda sentezlemişlerdir [80]. Dispersiyon polimerizasyonu ile hazırlanan partiküllerde hacimce %1-2 oranında çapraz bağlayıcı kullanımı ile partiküllerin mekanik dayanımının azaldığı görülmüştür [112]. Bu nedenle ilk aşamada polistiren mikroküreler hazırlanıp daha sonraki aşamada hacimce %20 oranında çapraz bağlayıcı eklenerek polimerizasyon iki aşamalı olarak yapılmış; polimerizasyon sonucunda yüksek mekanik dayanıma sahip polimerik partiküllerin elde edildiği görülmüştür [112-114]. Wang ve arkadaşları, eşboyutlu makrogözenekli polimerik partikülleri süspansiyon polimerizasyonu tekniğini kullanarak sentezlemişlerdir [115]. Yöntemde emülsiyon polimerizasyonu ile hazırladıkları gözeneksiz eşboyutlu partikülleri çözücü, monomer (stiren) ve çapraz bağlayıcı (DVB) ortamında şişirmişlerdir [115-118]. Polimerizasyon sonrası, eşboyutlu makrogözenekli bir yapının oluştuğu görülmüştür. Başka bir çalışma grubu, etilen dimetakrilat'ı (EDMA) çapraz bağlayıcı olarak kullanarak sabit faz olarak kullanıma uygun metakrilat bazlı partiküller sentezlemişlerdir [80]. Coupek ve arkadaşları, monomer olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak EDMA kullanarak gözenekli ve mekanik dayanımı yüksek hidrofilik partiküller elde etmişlerdir [80]. Yapılan çalışmalarda metakrilat bazlı gözenekli partiküllerin, mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak yani çıkış lateksinin sulu ortamda organik çözücülerle şişirilip gözenekli hale getirilmesi sonucu elde edildiği görülmüştür [119-120]. Şekil 2.15'te silika ve polimerik bazlı partiküllerin SEM görüntüleri verilmektedir .



Şekil 2.15. A) Silika ve B) Polimerik bazlı partiküllerin SEM görüntüleri [80]

Son yıllarda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) uygulamalarında polimerik partiküllerin önemi artmıştır. Çünkü bu partiküllerin silika bazlı olanlara göre avantajları vardır. Gözenekli ve eşboyutlu olarak sentezlenmesi ve türevlendirilmesi kolaydır. Ayrıca kimyasal kararlılığa sahip olması sebebiyle kromatografi çalışmaları için uygundur [80].

2.5. Polimerik Sabit Faz Sentezi

Polimerik sabit faz sentezi için kullanılan polimerizasyon reaksiyonları 5 başlık altında incelenebilir.

- Yığın Polimerizasyonu
- Çözelti Polimerizasyonu
- Süspansiyon Polimerizasyonu
- Emülsiyon Polimerizasyonu
- Dispersiyon Polimerizasyonu

Tez çalışmasında dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak çıkış lateksi sentezlenmiştir. Yöntemin detayları bölüm 2.5.1.'de verilmektedir.

2.5.1. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu, mikrometre boyutunda eşboyutlu polimerik

partiküllerin üretimi için kullanılmaktadır ve bu polimerizasyon yönteminde başlangıçta monomer fazı, dağıtma ortamında çözülmüş olarak bulunmaktadır. Ancak, homojen olan bu yapı polimerizasyon reaksiyonunun başlatılmasıyla birlikte oluşan hızlı çekirdeklenme sonucunda polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı yapıya dönüşmektedir [121]. Günümüze değin dispersiyon polimerizasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve eşboyutlu partikül üretimine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bu konudaki ilk çalışmalar Ugelstad ve grubu tarafından başlatılmıştır. Levy ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada ise 1-6 µm aralığında eşboyutlu polistiren partiküller elde edilmiştir [122]. Dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen partiküllerin molekül ağırlığı, boy ve boy dağılımı ve monomer dönüşümü aşağıdaki faktörlere bağlıdır [121]:

- Polimerizasyon sıcaklığı
- Karıştırma hızı ve şekli
- Dağıtma ortamının türü ve bileşimi
- Stabilizör türü ve derişimi
- Başlatıcı türü ve derişimi
- Monomer dağıtma ortamı hacimsel oranı

Dispersiyon polimerizasyonuna sıcaklığın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda 55-80 °C aralığında artan polimerizasyon sıcaklığı ile ortalama partikül boyutu ve boy dağılımında artışın olduğu; ayrıca artan sıcaklık ile polimerin molekül ağırlığında önemli bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir [123]. Dispersiyon polimerizasyonu sistemlerinde, yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi partiküllerde eşboyut özelliğinin bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olacağından genellikle düşük karıştırma hızlarında çalışılmaktadır [123].

Dispersiyon polimerizasyonunda ortalama boy ve boy dağılımını etkileyen bir diğer önemli değişken dağıtma ortamı türü ve bileşimidir. Dispersiyon polimerizasyonunda amaç mümkün olduğunca dar bir boy dağılımına sahip partiküllerin sentezlenmesidir. Kullanılan dağıtma ortamının polaritesi ve dağıtma ortamındaki monomer çözünürlüğü sonuç partiküllerinin boyutunu ve boy

dağılımını önemli ölçüde etkilemektedir. İdeal olarak seçilen bir sistemde monomer çözünürlüğünün yüksek, oluşan polimer çözünürlüğünün ise düşük olması istenmektedir [124,125]. Artan monomer/dağıtma ortamı hacimsel oranı ile ortalama partikül boyutu genelde artış gösterir; ancak bu oranın aşırı artışı ile sonuç partiküllerde önemli oranda boy dağılımı meydana gelmektedir.

Dispersiyon polimerizasyonunda genellikle dağıtma ortamında çözünebilen ve genellikle polimerik yapıda olan stabilizörler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda stabilizör derişiminin artmasıyla polimerik partiküllerin boyutlarının küçüldüğü gözlemlenmiştir [124,125]. Bu polimerizasyon yönteminde monomer fazında çözünen başlatıcı miktarının artması ile elde edilen partiküllerin boy dağılımında bir genişleme ve reaksiyon hızında bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir [126]. Başlatıcı derişiminin artması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalın oluşmasıyla açıklanabilir [126,127]. Ayrıca başlatıcı miktarıyla polimerin molekül ağırlığı arasında kuvvetli bir ilişki gözlemlenmiştir. Başlatıcı miktarı arttıkça polimerin molekül ağırlığı azalmaktadır. Bunun nedeni ise daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısılmasıdır [126,127].

2.5.2. Türevlendirilebilir Formda Eşboyutlu Partikül Sentezi

Genel olarak inert polimerik yüzeyleri türevlendirmek zordur. Ancak eşboyutlu polimerik partiküllerin yüzeyinde fonksiyonel grupların varlığı ligand bağlanması ya da biyolojik moleküllerin immobilizasyonu gibi uygulamalar için istenen bir durumdur. Literatürde eşboyutlu ve türevlendirilebilir formda polimerik partiküllerin sentezi genellikle stiren gibi bir hidrofobik monomer ile fonksiyonel grup içeren polar bir komonomerin kopolimerizasyonu ile yapılmaktadır. Bu şekilde yapılan kopolimerizasyonlarda genellikle akrilat bazlı fonksiyonel komonomerler kullanılmaktadır. Karboksil, hidroksil, amin, amid, aldehit veya klorometil fonksiyonel grupları sonuç ürünün monodispersitesi korunarak polimerik kürelerin yüzeyine bağlanabilir [128,129].

Literatürdeki bir çalışmada stiren monomeri, metil metakrilat, metakrilik asit,

akrilamid, hidroksietilakrilat, dimetilaminoetilmetakrilat ve polidimetilsiloksan gibi çeşitli fonksiyonel monomerler ile dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle kopolimerize edilmiştir [128]. Bu polimerizasyonlarda etanol dağıtma ortamı, azobisizobütironitril başlatıcı ve polivinilpirolidon ise stabilizör olarak kullanılmıştır. Böylece tek basamaklı bir proses ile 2.4-3.7 µm boyut aralığında eşboyutlu mikroküreler elde edilmiştir. Sonuçlar partiküllerin ortalama boy ve boy dağılımının komonomer türü ile değiştiğini göstermiştir [128].

Literatürde türevlendirilebilir formda eşboyutlu partiküllerin çok basamaklı polimerizasyon yöntemleriyle sentezine ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, emülsiyon yapıcı madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonuna dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde devam etmekte olan kopolimerizasyon sırasında ortamdaki partikül sayısı sabit tutularak, mevcut partiküllerin monomer-komonomer karışımı ile şişmesi sağlanmaktadır. Bu sayede polistiren-polimetakrilik asit (PS/PMAc), polistiren-polimetakrilat (PS/PMMA), polistiren-polihidroksietilmetakrilat (PS/PHEMA) ve polistiren-poliakrilik asit (PS/PAAc) eşboyutlu kopolimer mikroküreler sentezlenmiştir [130].

Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle de eşboyutlu gözenekli ve türevlendirilebilir formda partikül üretimi gerçekleştirilmiştir [129]. Yöntemde çıkış lateksi dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir ve elde edilen monodispers özellikteki bu partiküller fonksiyonel komonomer, monomer ve başlatıcı içeren bir organik faz ile oda sıcaklığında ve emülsiyon ortamında şişirilmiştir. İkinci basamakta şişmiş durumda olan çıkış lateksinin içerisinde fonksiyonel gruba sahip komonomerin polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Burada kullanılan fonksiyonel monomerin su içerisindeki çözünürlüğü azaldıkça elde edilen partiküllerin gözenek boyutunda da bir azalma gözlemlenmiştir.

2.5.3. Eşboyutlu ve Gözenekli Partikül Sentezi İçin Kullanılan Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Yöntemleri

Önceleri HPLC kolon dolgu materyali olarak polidispers, yani belli bir boy dağılımına sahip partiküller kullanılırken 1990'lı yıllardan itibaren eşboyutlu ve gözenekli partiküller kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü bu partiküller ile hazırlanmış kolonda, polidispers partiküllerle hazırlanmış kolonlara göre daha yüksek teorik kademe sayısı ve daha yüksek pik çözünürlükleri elde edilmiştir [131-133].

Gözenekli eşboyutlu polimerik partiküllerin sentezi ile ilgili ilk çalışmalar Ugelstad tarafından yapılmıştır [131]. Bu çalışmada 1-100 µm boyut aralığındaki gözenekli eşboyutlu partiküller, stirenin emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Elde edilen polistiren partiküller ilk önce dodesil klorür ya da dibütildifalate gibi düşük molekül ağırlığına sahip bir organik ajan ile şişirilmiştir. İkinci basamak şişirme prosesi monomer ve çapraz bağlayıcı içeren monomer faz emülsiyonunda yapılmıştır. Polimerizasyon 80°C'de ve Na₂S₂O₈'in başlatıcı olarak kullanıldığı ortamda gerçekleştirilmiştir. İnert organik bileşen ve monomer fazında şişirilen polistiren partikül yapısı içinde polimerizasyon gerçekleştirilerek ortalama boyutu 5 µm olan eşboyutlu partiküller elde edilmiştir. Cheng ise eşboyutlu ve gözenekli formda partikül sentezine yönelik çok basamaklı başka bir polimerizasyon yöntemi geliştirmiştir [134,135]. Bu yöntem dört temel basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta çıkış lateksi, stiren, divinilbenzen ve n-heptan içeren organik faz ile sulu emülsiyon ortamında şişirilmiştir. 2,2-azobis-2-metilbütironitril bu organik fazda çözülerek, ikinci kademe polimerizasyonunda başlatıcı olarak kullanılmıştır. Organik fazın sulu ortamda dağıtılması amacıyla, polivinilprolidon, aerosol-MA ve Polywet KX-3 dağıtıcılarını içeren bir emülsiyon yapıcı madde sistemi kullanılmıştır. Partiküllerin ikinci basamak polimerizasyonu sonucunda kremleşmeleri ve biraraya gelip toplanmalarını engellemek için şişirme oranı düşük tutulmuştur. Oda sıcaklığında ve çalkalamalı sistemde gerçekleştirilen organik faz ile şişirme işlemini ikinci basamak polimerizasyon işlemi takip etmiştir. Polimerizasyon, azot atmosferinde ve 70 °C sıcaklıkta yapılmıştır. Sonuç olarak, eşboyutlu polimerik partiküller, metilen klorür ile ekstrakte edilerek gözenekli formda elde edilmiştir.

Okubo tarafından ise eşboyutlu ve büyük boyutlu partiküllerin çapraz bağlı formda eldesi amacıyla iki basamaklı dinamik şişme adı verilen başka bir polimerizasyon yöntemi geliştirilmiştir [136]. Bu yöntem kapsamında önce dispersiyon polimerizasyonu ile 1.9 µm boyutunda eşboyutlu polistiren partiküller üretilmiştir. Partiküllerin şişirilmesi sulu ortamda başlatıcı içeren divinilbenzen ile yapılmıştır. İşlem homojen formda olan ve divinilbenzen içeren etanol-su ortamında başlamaktadır. Şişirme ortamına bir enjeksiyon pompası kullanılarak sürekli olarak sabit hızla su beslemesi yapılmaktadır. Böylece dağıtma ortamının polaritesi zamanla arttırılmaktadır. Divinilbenzenin dağıtma ortamından ayrılarak eşboyutlu partiküllerin geçişi sağlanmaktadır. Dinamik şişme yönteminde su besleme hızı ayarlanarak monodispersite korunmak suretiyle partiküllerin divinilbenzenle şişmeleri sağlanmaktadır. Şişirme işlemi sonrasında ikinci basamak polimerizasyonunda divinilbenzen partiküller içinde polimerleştirilmekte ve 4.3 µm boyutunda ve çapraz bağlı partiküller elde edilmektedir. Başlatıcı olarak benzoil peroksit ve stabilizör olarak polivinil alkol kullanılmaktadır. Polimerizasyon 70°C sıcaklıkta 24 saat süreyle ve çalkalamalı reaktörlerde gerçekleştirilmektedir.

Kromatografik uygulamaya yönelik makrogözenekli eşboyutlu partiküllerin sentezi için bir başka yöntem de Frechet ve arkadaşları tarafından önerilmiştir [132,133]. Bu yöntemde 1.1 µm boyutundaki eşboyutlu polistiren çıkış partikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile üretilmiştir. İki basamaktan oluşan bu yöntemde, çıkış partikülleri ilk basamakta lauril sülfat içeren sulu ortamda emülsifiye edilmiş, dibütil ftalat ile oda sıcaklığında sisirilmiştir. İkinci basamak şişirme işleminde ise öncelikle hacimce %50 stiren ve %50 divinilbenzen içeren monomer karışımı dibütil ftalat ile birlikte yine lauril sülfatın sulu çözeltisinde dağıtılır. Bu monomer karışımının içerisinde repolimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit de vardır. İlk basamak şişme işleminde elde edilen ve dibütil ftalat içeren polimerik partiküller ikinci basamakta hazırlanan emülsiyon ile tekrar oda sıcaklığında etkileştirilir. Organik fazın tamamının partiküllere transfer olmasının ardından elde edilen süspansiyon ortamına stabilizör olarak polivinil alkol ve ikinci basamak polimerizasyonunda yeni partikül oluşumunu engellemek için suda çözünen inhibitor olarak sodyum nitrat eklenmiştir. Monomer karışımının diluent varlığında partiküller içinde polimerizasyonu ile 7.4 µm boyutundaki eşboyutlu

partiküller çapraz bağlı formda sentezlenmiştir. Partiküller toluen ile ekstrakte edilmiş ve gözenekli yapının oluşması sağlanmıştır.

2.6. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi

2.6.1. Giriş

Hidrofilik etkileşim kromatografisi polar formda moleküllerin, hidrofilik ligand içeren sabit faz kullanılarak ayrılmasını sağlayan yeni bir kromatografik yöntemdir. Sıvı kromatografisi teknikleri içerisinde ters faz kromatografisi (reversed phase chromatography, RPC), iyon değişim kromatografisi (ion-exchange chromatography, IEC) ve büyüklükçe etkileşim kromatografisi (size exclusion chromatography, SEC) yöntemlerine göre geliştirilmiş en yeni kromatografik mod olma özelliğine sahiptir [137-140].

Ters faz kromatografisi (RPC), günümüzde sıvı kromatografisi yöntemleri arasında en yaygın kullanılan tekniktir. Ancak polar formda olan bileşiklerin ters faz kolonlarında analit ile sabit faz arasındaki polarite farkından ötürü düşük alıkonma süresine sahip olmaları bu tür bileşiklerin RPC ile ayrımını zorlaştırmaktadır. HILIC'te hidrofilik ligand içeren sabit faz kullanımı nedeniyle, sabit faz ile hidrofilik formdaki polar analitler arasında baskın bir etkileşim olmaktadır. Etkileşimin gücüne bağlı olarak analitler, en apolardan polara doğru artan sürelerde kolondan çıkmakta ve klasik kromatografik tekniklere kıyasla çok daha kolay ayrılabilir. Bunun yanı sıra normal faz sıvı kromatografisinde çözünemeyen polar analitlerin ayırımında ve ayrıca zwitteriyonik yapıda sentezlenebilen kolonlar kullanılarak hem iyonik etkileşim hem de hidrofilik etkileşim metodu ile ayrılabilen analitlerin ayırımında da kullanılmaktadır. Böylece HILIC, en yaygın kromatografik tekniklerden biri olan ters faz kromatografisine alternatif, polar analit tayinine yönelik yeni bir kromatografik yöntem olarak ortaya çıkmıştır [141-146]. Başlangıçta polar bileşen analizi için RPC'ye alternatif bir kromatografik teknik olarak ortaya atılan HILIC tekniğinin popüleritesi, tekniğin farklı türde analitlerin özellikle polar biyokimyasalların (karbohidrat, nükleotid, nükleosid, aminoasitler ve peptid türü moleküller) analizine uygulanması konusundaki esnekliğinin farkedilmesiyle önemli ölçüde bir artış göstermiştir [139, 147-157].

2.6.2. Tarihi

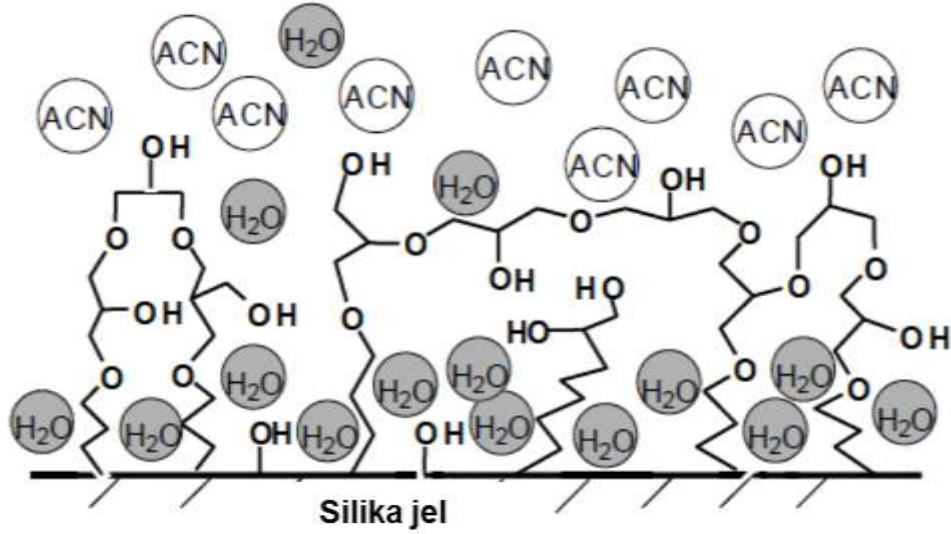
Özellikle karbohidrat türü moleküllerin analizine yönelik ilk çalışmalar, 40 yıl öncesinden yapılmış olmasına rağmen, hidrofilik etkileşim kromatografisi (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) kavramı ilk kez 1990 yılında Alpert tarafından tanımlanmıştır [150,158,159]. HILIC moduna göre yapılan ilk kromatografik çalışma 1975 yılında şekerin ve oligosakkaritlerin analizi olsa da hidrofilik sabit faz ile birlikte “düşük derişimde su içeren organik çözücü kullanımı” düşüncesi 1950'lere dayanmaktadır [150, 159,160]. Alpert ilk kez HILIC'in yaygın kullanılan tekniklerden farkını açıklayan düşünceler ortaya koymuştur [158].

Gregor, ilk kez hidrofilik sabit faz üzerinde su için zengin bir tabaka varlığını kanıtlamıştır [161]. 1975'te Linden ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada asetonitril/su hareketli fazı kullanılarak amino-silika bazlı sabit faz ile karbohidrat ayrımı gerçekleştirilmiştir [150]. Bunu takiben Rabel ve arkadaşları tarafından 1976'da yüksek asetonitril derişimi kullanılarak şekerlerin ayrımı HILIC modunda gerçekleştirilmiştir [159].

2.6.3. Mekanizması

Yöntem çoğunlukla, % 5-40 aralığında su içeren asetonitril bazlı (kısmen apolar) bir hareketli faz kullanılarak, iyonik gruplar içeren hidrofilik bir yüzeye sahip sabit faz ile, polar formdaki analitlerin kolon materyali ile aralarındaki hidrofilik etkileşim farkına bağlı olarak ayrılması prensibine dayanmaktadır [137].

HILIC'in ayırma mekanizması sabit fazın üzerindeki polar grupların hareketli fazdaki su moleküllerini kendilerine çekmeleri ve böylece yüzeyde bir hidrofilik bir tabaka oluşumu temeline dayanmaktadır (Şekil 2.16) Daha polar bileşikler sabit sulu tabaka ile daha güçlü etkileşim göstermekte ve kolonu daha geç terk etmektedir [141,144].

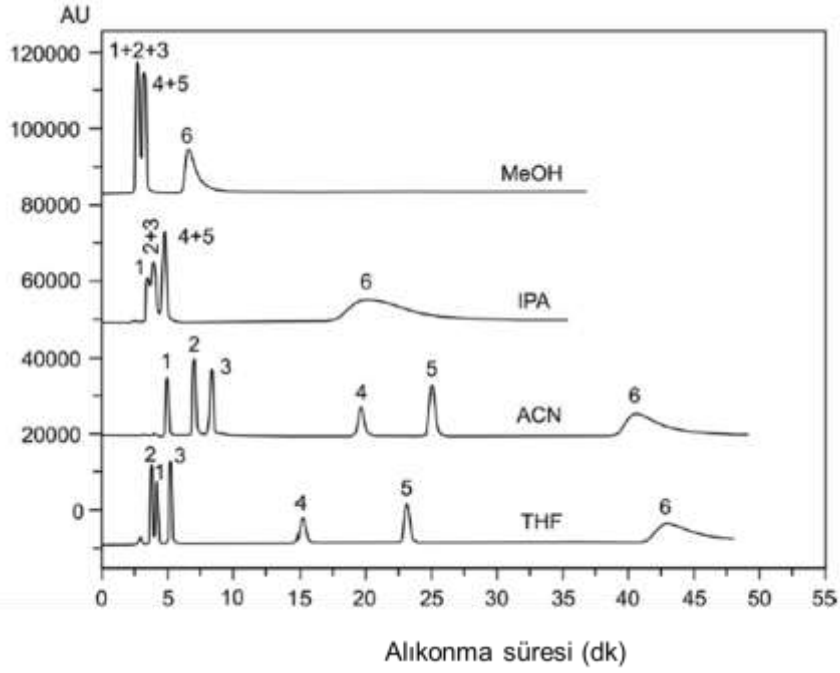


Şekil 2.16. Polar sabit faz yüzeyinde, asetonitril ile zengin hareketli faz kullanımı sırasında su moleküllerinin oluşturduğu tabaka.

2.6.4. HILIC için Kullanılan Hareketli Faz ve Sabit Fazlar

2.6.4.1. Hareketli faz

Polar ve hidrofilik analitlerin ayırımında oldukça güçlü olduğu kanıtlanan HILIC sisteminde sabit faz genelde silika üzerinde siyano amino, diol gibi polar gruplar içerir. Hareketli fazda ise düşük derişimde su ve polar çözücü bulunur ve sabit faza göre daha az polardır. Genellikle asetonitril ve düşük derişimde su içeren karışım hareketli faz olarak kullanılmaktadır [140,158,163]. Aynı zamanda 2-propanol ve dioksan gibi su ile karışan çözücülerde kullanılabilir. Ancak bu tür viskoz hareketli fazların kullanımı ayırma verimini düşürmektedir [137,164,165,169]. Şekil 2.17’de HILIC kolonunda polar organik çözücülerin vitaminlerin ayırımındaki etkisi gösterilmektedir. Asetonitril kullanımı ile diğer polar çözücülere kıyasla daha yüksek çözünürlükte ve yüksek ayırma verimi ile pikler elde edildiği görülmektedir [169].



Şekil 2.17. HILIC kolonunda kullanılan polar organik çözücülerin vitamin ayrımı üzerine etkisi. Analiz koşulları: kolon: Inertsil Diol (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), hareketli faz: 90/10 v/v organik çözücü/amonyum asetat (10 mM, pH 5.0). Analitler: (1) nikotinamid, (2) piridoksin (3) riboflavin (4) nikotinik asit (5) L-askorbik asit (6) tiyamine. Organik çözücüler: MeOH: metanol, IPA: izopropanol, ACN: asetonitril, THF: tetrahidrofur [169].

HILIC'te düşük su derişimi ve yüksek derişimde organik çözücü kullanımı, elektron iyonlaşma kütle spektrometresinin (ESI-MS) analitlere olan duyarlılığını arttırmaktadır [166-168]. Ayrıca hareketli fazın yüksek organik içeriğinden ötürü kolon geri basıncı düşüktür ve bu özellik kolonun yüksek akış hızlarında çalışmasını kolaylaştırarak analiz süresini kısaltmaktadır. HILIC'te sabit fazın ve analitlerin polaritesinin artması, hareketli fazın polaritesinin azalması, analitlerin alıkonmasını arttırmaktadır. Hareketli faz polaritesi, pH'ı, sabit faz türü, akış hızı gibi parametreler HILIC sisteminde yüksek performans ile bir kromatografik ayırım gerçekleştirmek için oldukça önemlidir. Bu yöntemde hareketli faz içerisindeki su derişiminin hacimce %5-40 arasında olması gerekmektedir. Hareketli faz olarak sıklıkla kullanılan asetonitril derişimi genellikle hacimce %95-60 arasındadır [137, 142, 144, 170].

Hareketli faz içerisinde tampon ve asit kullanımı da kromatografik analizi etkileyen diğer bir parametredir. Kromatografik analiz sırasında analitler asit ayrışma değerlerine (pKa) göre hareketli faz pH'ına bağlı olarak iyonize olurlar. Meydana gelen elektrostatik etkileşim sabit faz üzerine analit adsorpsiyonunu ve buna bağlı olarak analitlerin alıkonma sürelerini etkilemektedir [169].

2.6.4.2 Sabit Faz

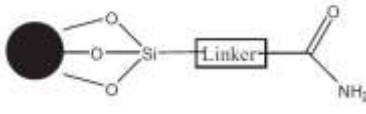

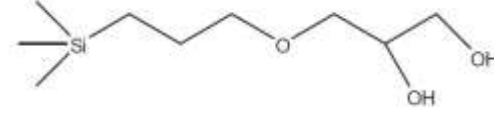

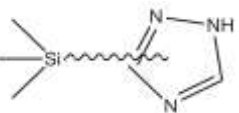
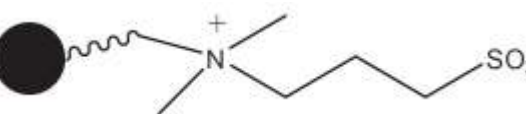
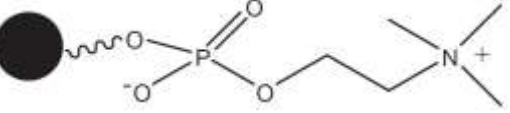
2.6.4.2.1. Silika ve Polimerik Bazlı Partikül Formunda Sabit Fazlar

Günümüzde HILIC için yeni ayırma ortamlarının geliştirilmesine yönelik yoğun bir araştırma aktivitesi sözkonusudur [137,143,171,172]. HILIC için üretilen ve kullanımda olan sabit fazlar çoğunlukla silika partikül bazlı olup, klasik HPLC sisteminde kullanıma yöneliktir [173]. Son yıllarda üretilmiş silika bazlı bazı HILIC kolonları ve içerdikleri kromatografik ligandlar Çizelge 2.5'te sunulmaktadır [45]. Buradan görüldüğü gibi, katyonik formda aminoalkil, zwitteriyonik formda sülfobetain ve nötral formda hidroksalkil türü polar ligandlar silika partikül içeren HILIC kolonlarında kullanılmaktadır. Bu kolonların tamamına yakınının klasik HPLC sisteminde kullanıma uygun olarak üretildiği tekrar not edilmelidir [45]. The U.S. Food and Drug Administration (FDA), melamin ve siyanürik asit kalıntılarının eş zamanlı tayini için, ZIC®-HILIC kromatografi kolonunun kullanıldığı bir yöntem geliştirdiğini açıklamıştır.

Silika partikül bazlı HILIC kolonlarının sentezine yönelik ilk çalışmalar 2006 yılından itibaren literatüre girmiştir. Bu çalışmalarda, gözenekli silika mikroküreler üzerine, polimerik formda hidrofilik ligandlar “katı faz üzerine graflama” ile takılmıştır. Bu kapsamda silika partiküller üzerine [N,N-dimetil-N-(metakriloksietil)amonyum]propan sülfonat (DMAPS), 2-metakriloksietil fosforilkolin (MEPC) gibi monomerler atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile graft edilerek zwitteriyonik formda polimerik ligand içeren HILIC sabit fazları hazırlanmıştır [50,137]. Ayrıca, Irgum ve arkadaşları tarafından DMAPS monomeri, tersinir katılma-ayrışma içeren zincir transfer polimerizasyonu (reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, RAFT) yöntemi ile silika partiküllerin

yüzeyine graflanarak, yine sülfobetain türü zwitteriyonik formda HILIC sabit faz sentezi gerçekleştirilmiştir [52]. Aynı grup silika mikroküreler üzerine sorbitol metakrilat graft ederek hidroksialkil gruplu polimerik ligand içeren HILIC sabit faz sentezini gerçekleştirmiştir [51].

Çizelge 2.5. Klasik HPLC sistemi için son yıllarda geliştirilen ve silika partikül içeren bazı HILIC kolonları ve taşıdıkları kromatografik ligandlar [45].

Sabit Faz Türü	Ligand	Yapı	Kolon Adı
Nötral	Amid		BEH Amid
	Siyano		YMC-Pack Cyan
	Diol		Inertsil HILIC
Pozitif yüklü	Amino		YMC-Pack Amino
	Triazol		Cosmosil HILIC
Zwitteriyonik	Sülfobetain		ZIC-HILIC
	Fosfokolin		Shiseido PC HILIC

2010 yılında, silika mikroküreler üzerine poli(epoksi propil metakrilat) graft edilerek, epoksi propil grubu üzerinden yapıya trishidroksimetilaminometan bağlanmış ve böylece yine hidroksialkil fonksiyonel grubu içeren nötral sabit faz sentezi yapılmış ve HILIC modunda başarıyla kullanılmıştır [47]. Ayrıca 2011 yılında, aminoglikoz

grubu içeren ligand, Huisgen-kimyası (click chemistry) ile silika partikül yüzeyine bağlanmış ve sabit faz HILIC ile amino asit ayrımı için kullanılmıştır [49]. 2012 yılında yine Huisgen-kimyası (click chemistry) ile L-azidolisin, silika partiküllerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmış ve sentezlenen sabit faz ile polar analitlerin kromatografik ayrımı gerçekleştirilmiştir [174]. Son zamanlarda hidrofilik sabit faz sentezinde tiyol-en kolay bağlanma reaksiyonları kullanılmaya başlanmıştır [175,176]. Liang ve arkadaşları tarafından tiyol-en kolay bağlanma reaksiyonları ile silika partikül yüzeyine sistein bağlanmış ve hazırlanan zwitteriyonik hidrofilik sabit faz ile polar analitlerin kromatografik analizleri yapılmıştır [175]. Bir başka çalışmada yine tiyol-en kolay bağlanma reaksiyonları kullanılarak imidazolyum bazlı zwitteriyonik sabit faz sentezi gerçekleştirilmiş ve sentezlenen partiküller nükleosidlerin, nükleik asitlerin, organik asitlerin ve vitaminlerin ayrımında başarıyla kullanılmıştır [176]. 2014 yılında poli(2-viniloksazolin) silika partiküllerin yüzeyine graflanarak nükleosidlerin kromatografik ayrımında kullanılmıştır [170]. Kuroda ve arkadaşları tarafından amino grubu bağlanan silika partiküller ile L-Gluten ve L-Aspartic asit'in karboksil grupları arasında amid bağı oluşturularak yeni bir silika bazlı sabit faz sentezlenmiş ve oluşan sabit faz hidrofilik etkileşim kromatografisi modunda polar analitlerin ayrımında kullanılmıştır [177]

Yapılan literatür taraması ile klasik HPLC sistemi için polimerik partikül bazlı HILIC sabit fazlarının sentezine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmuştur. İlkinde gözenekli ve eşboyutlu poli(klorometilstiren-co-divinilbenzen) partiküller üzerine ATRP ile 2-hidroksil-3-[4-(hidroksimetil)-1H-1,2,3-triazol-1-]propil 2-metakrilat graft edilerek, triazol grubu içeren sabit faz sentezi yapılmış, nükleotid ve nükleosidlerin kromatografik ayrımında başarıyla kullanılmıştır [60]. Yine aynı grup tarafından eşboyutlu-gözenekli poli(glisidil metakrilat) bazlı partiküller üzerine poli(vinil tetrazol), ATRP ile graft edilerek elde edilen sabit faz HILIC ile nükleosid ayrımında kullanılmıştır [61]. Tuncel ve grubu tarafından 2014 yılında polimerik bazlı hidrofilik sabit faz sentezine yönelik iki çalışma yapılmıştır [178,179]. İlkinde poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller üzerine hidrofilik formdaki kromatografik ligand (katyonik formda polietilenimin (PEI)), reaktif kloropropil grubu üzerinden kovalent olarak bağlanmış ve sentezlenen partikül formundaki sabit faz, mikro-sıvı kromatografisi sisteminde HILIC modunda nükleotid, nükleosid ve organik asit

ayırımında kullanılmıştır [178]. Diğer bir çalışmada başlatıcı içeren poli(GDMA-co-GDGA) partiküller üzerinde, 2-metakriloksietildimetil(3-sülfopropil)amonyum-hidroksit (MESH)'in atom transfer radikal polimerizasyonu ile zwitteriyonik formda, moleküler fırça türü ligand içeren partiküller elde edilmiştir [179]. Geliştirilen kolonların nükleosid, organik asit ve polar akrilik bileşenlerin ayırımında HILIC modu için mikro sıvı kromatografisi sisteminde kullanılabileceği gösterilmiştir [179].

2.6.4.2.2. Silika ve Polimerik Bazlı Monolit Formunda Sabit Fazlar

Monolitik formda HILIC sabit fazlarının sentezine yönelik çalışmaların tamamı mikrosıvı kromatografisi sistemine yönelik olarak yapılmıştır. Bu çalışmalar silika bazlı ve polimer bazlı monolitik kapiler kolonlar olarak 2 ayrı kategoride düşünülebilir.

HILIC için sentezlenen “silika bazlı kapiler monolitik kolonlar” ile ilgili ilk çalışmalar literatüre 2007 yılından itibaren girmiştir [6,180-185]. Bu çalışmaların ilkinde poli(akrilik asit) ligand taşıyan silika monolit mikro-sıvı kromatografisi sisteminde başarıyla kullanılmıştır [180]. 2010 ve 2011 yıllarında ise, kitosan, metilimidazolyum ve zwitteriyonik bazlı hidrofilik ligandlar içeren silika monolitler sentezlenmiştir [6,181,182]. Ayrıca yine zirkonyum oksit bazlı kapiler monolitinin mikro-sıvı kromatografisi sisteminde HILIC için kullanımını içeren bir çalışma 2010 yılında yayınlanmıştır [183]. Silika mikrokürelerin aglomerasyonu veya oktadesil grubu içeren silika bazlı monolitlerin hidrofilizasyonu ile de HILIC için monolitik formda kapiler kolonlar hazırlanmıştır [184,185].

Literatürde 2007 yılından itibaren HILIC için “polimer bazlı kapiler monolitik kolonlar” üzerine çalışmalar görülmektedir [186]. Bu kapsamda N,N-dimetil-N-metakriloksi-N-(3-sülfopropil)amonyum betain ve etilen dimetakrilatın termal kopolimerizasyonu ile iç çapı 100 µm olan kapiler silika tüp içerisinde monolitik kapiler kolon üretilmiştir. HILIC ile oligonükleotid ayırımı için N-(hidroksimetil) metakrilamid (HMMAA) ve etilen dimetakrilatın kopolimerizasyonu ile yeni bir kapiler monolitik kolon geliştirilmiştir [187]. Monomer olarak 2-metakriloksietil fosforilkolin (MPC) ve [2-metakriloksietil]dimetil-(3-sülfopropil)amonyum hidroksit,

Çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat kullanımıyla, polimerik formda HILIC kapiler monolitleri elde edilmiştir [188,189]. Ayrıca 2-(metakriloksi)etiltrimetilamonyum metil sulfat (META)-pentaeritrol triakrilat (PETA) ve N,N-dimetil-N-metakriloksietil-N-(3-sulfopropil)amonyum betain-poli(etilen glikol) diakrilat monomer-çapraz bağlayıcı çiftlerinin kullanılmasıyla HILIC modunda polar bileşiklerin ayrımı için kapiler monolitik kolonlar elde edilmiştir [190,191]. Literatürde farklı hidrofilik ligand bağlı metakrilat bazlı monolitik yapıların sentezi ve HILIC modda sıvı kromatografisinde kullanımı yaygın olarak çalışılan konular arasındadır [192-198].

2.6.5. Literatürde Kullanılan HILIC Kolonlarının Performansları ve Uygulama Alanları

Diğer kromatografik tekniklere göre önemli avantajlara sahip olan HILIC kolonlarının geliştirilmesinin ticari ve bilimsel alanda günümüzün popüler konularından biri olduğu görölmektedir [169, 199].

HILIC genelde polar analitlerin ayrılmasında kullanılmaktadır [200]. Bu kapsamda yaygın olarak aşağıdaki analit grupları kullanılmaktadır.

- Biyolojik aktif bileşikler
- Antibiyotikler
- Nükleotidler
- Nükleosidler
- Suda özünen vitaminler
- İlaç metabolitleri
- Nörotransmitterler
- Aminoasitler
- Peptidler
- Oligosakkaritler
- RPC'de alıkonamayan polar bileşikler

Polar analitlerin HILIC modunda kromatografik ayrımında kullanılan kolonların analiz koşulları ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.6'da verilmektedir.

Günümüzde ilaç endüstrisi, gıda analizleri ve biyokimyasal araştırmalar gibi pek çok alanda kullanılmak üzere silika ve polimerik partikül bazlı HILIC kolonları üretilmektedir [144,205-207]. Merck firması ürettiği silika ve polimerik partikül bazlı HILIC kolonlarını uygulama alanlarına göre iyon, melamin analizi ve peptid analizinde kullanılan kolonlar şeklinde sınıflandırmıştır. Firmanın ZIC®-pHILIC adını verdiği polimer bazlı kolonlar polar bileşiklerin ayrımında geniş pH aralığında uygun tampon sistemi ile kullanılabilir. ZIC®-pHILIC kolonları, zwitteriyonik fonksiyonel grup bağlı 5 µm boyutunda polimerik partiküller ile doldurulmuş olup, özellikle nükleosid ve nükleotidlerin kromatografik analizlerinde kullanılmaktadır [144]. Bunun yanı sıra SeQuant® firması ZIC®-HILIC adını verdiği farklı bir kolon daha geliştirerek kolonun glikanların ve glikopeptidlerin ayrımı için önermiştir [144, 205-207]. Çizelge 2.7'de HILIC ticari kolonlarının yaygın uygulama alanları verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi kolonlar, biyolojik uygulamalar, gıda ve ilaç analizi için nükleobaz, nükleosid ve nükleotidlerin analizlerinde kullanılmaktadır [194].

Çizelge 2.6. Polar analitlerin HILIC modunda kromatografik ayırımında kullanılan kolonların analiz koşulları ve elde edilen sonuçlar [171]

Sabit faz	Analitler	Analiz koşulları	Kademe yüksekliği	Ref
Silika	aromatik karboksilik asit	85% ACN- 20mM AB,UV	10 µm	[148]
	nükleik bazlar ve nükleosidler	85% ACN- 20mM AB,UV	10-12 µm	[148]
Amino-silika	aromatik karboksilik asit	85% ACN- 20mM AB,UV	44-60 µm	[148]
	nükleik bazlar ve nükleosidler	85% ACN- 20mM AB,UV	14-20 µm	[148]
	peptitler	92% ACN- 2.5mM AB,UV	22-95 µm	[201]
	amino asitler	60% MeOH ESI-MS	58-100 µm	[202]
Sulfobetain	aromatik karboksilik asit	85% ACN- 5mM AB,UV	12-21 µm	[148]
	morfin	%70 ACN 20mM AB,UV	15 µm	[203]
	peptitler	70% ACN- 50mM AB,UV	33-56 µm	[203]
	nükleik bazlar ve nükleosidler	85% ACN- 20mM AB,UV	17-21 µm	[148]
		70% ACN- 100mM AB,UV	36-84 µm	[203]
Triazol	okzalik asit	%50 ACN 10mM PB (pH 7),UV	11 µm	[204]
	benzoik asit	%50 ACN 10mM AB, UV	17 µm	[204]

Çizelge 2.6. devam ediyor

Sabit faz	Analitler	Analiz koşulları	Kademe yüksekliği	Ref
	üridin	%90 ACN 10mM AB, UV	14 µm	[204]
	sitidin	%80 ACN 10mM AB, UV	21 µm	[204]
Poly(HTMA)-g- poly(CMS-co-DVB) partiküller	guanozin	%90 ACN 20 mM amonyum format	134 µm	[60]
	sitozin		321 µm	[60]
	uracil		367 µm	[60]
Poly(VT)-g- poly(GMA-co- EDMA) partiküller	sitidin	%95 ACN 20 mM amonyum format	373 µm	[61]
	sitozin		462 µm	[61]
	adenozin		615 µm	[61]

AB: amonyum asetat tamponu, PB: sodium fosfat tamponu, MeOH: Metanol, ACN: asetonitril

Çizelge 2.7. HILIC ticari kolonların nükleobaz, nükleosid ve nükleotid analiz uygulamaları [194]

Uygulama	Kolon	Kaynak
İdrarda ve serumda nükleosid analizi	KINETEZ HILIC	[208]
İdrarda nükleosid analizi	PHA	[209]
Kanser hastaları için idrarda nükleobaz ve nükleosid analizi	ZIC-HILIC	[210]
Yapay ortamda hazırlanmış doku örnekleri ya da bakteri örneklerinde nükleotid analizi	ZIC-pHILIC	[205]
Ganedorma (mantar) kalitesini araştırmak için yapılan nükleobaz ve nükleosid analizleri	ZIC-HILIC	[211]
DNA'da 6-tiyoguanin analizi	HILIC BEH	[212]
Bebeklerde nükleotid analizi	TSK-Gel-NH ₂ -100	[213]

2.7. Canlı/Kontrollü Radikal Polimerizasyon Teknikleri (Living/Controlled Radical Polymerization Techniques)

2.7.1. Mekanizma

Yaşayan polimerizasyon reaksiyonları olarak da bilinen kontrollü radikal polimerizasyonu mekanizmaları, polimer molekülünün kontrollü büyümesini sağlamak ve istenilen molekül ağırlığını elde etmeye yarayan farklı polimerizasyon mekanizmalarını içermektedir. Polimerizasyon mekanizmalarında büyüyen polimer zincirinin sonlanma adımı ortadan kaldırıldığı için yöntem 'yaşayan' ismini almıştır. Sonlanma ve başlama basamakları dış etkiyle kontrollü bir şekilde yapılır. Bu sayede polimerin molekül ağırlığı ve polimer zincir sonu grupları kontrol edilir [214-217]. Kontrollü büyüme mekanizmaları sayesinde farklı monomerler eklenerek kontrollü blok kopolimerler elde edilebilir [217-221]. Sonlanma ve zincir transferi reaksiyonlarının olmadığı yaşayan polimerizasyon mekanizmalarında polimer zincirinin büyüme hızı sabittir ve reaksiyon sonunda elde edilen polimer moleküllerinin zincir büyüklükleri birbirine çok yakındır; yani monodisperse yakın molekül ağırlığı dağılımı vardır. Bütün monomerler tükenene kadar polimerizasyon reaksiyonu devam eder ve molekül ağırlığı polimer dönüşümü ile doğrusal bir bağıntı içindedir [217-221] .

Kontrollü radikal polimerizasyonların avantajları şunlardır [214-221]:

- molekül ağırlığının polimer dönüşümüyle doğrusal bağıntı içinde olması, dolayısıyla istenilen molekül ağırlığının elde edilmesi,
- monodisperse yakın dar bir molekül ağırlığı dağılımı elde edilmesi,
- zincir sonunda fonksiyonel gruplara sahip polimerler elde edilmesi,
- polimer moleküler mimari yapısının kontrol edilmesi (*blok kopolimerler*),
- Yıldız (star), petek (comb), fırça (brush), kurtçuk (worm) veya graft mimariye sahip polimerlerin sentezinde moleküler yapıların elde edilmesi.

Bu tür polimerizasyon reaksiyonlarının kullanımı özellikle blok kopolimerlerin sentezinde yaygındır. Reaksiyonun istenilen adımında farklı monomerler eklenerek di- ya da tri- blok kopolimerler elde edilebilir [214-221]. Kontrollü radikal

polimerizasyonları ilk kez Michael Szwarc tarafından 1956 yılında stirenin alkali metaller ile THF’te anyonik polimerizasyonu sırasında kullanılmıştır [222]. Daha sonraki yıllarda teknik geliştirilerek, çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunlar şu şekilde sıralanmaktadır [223]:

- Eşleşme ile Tersinir Deaktivasyon (Kararlı Serbest Radikal Polimerizasyonu -SFRP) [224].
- Dejeneratif Transfer (Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer Polimerizasyonu-RAFT) [225].
- Atom Transferi ile Tersinir Deaktivasyon (Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu -ATRP) [226, 227].

2.7.2. Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi Mekanizması (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT)

Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi mekanizması uluslararası literatürde Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) adıyla anılmakta ve RAFT olarak kısaltılmaktadır. RAFT polimerizasyonunda dityoesterler, dithiokarbamateler, trityokarbonatlar ve ksantat (xanthate) gibi tiyokarboniltiyoo bileşikler kullanılarak tersinir zincir transferi mekanizması harekete geçirilir. Çok yönlü kullanılabilen polimerizasyon reaksiyonlarından biridir. Farklı fonksiyonel gruplara sahip monomere ve çözücülere karşı toleranslıdır ve geniş bir sıcaklık aralığında reaksiyonu yürütmek mümkündür. Diğer radikal polimerizasyon mekanizmalarında olduğu gibi RAFT mekanizmasında da başlatıcı, monomer, sıcaklık ve çözücü kullanılır. Bunlara ek olarak zincir transfer ajanına ihtiyaç vardır [225].

RAFT mekanizmasının ATRP’ye göre en büyük avantajı birçok farklı monomerin polimerizasyonunda kullanılabilmesidir. RAFT ile polimerize edilen belli başlı monomerler stiren ve türevleri, akrilat, akrilamid, metakrilat, metakrilamid, bütadien, vinil asetat ve vinilpirolidon şeklinde sıralanabilir [225]. Bütün kullanım avantajının yanı sıra RAFT’in bir takım dezavantajları da bulunmaktadır [225]:

-İçinde bakır ya da diğer metallerin bulunduğu polimerlerin sentezinde kullanılamaz.

- Moleküler yapıların bazılarını, örneğin yıldız polimerleri, RAFT ile elde etmek çok kolay değildir, ancak gerekli olan RAFT ajanı sentezlendiği sürece her tür yapı elde edilebilir.

-RAFT sentezinde kullanılan kimyasallar ticari olarak bulunmaz ve bu sebeple RAFT sentezi kullanılacağı zaman bütün kimyasallar ve ajanlar sentezlenmelidir. (Bazı firmalar bu kimyasalları satışa sunmakta olsalar bile RAFT endüstriyel alanda daha yaygınlaşmadığı için fiyatları oldukça yüksektir).

-ATRP ile elde edilen polimerlerin yeşil renge sahip olması gibi, RAFT ile sentezlenen polimerlerde de dityoester grupları bulunduğu için koku ve renk (pembemsi kırmızı, sarı) gözlemlenir. Ancak bu sorunu gidermek, basit bir reaksiyon basamağı ile mümkündür.

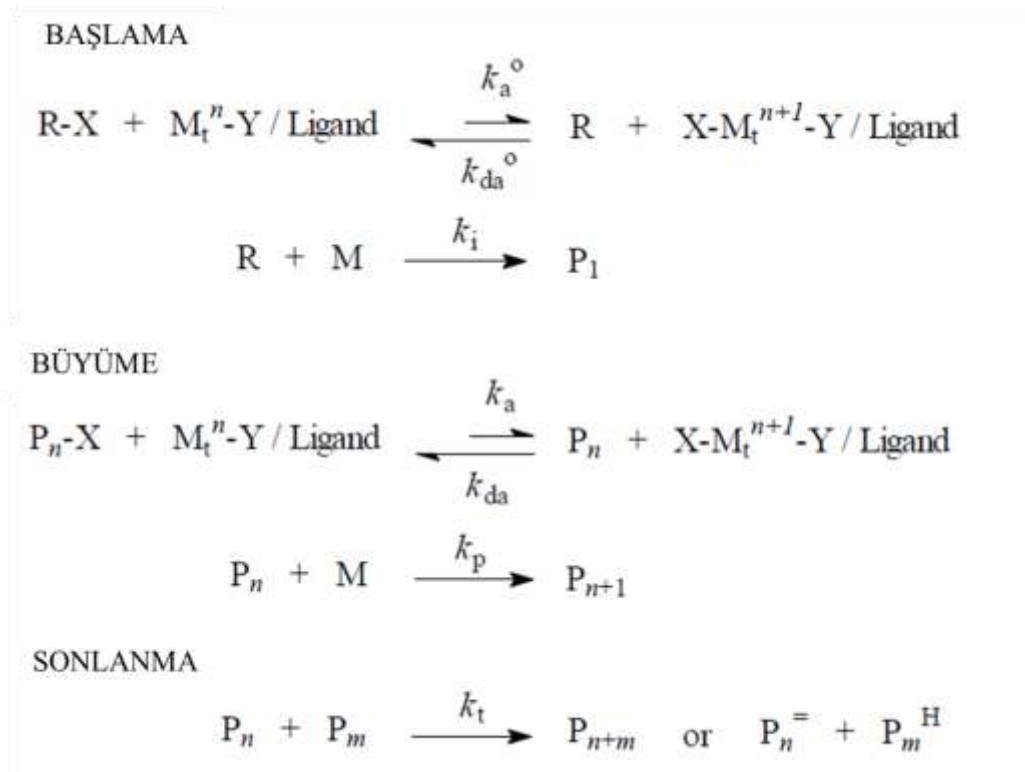
1990'lı yıllarda Sawamoto ve grubu ile Matyjaszewski ve grubu birbirlerinden bağımsız olarak ATRP tekniğini geliştirmişlerdir. Bu teknik olağanüstü bir buluş olarak kabul görmüş ve birçok grup tarafından polimerizasyonlarda kullanılmaya başlanmıştır [226-228].

2.7.3. Atom Radikal Transfer Polimerizasyonu (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP)

Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) ilk kez 1995 yılında tanıtıldıktan, Matzasyewski ve grubu ile Sawamoto ve grubu tarafından geliştirildikten sonra kontrollü radikal polimerizasyon mekanizmaları içerisinde en etkili ve en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir. [229]. ATRP mekanizması ile geniş bir monomer spektrumu (stiren, akrilonitril, akrilat/metakrilat bazlı monomerler) polimerizasyon için kullanılabilir. Kullanılan özel metal katalizör bileşikleri sayesinde farklı monomerler büyüyen polimer zincirine eklenebilir ve yeni kopolimerler elde edilebilir. Bu mekanizma, sıcaklık gibi reaksiyon

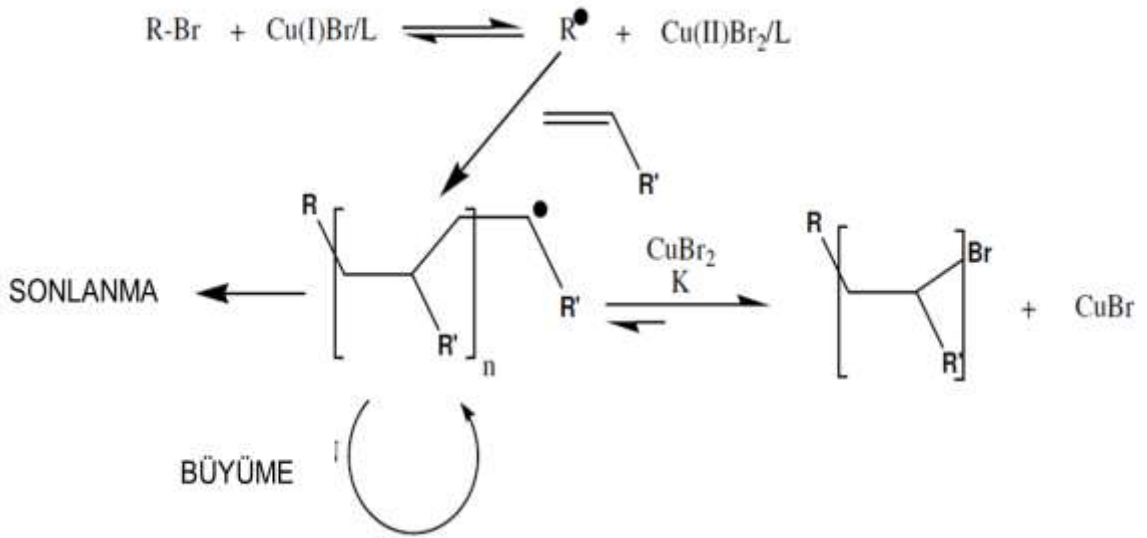
parametrelerinin kontrolü ile kolayca durdurulup yeniden başlatılabilir [230].

Yöntemin özelliği, çok dar bir molekül ağırlığı dağılımı ile istenilen molekül ağırlığında polimerlerin üretilmesidir. Sentezlenen polimerin kendisinin bir “makro başlatıcı” olarak davranması nedeniyle, yöntem bir “canlı polimerizasyon” yöntemi olma özelliğini taşımaktadır. Bir başka deyimle, polimerizasyon tamamlandıktan sonra ortama yeni veya aynı türde bir monomer ilavesiyle polimerizasyon tekrar başlatılabilmekte ve kontrollü olarak polimerik zincir istenildiği ölçüde uzatılabilmektedir. Bu yöntemle üretilen polimerlerin, polidispersite indeksleri çoğunlukla 1.5 değerinin altında olup, polimerizasyon koşullarının ayarlanması ile polimerizasyon sırasında molekül ağırlığı iyi kontrol edilebilmektedir. Böylece hedeflenen molekül ağırlığına bütün polimer zincirleri yaklaşık aynı uzunlukta olacak şekilde ulaşılabilir [218,220]. Bilinen radikal polimerizasyonunda, radikalik gruplar kullanılarak başlama sağlanmakta, bu zincir basamağını ilerleme ve sonlanma mekanizmaları takip etmektedir. Klasik radikalik polimerizasyonda radikaller k_p ve k_t hız sabitleri ile ilerlemekte ve sonlanmaktadır (Şekil 2.18) [223].



Şekil 2.18. Klasik radikal polimerizasyon genel mekanizması [223]

ATRP'de ise radikaller tersinir redoks işlemi ile geçiş metalleri ile katalizlenerek oluşmaktadır (Şekil 2.19). Oluşan radikale monomerin ilavesi ile büyüyen polimerik radikal (Pn), aktivasyon sırasında yükseltgenerek oluşan metal kompleksi tarafından tersinir bir reaksiyon ile deaktive edilmektedir. Bu aktivasyon ve deaktivasyon döngüsü sırasında polimer zincirleri birbirlerine çok yakın hızlarda büyümeye devam etmektedir. Reaksiyon hızları kıyaslandığında aktivasyon hızının deaktivasyon hızına göre düşük olduğu bilinmektedir. Bu durum ortamda büyüyen polimerik radikallerin (Pn) derişiminin düşük olmasına neden olmakta ve polimerizasyonun kontrolünü sağlamaktadır. Bu durumun Pn radikallerin kendi aralarında birleşerek sönmülenmesini de minimuma indirdiği düşünölmektedir. Bu şekilde canlı polimer korunmakta, istenildiği takdirde bu polimer üzerinden tekrar polimerizasyonlar yürütölebilmektedir. ATRP yönteminde bakır en çok kullanılmasına rağmen demir bileşikleri de daha az zehirli olmaları nedeni ile kullanılmaktadır [230].



Şekil 2.19. ATRP genel mekanizması [230]

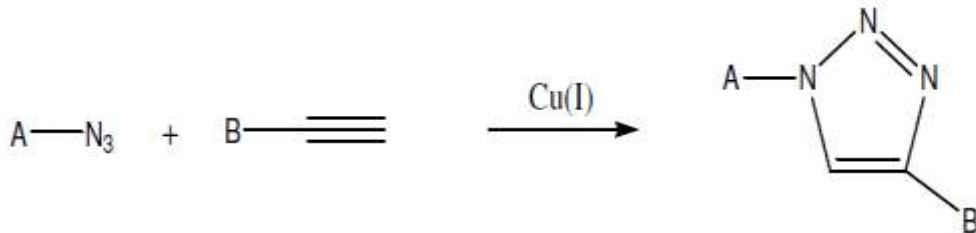
Bu yöntem ile membran veya partikül formundaki polimerik yüzeyler üzerinde eş uzunlukta polimer zincirlerinden oluşan “molecular brush” formunda kovalent bağlı polimer zincirleri oluşturulabilmektedir. Partikül formundaki materyaller içerisinde özellikle “silika” bazlı olanlar dikkati çekmektedir [221,223]. Yüzeye bağlanan

polimer uzunluğunun molekül sayısı düzeyinde ayarlanabilmesi ve yüzeydeki polimerik kaplama kalınlığının "nanometre" boyutunda kontrolü ATRP'yi, yüzey türevlendirme amacıyla kullanılan "nanoteknolojik bir yöntem" haline getirmiştir [231, 232]. ATRP yöntemi kullanılarak RAFT yöntemi sonucu elde edilen benzer yapılar sentezlenebilmekte hatta bazı durumlarda ATRP yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha kolay ve pratik bir yöntem olabilmektedir [223].

Kararlı Serbest Radikal Polimerizasyonu (SFRP) ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) mekanizmalarında polimer zincirinin büyümesi tersinir sonlanma ile kontrol edilirken, Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transferi (ya da Tersinir Eklenme Fragmantasyon Zincir Transferi, ve ya Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Transferi) mekanizmasında ise tersinir zincir transferi reaksiyonu, zincirin büyümesini kontrol eden faktördür [223].

2.8. Kolay Bağlanma (Click Chemistry) Yöntemi

Kolay bağlanma Yöntemi, ilk kez K.Berry Sharpless tarafından bulunmuştur [233]. Bu yöntemde gerçekleşen en yaygın reaksiyonu 1960'lı yıllarda Rolf Huisgen ilk kez tanımlamıştır [234]. Huisgen reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonda Şekil 2.20'de gösterildiği gibi azid ile alkin grubu arasında 1,3-dipolar halkalanması sonucunda 1,2,3-triazol sentezi gerçekleşmektedir [234]. Reaksiyon, Ru, Ni, Pt, Pd ve özellikle Cu(I) katalizörleri varlığında oda sıcaklığında gerçekleşmektedir [235-240]. Yapılan bir çok çalışmada, bu katalizörlerin reaksiyon hızını önemli ölçüde arttırdığı kanıtlanmıştır [239,240].



Şekil 2.20. Kolay Bağlanma (Click Chemistry) Yöntemi Mekanizması [234]

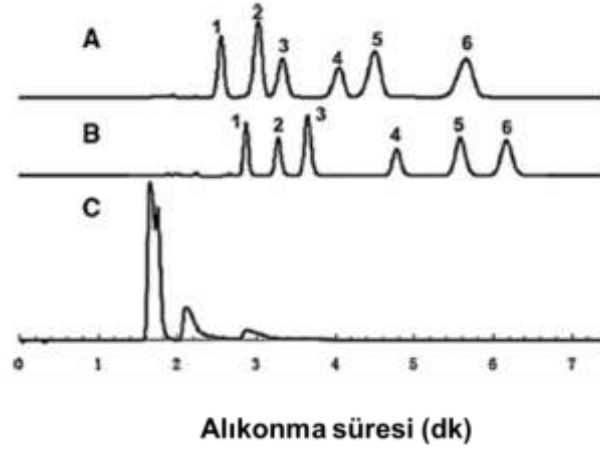
Kolay bağlanma reaksiyonlarının tercih edilir olmalarının başlıca sebepleri, basit reaksiyon koşullarında gerçekleştirilebilmeleri, yüksek verim alınabilmesi, yüksek seçicilik ile gerçekleşmeleri, fonksiyonel grup çeşitliliğine olanak sağlamaları, kısa reaksiyon sürelerine sahip olmaları ve kullanılan çözücülere karşı hassas olmamalarıdır [235].

Literatürde kolay bağlanma reaksiyonları her türlü kromatografik modda çalışmaya yönelik sabit fazların sentezi için kullanılmaktadır. Triazol grubu belli pH aralıklarında (pH 3-7) kolayca iyonize olabildiği için bağlandığı sabit fazı pozitif yükler ve bu şekilde sabit fazın anyon değişim kromatografisinde kullanımını sağlar [240]. Zhang ve arkadaşları bu tür sabit fazların sentezine ve kromatografik uygulamalarına yönelik çalışmalar yapmışlardır [241]. HILIC için zwitteriyonik formda sabit fazların kolay bağlanma yöntemi ile sentezi ve kromatografik performanslarının incelenmesi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır [243].

Chu ve arkadaşları zwitteriyonik fonksiyonel gruba sahip lisini azid bağlı silika partiküller üzerine kolay bağlanma reaksiyonu ile bağlamış ve HILIC modunda nükleosidlerin ve nükleotidlerin kromatografik ayrımında başarıyla kullanmışlardır [174]. Yapılan çalışmada, üretilen kolonun performansı HILIC ticari kolonları ile kolon performansları karşılaştırıldığında kolay bağlanma reaksiyonu ile sentezlenen kolonun daha iyi olduğu görülmüştür (Şekil 2.21) [243].

Liang ve arkadaşları azid bağlı silika jel üzerine kolay bağlanma yöntemi ile aspargin bağlayarak amid-HILIC kolonları sentezlemişlerdir. Sentezlenen sabit faz nükleosidlerin ve nükleotidlerin ayrımında kullanılmıştır [244].

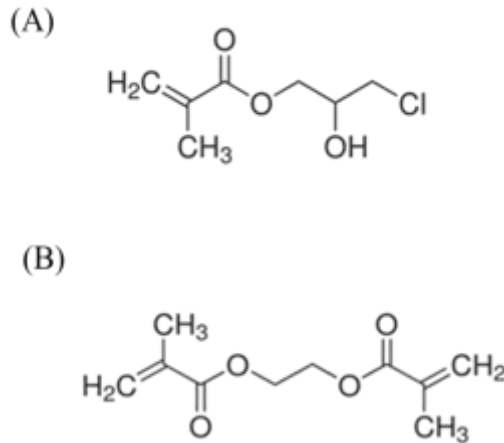
Yapılan diğer bir çalışmada 2-propilamin silika yapı üzerinde kolay bağlanma reaksiyonu ile graft edilerek yapıda triazol grubunun oluşması sağlanmış ve hazırlanan sabit faz nükleosidlerin ve organik asitlerin HILIC modunda kromatografik analizinde kullanılmıştır. Yine aynı çalışmada yapısında triazol halkası oluşturulmamış silika sabit faz, aynı polar analitlerin kromatografik analizinde kullanılmış ve kromatografik performansının triazol grubu bağlı kolona göre düşük olduğu gösterilmiştir [245].



Şekil 2.21. Nükleotid ve nükleosidlerin kromatografik analizi A) 5 μm , 150 mm x 4.6 mm i.d., kolay bağlanma reaksiyonu ile silika üzerine lizin bağlanan kolon B) 5 μm , 150 mm x 4.6 mm i.d., Zwitteriyonik HILIC ticari kolon, C) 5 μm , 150 mm x 4.6 mm i.d., Atlantis HILIC-silika ticari kolon. Analiz koşulları:Akış hızı: 1 mL/dk, 30 °C, hareketli faz: ACN/su (85:15, v/v), UV: 254 nm, Pik sırası: 1) urasil, 2) adenozin, 3) üridin, 4) sitozin, 5) sitidin, 6) guanozin [243].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin sentezi, türevlendirilmesi, ve HILIC modunda mikro-sıvı kromatografisi performans testlerinin yapılması şeklinde üç kısma ayrılabilir. İlk kısımda öncelikle eşboyutlu-gözenekli formda poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin sentezi için çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu tekniği geliştirilmiştir. Eşboyutlu partikül formundaki mikrokromatografik sabit fazların sentezi için literatürde henüz kullanılmayan reaktif polimerik form, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) başlangıç materyali olarak seçilmiştir. Bu yapıyı oluşturan monomer ve çapraz bağlayıcı Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Poli (HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin sentezi amacıyla kullanılan monomer (A) HPMA-Cl ve çapraz bağlayıcı (B) EDMA [246]

Literatürde mevcut eşboyutlu-gözenekli partiküllerin sentezi için kullanılan çok basamaklı polimerizasyon tekniklerinin önemli bir kısmında uygun bir çıkış lateksi sulu emülsiyon ortamında monodispersitesi korunarak önce gözenek yapıcı solvent, arkasından monomer ve çapraz bağlayıcı karışımı ile şişirilmekte ve son basamakta monomer fazı şişmiş partiküller içerisinde belli bir sıcaklıkta polimerize edilmektedir [36-39, 247, 248]. Yapılan çalışmalar, en iyi boyut ve gözeneklilik özelliklerine sahip poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin poli(GMA) çıkış lateksi ve etilbenzen (EB) gözenek yapıcı solvent olarak kullanıldığında elde edilebildiğini

göstermiştir [249]. Bu nedenle partikül sentezinde kullanılacak çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu için değişken etkilerinin incelenmesine yönelik deneylerde poli(GMA), çıkış lateksi; EB ise gözenek yapıcı solvent olarak kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında HILIC ligandlarının poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere bağlanma yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin kloropropil grubu üzerinden gerçekleşen ligand bağlanma reaksiyonları kullanılmıştır. Yapılan ön deneylerde ligand bağlama reaksiyonu için kullanılan çözücü türü ve reaksiyon sıcaklığı araştırılmış ve yapılan elementel analiz sonucunda en iyi ligand bağlanmasının elde edildiği çözücü türü ve reaksiyon sıcaklığı dikkate alınarak uygun ligand bağlanma koşulları belirlenmiştir [249].

Son kısımda üretilen ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, mikro sıvı kromatografisi sisteminde HILIC modunda sabit faz olarak kullanılmıştır. Geliştirilen sabit fazlar ile nükleosid, nükleotid, organik asitler ve farklı polar analitlerin ayrımı başarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Sentezi

3.1.1. Materyal

Monomer olarak kullanılan glisidil metakrilat (GMA), 3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat (HPMA-Cl) ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen glolikol dimetakrilat (EDMA) Sigma-Aldrich Co., U.S.A.'dan temin edilmiş ve alındığı şekliyle polimerizasyonlarda kullanılmıştır. Poli(vinil pirolidon) (PVP K-30, Ortalama molekül ağırlığı: 40.000 Da), poli(vinil alkol) (PVA, Ortalama molekül ağırlığı: 85.000-146.000, Hidroliz derecesi: % 89) ve sodyum lauril sülfat (SLS) yine aynı firmadan alınmıştır. Gözenek yapıcı olarak kullanılan etil benzen (EB), çözücü olarak kullanılan dimetil formamid (DMF), dioksan (D) ve tetrahidrofuran (THF) Riedel De Haen (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Başlatıcı olarak kullanılan benzoil peroksit (BPO) ve 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN) ise Across Organics (İngiltere) firmasından alınmıştır. BPO oda sıcaklığında kurutulmuş, AIBN ise

metanolden kristalize edilerek polimerizasyon deneylerinde kullanılmıştır. Seçilen ligandlar, trietanol amin (TEA-OH), [2-(metakriloksi)etil]dimetil-(3-sülfopropil)amonyum hidroksit (MESH) ve propargil alkol Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Kolay bağlanma ve ATRP için kullanılan reaktifler, sodyum azid (NaN_3) ve 2-bromoisobütrilbromür'de (BrIBuBr) yine aynı firmadan temin edilmiş ve alındığı şekliyle deneylerde kullanılmıştır. Katalizör olarak kullanılan trietilamin (TEA) ve bakır(I) iyodür (CuI) Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

3.1.2. Çıkış Lateksi Sentezi

Çıkış lateksi olarak kullanılan eşboyutlu poli(GMA) lateks partiküller, GMA monomerinin dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Çıkış materyali olarak akrilik kökenli lateks seçilmesinin nedeni, eşboyutlu ve gözenekli partikül sentezinde kullanılacak monomer (HPMA-Cl) ve çapraz bağlayıcının (EDMA) da akrilik bazlı olmasıdır. Böylece çıkış lateksinin polaritesinin monomer faz polaritesine yakın olması sağlanmıştır.

Dispersiyon polimerizasyonunda stabilizör olarak kullanılan PVP K-30 (0.45 g), sızdırmaz özelliğe sahip bir Pyrex reaktörde bulunan mutlak etanol (30 mL) içerisinde çözülmektedir. Çözeltiye GMA (3 mL) ve başlatıcı olarak kullanılan AIBN (0.24 g) eklenmekte ve oda sıcaklığında ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmaktadır. Reaktör, oda sıcaklığında sıcaklık kontrollü ve çalkalamalı bir su banyosuna yerleştirilmekte ve ısıtma işlemi başlatılmaktadır. Yaklaşık 40 dakikada 70°C sıcaklığa ulaşılmaktadır. Polimerizasyon 70°C sıcaklıkta 24 saat süre ile 120 cpm çalkalama hızında gerçekleştirilmektedir. Polimerizasyon sonrası reaktör oda sıcaklığına soğutulmakta ve elde edilen lateks 3 kez etanol ile 3 kez de distile-deiyonize su ile ardışık santrifüjleme-dekantasyon işlemi uygulanarak yıkanmaktadır. Santrifüjlenen poli(GMA) lateks partiküller son basamakta yaklaşık 10 mL su içerisinde ultrasonikasyon yolu ile dağıtılmaktadır. Örneğin katı içeriğinin belirlenmesi amacıyla bu çözeltiden 1 mL örnek alınarak, 70°C 'da vakumda 24 saat kurutulmaktadır. Partikül içeriği belirlenen lateks dispersiyonu, mikrosüspansiyon polimerizasyonu deneylerinde kullanılmak üzere saklanmaktadır.

3.1.3. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu

Uygulanan çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi dört basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar şu şekildedir:

1. Eşboyutlu çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyonu ile sentezi
2. Çıkış lateksinin gözenek yapıcı organik ajan ile şişirilmesi
3. Çıkış lateksinin monomer faz ile şişirilmesi
4. Monomer fazının şişmiş partüküller içerisinde polimerizasyonu

Buna göre ilk basamakta akrilat bazlı bir monomerin dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen çıkış lateks partükülleri, ikinci basamakta monodispersiteleri korunarak sulu emülsiyon ortamında gözenek yapıcı bir organik solvent (EB) ile şişirilmektedir. Gözenek yapıcı çözücünün lateks partüküller tarafından absorplanarak, partüküllerin denge şişme değerine ulaşması oda sıcaklığında ve manyetik karıştırma varlığında yapılmaktadır. Takiben, monomer (HPMA-Cl), çapraz bağlayıcı (EDMA) ve başlatıcı (BPO) içeren organik fazın, anyonik emülsiyon yapıcı madde içeren su bazlı ortamda, ultrasonikasyon yoluyla hazırlanan emülsiyonu, organik çözücü ile şişirilen lateks partükülleri içeren emülsiyon ile karıştırılmaktadır. Sonuç ortam monomer fazın lateks partüküller tarafından absorpsiyonu amacıyla 24 saat süre ile oda sıcaklığında manyetik olarak karıştırılmaktadır. Son basamakta ise sulu emülsiyon ortamına stabilizör olarak kullanılan PVA eklenerek, monomer fazı lateks partüküller içerisinde polimerleştirilmektedir. Polimerizasyon sızdırmaz özelliğe sahip reaktörlerde sıcaklık kontrollü- çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmektedir. Böylece eşboyutlu-gözenekli formda partüküller elde edilmektedir. Eşboyutlu-gözenekli formda partüküller, dönüşmeyen monomer ve gözenek yapıcı çözücünün uzaklaştırılması için öncelikle etanol ile ardışık santrifüjleme ve dekantasyon işlemleri uygulanarak yıkanıp, sonrasında ise çıkış lateksinden gelen polimerin uzaklaştırılması amacıyla THF ile ekstrakte edilmektedir. Yöntemin şematik formu Şekil 3.2'de ayrıntılı olarak verilmektedir.



Şekil 3.2. Çok basamaklı mikrosüspanisyon polimerizasyonu yönteminin şematik gösterimi.

Yöntemin uygulanması ayrıntılı olarak aşağıda verilmektedir. Uygun hacimde EB (2.5 mL), % 0.25 SLS içeren sulu ortamda (50 mL) 8 dakika süreyle 200 W gücünde ultrasonikasyon uygulanarak mikron boyutlu damlacıklar haline dağıtılmaktadır. Diğer yandan poli(GMA) lateks partikülleri (0.3 g) içeren uygun hacme sahip dispersiyon santrifüjlenerek, sıvı kısmı atılmakta ve lateks partiküller EB-Su emülsiyonu içerisinde 4 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak dağıtılmaktadır. Sonuç dispersiyon bir manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 24 saat süreyle 250 rpm hızda karıştırılarak, poli(GMA) lateks partiküllerin EB ile denge şişme değerine ulaşması sağlanmaktadır. Bu sürenin bitiminde HPMA-Cl (2.5 mL), EDMA (2.5 mL) ve BPO (0.30 g) içeren monomer fazı yine % 0.25 SLS içeren su ortamında (50 mL) 12 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak dağıtılmaktadır. Elde edilen emülsiyon bir önceki basamaktaki şişmiş poli(GMA) partikülleri içeren dispersiyonla birleştirilmekte ve sonuç emülsiyon monomer fazının lateks partiküllere transferi amacıyla bir manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 24 saat süreyle 250 rpm hızda karıştırılmaktadır. Sürenin bitiminde ortama PVA (0.8 g)'nın sulu çözeltisi (10 mL) eklenerek, sonuç dispersiyon 300 mL hacim değerine sahip, sızdırmaz bir Pyrex cam reaktöre alınmakta ve reaktör oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmektedir. Çalkalamalı su banyosu 80°C sıcaklık değerine, 150 cpm çalkalama hızı varlığında ısıtılmakta ve şişmiş lateks partiküller içerisinde monomer fazının polimerizasyonu 80°C sıcaklıkta, 24 saat süre ile, 150 cpm çalkalama hızı ile gerçekleştirilmektedir.

Polimerizasyonu takiben elde edilen partikül dispersiyonu oda sıcaklığına soğutulmakta ve etanol ile 3 kez santriüjleme-dekantasyon tekniği ile yıkanarak

dönüşmeyen monomer ve gözenek yapıcı çözücünün poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerden uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Takip eden basamakta ise poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller 2 kez THF (50 mL) ile oda sıcaklığında ekstrakte edilmekte ve etanol ile 3'er kez santrifüjleme-dekantasyon tekniği ile yıkanarak, son basamakta 20 mL etanol içerisinde ultrasonikasyon yoluyla dağıtılmaktadır. Elde edilen partikül dispersiyonu, HILIC ligandının bağlanması için kullanılmak üzere saklanmaktadır.

Tez kapsamında yapılan mikrosüspansiyon polimerizasyonu deneylerinde, farklı boy ve gözeneklilik özelliklerine sahip poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin eldesi amacıyla monomer faz bileşimi değiştirilmiştir. Deney koşulları Çizelge 3.1'de toplu olarak verilmektedir.

Çizelge 3.1. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu için deneysel koşulları

Poli(GMA) lateks (g)	EB (mL)	HPMA-Cl (mL)	EDMA(mL)
0.30	2.5	0.75	4.25
0.30	2.5	1.50	3.50
0.30	2.5	2.50	2.50
0.30	2.5	3.50	1.50
0.30	2.5	4.25	0.75

Gözenek yapıcı çözücü ile şişirme: 50 mL, % 0.25 SLS çözeltisi, 24 saat, 250 rpm, Monomer ile şişirme: 50 mL, % 0.25 SLS çözeltisi, 24 saat, 250 rpm, BPO: 0.30 g, PVA: 0.8 g. Polimerizasyon koşulları: 80°C, 24 saat, 150 rpm.

3.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi ve Karakterizasyonu

3.2.1. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, kromatografik ligand ile etkileştirilerek, ligandın kloropropil grubu üzerinden partiküllere kovalent yolla bağlanması

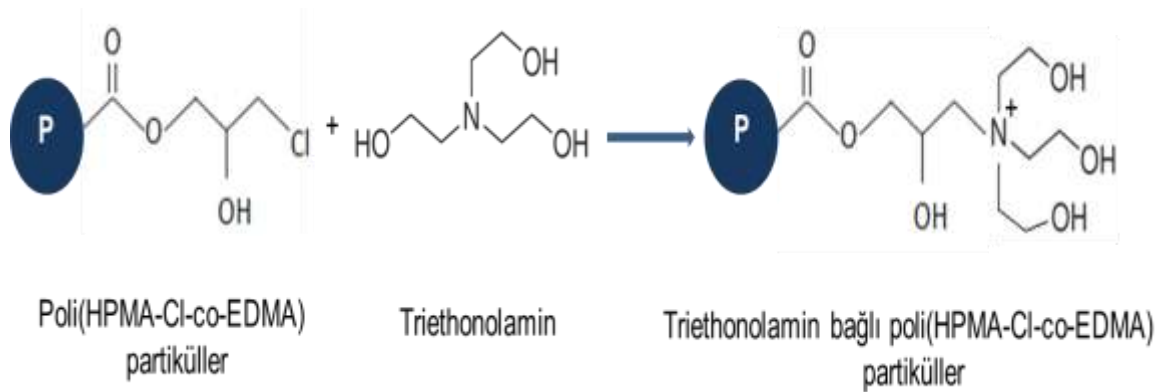
sağlanmıştır. Böylece partiküller üzerinde, katyonik (TEA-OH), polar (triazol halkası) ve zwitteriyonik (MESH) formdaki ligandların oluşturulmuştur. Partiküllerin farklı formdaki HILIC ligandları ile türevlendirilmesi amacıyla kullanılan reaksiyonlar aşağıda tanımlanmaktadır.

- Katyonik formda HILIC sabit faz sentezi için poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, tersiyer amin grubu içeren TEA-OH'ın DMF çözeltisi ile etkileştirilmiştir. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin kloropropil grubu ile TEA-OH'ın tersiyer amin grubu arasında gerçekleşen nükleofilik süstitüsyon tepkimesi ile katyonik formdaki ligandın partiküle bağlanması sağlanmıştır.
- Polar ligand içeren HILIC partikül sentezi için 'kolay bağlanma' (klik kimyası veya Huisgen reaksiyonu) adı verilen yöntem kullanılmıştır [234]. Bu amaçla poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül önce sodyum azid (NaN_3) ile etkileştirilerek üzerindeki klor grubu azid formuna dönüştürülmüş, bu yapı alkin grubu içeren propargil alkol ile tepkimeye sokularak hidrosimetil grubu bağlı triazol halkası formunda polar ligandın partikül üzerinde oluşumu sağlanmıştır.
- Zwitteriyonik formda HILIC partikül sentezi için zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirler, atom transfer radikal polimerizasyon (ATRP) yöntemi ile Br ve Cl bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde oluşturulmuştur.

Partiküllere farklı ligandların kovalent olarak bağlanmasına yönelik türevlendirilmesi için izlenen yöntemler ve ilgili reaksiyonlar bölüm 3.2.1.1, 3.2.1.2 ve 3.2.1.3'te gösterilmektedir.

3.2.1.1. TEA-OH Bağlanması

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere TEA-OH bağlanması, partiküllerin kloropropil grubu ile TEA-OH'ın tersiyer amin grubu arasındaki tek basamaklı reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Bağlanmaya ilişkin reaksiyon Şekil 3.3'te gösterilmektedir. TEA-OH (7.5 mL) ve DMF (30 mL) karıştırılarak elde edilen çözeltide poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g) dağıtılmıştır. Reaksiyon ortamı sızdırmaz pyrex reaktöre konularak, çalkalamalı su banyosunda 150 cpm çalkalama hızında 60°C'a ısıtılmıştır. Bağlanma işlemi 60°C'da 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işlemi sonrasında partiküller santrifüjleme-dekantasyon yöntemi ile üç kez DMF ve distile su ile yıkanmış ve son basamakta 10 mL distile su içerisinde dağıtılmıştır.

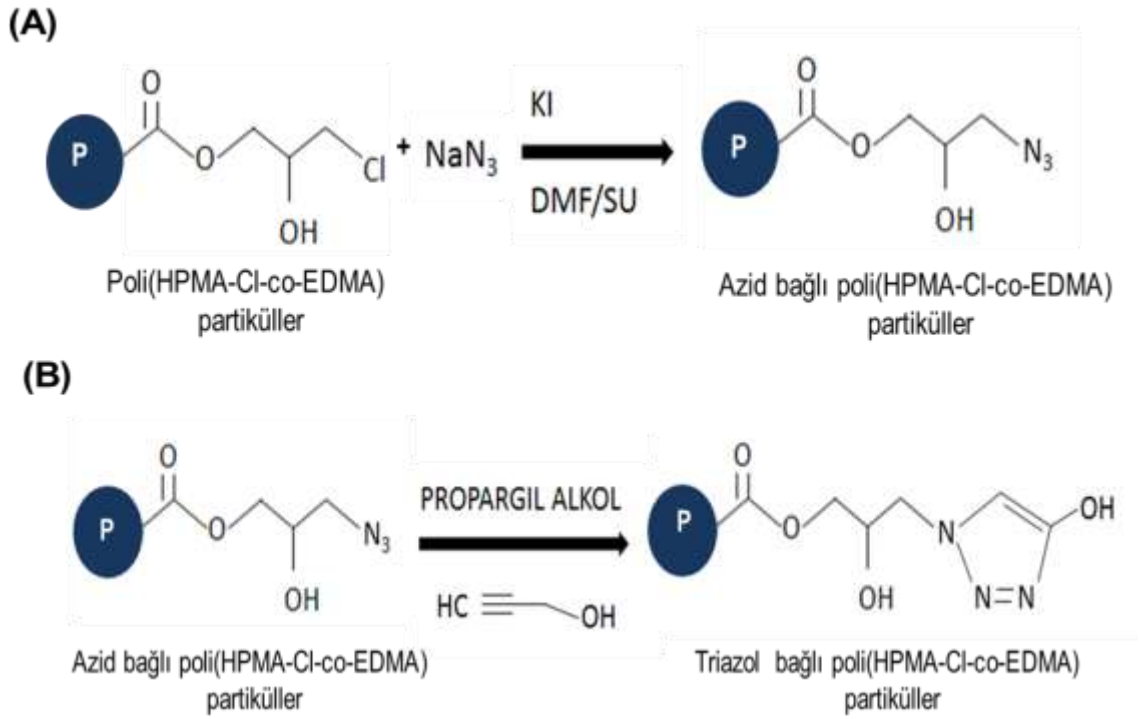


Şekil 3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere TEA-OH bağlanması

3.2.1.2. Kolay Bağlanma (Click Chemistry) Yöntemi ile Ligand Bağlanması

Kolay bağlanma yöntemi ile iki basamakta poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin yüzeyinde polar formda triazol halkasının oluşturulması sağlanmıştır. Her basamakta iki farklı reaksiyon sıcaklığı denenerek dört farklı sıcaklıkta polar kromatografik ligand, polimerik yapı üzerinde oluşturulmuştur. İlgili reaksiyon Şekil 3.4'te gösterilmektedir. Bu amaçla, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (2 g), tetrabutylamonyum iyodür (TBAI, 20 mg) içeren dimetil sulfoksit (DMSO, 60 mL) ortamında, iki farklı sıcaklıkta (80°C ve 60°C) ve 250 rpm karıştırma hızında 24 saat süre ile sodyum azid (NaN₃, 2 g) ile etkileştirilmektedir. Bu reaksiyonla

poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde azid grubunun oluşturulması sağlanmıştır (Şekil 3.4A). Bağlanma işlemi sonrasında partiküller ardışık santrifüjleme-dekantasyon yoluyla 3 kez DMSO, sonra distile su ile yıkanmıştır. İkinci basamakta azid bağlı partiküller (2 g), bakır(I) iyodür (CuI, 40 mg) içeren asetronitril (ACN) ortamında (20 mL) oda sıcaklığında veya 50°C sıcaklıkta, 250 rpm karıştırma hızında 24 saat süre ile propargil alkol (3 g) ile reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyon ile partikül yüzeyinde kolay bağlanma yoluyla triazol halkasının oluşumu sağlanmıştır (Şekil 3.4B). Bağlanma prosedürü Çizelge 3.2’de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Kolay bağlanma reaksiyonu ile (A) poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde azid grubunun oluşturulması (B) azid bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde triazol halkası içeren ligand formunun oluşturulması

Çizelge 3.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül yüzeyinde kolay bağlanma yoluyla triazol halkasının oluşum prosedürü

Kodu	Partikül (g)	Azidleme basamağı				Triazol halkası oluşum basamağı			
		NaN ₃ (g)	TBAI (mg)	DMSO (mL)	Sıcaklık (°C)	PA (g)	CuI (mg)	ACN (mL)	Sıcaklık (°C)
PT-1	2	2	20	60	60	3	40	20	50
PT-2	2	2	20	60	60	3	40	20	RT
PT-3	2	2	20	60	80	3	40	20	RT
PT-4	2	2	20	60	80	3	40	20	50

Partikül: Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) , NaN₃: Sodyum azid, TBAI: Tetrabutilamonyum iyodür, DMSO: Dimetil sülfoksit, PA: Propargil alkol, CuI : Bakır(I) iyodür, ACN: Asetonitril, RT: Oda sıcaklığı.

3.2.1.2. Zwitteriyonik Ligand Bağlanması

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere zwitteriyonik ligand bağlanması için atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) kullanılmıştır. Bu düşünce temelinde üç farklı yol izlenerek zwitteriyonik formdaki polimerik zincir, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller üzerinde oluşturulmuştur (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller üzerinde ATRP başlatıcı sentezi için değişen ATRP koşulları

Kodu	Partikül (g)	TEA-OH/DMF (mL/mL)	EDA/DMF (mL/mL)	CIPrTMS/Toluen (mL/mL)	BrlBuBr/THF (mL/mL)	Sıcaklık, Süre
A	1.5	10/20	-	3/30	-	120°C, 6 saat
B	1.5	-	10/20	-	2/20	60°C, 8 saat
C	1.5	-	-	-	-	-

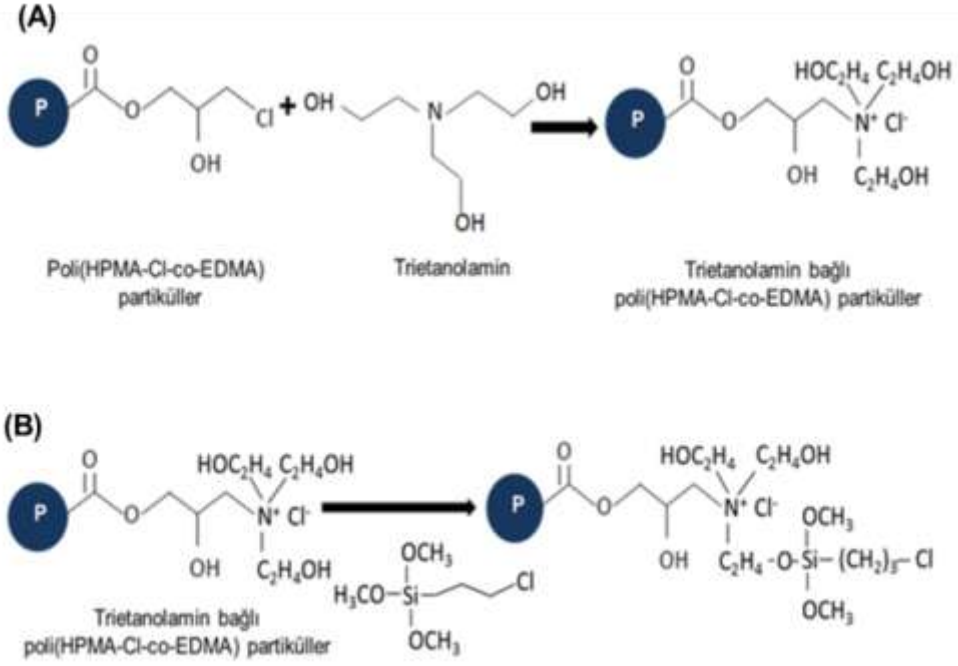
Partikül: Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) , TEA-OH: Trietanolamin, EDA: Etilendiamin, DMF: Dimetil formamid, CIPrTMS: Kloropropiltrimetoksisilan, BrIbuBr: 2-Bromoisobütrilbromür, THF: Tetrahidrofuran.

Çizelge 3.4. Zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirlerin partiküller üzerinde yüzey başlatıcılı ATRP yöntemi ile oluşumu

Kodu	Kullanılan partikül kodu	Partikül (g)	CuBr/BiPy (mmol/mmol)	MESH (mmol)	Su (ml)	Sıcaklık,
CIPrTMS-b-ATRP	A	1.5	0.2/0.5	10	10	60°C, 8 saat
BrIBuBr-b-ATRP	B	1.5	0.2/0.5	10	10	60°C, 8 saat
HPMA-Cl-b-ATRP	C	1.5	0.2/0.5	10	10	60°C, 8 saat

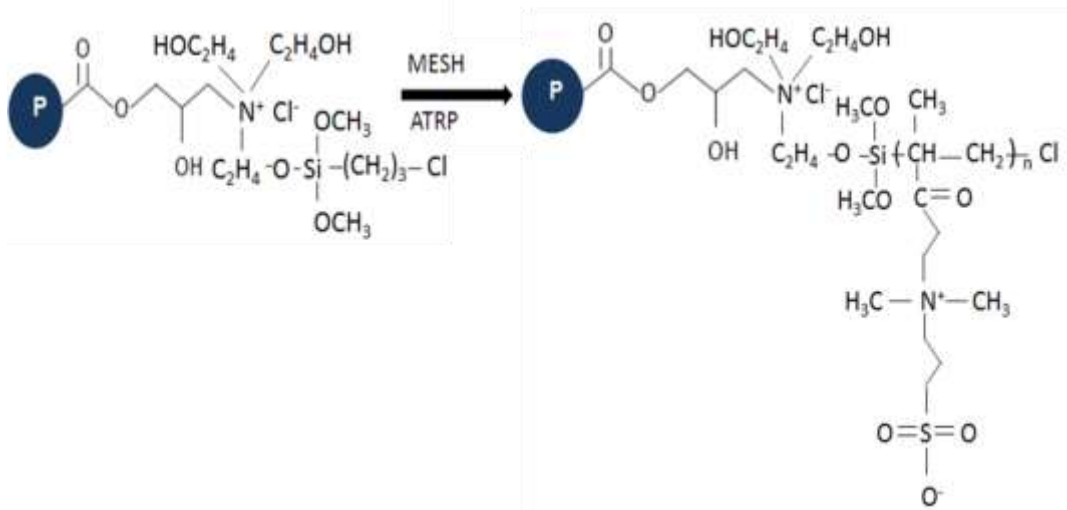
MESH: 2-Metakriloksietildimetil(3-sülfopropil) amonyumhidroksit, CuBr: Bakır (I) bromür
BiPy: Bipiridin.

Kullanılan ilk yöntemde çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen kloropropil grubuna sahip polimerik partiküller, ilk basamakta ATRP başlatıcısının partiküller üzerinde oluşturulması amacıyla trietanolamin (TEA-OH) kullanılarak türevlendirilmiş; sonraki basamakta ise kloropropiltrimetoksisilan'ın (CIPrTMS), partiküllere kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Bu amaçla poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g) DMF (20 mL) ortamında, TEA-OH (10 mL) ile etkileştirilmiştir (Şekil 3.5A). Reaksiyon 65°C sıcaklıkta, 24 saat süre ile 300 rpm karıştırma hızı ile çalkalamalı su banyosunda yapılmıştır. Elde edilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g), toluen (30 mL) ortamında CIPrTMS (3 mL) ile etkileştirilmiştir. Ortam 120°C'da 6 saat süreyle tutularak, TEA katalizörü (0.15 mL) varlığında CIPrTMS'nin partiküllere bağlanması sağlanmıştır (Şekil 3.5B). Partiküller önce metanol, daha sonra su ile 3 kez santrifüjleme-dekantasyon yöntemi ile yıkanmıştır



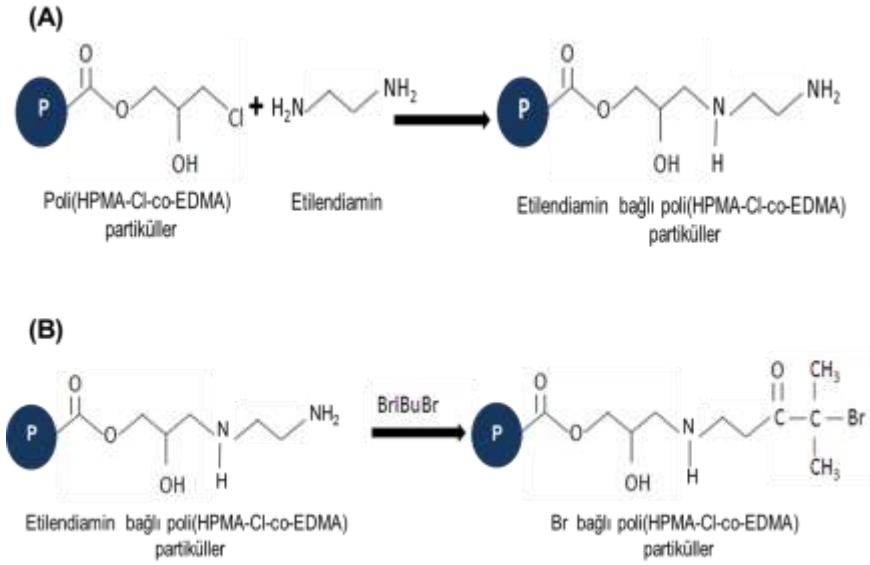
Şekil 3.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere (A) TEA-OH bağlanması, (B) TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere ClPrTMS bağlanması.

Son basamakta ise, zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirlerin Cl bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde yüzey başlatıcılı ATRP yöntemi ile oluşumu sağlanmıştır (Şekil 3.6). Bu amaçla, bir Schlenk reaktöründe MESH (10 mmol, 2.8 g) distile su (10 mL) içerisinde çözülerek, çözeltiye bakır (I) bromür (CuBr, Aldrich) (0.2 mmol) ve bipiridin (BiPy, Aldrich) (0.5 mmol) eklenmiştir. Son basamakta Cl bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g) polimerizasyon ortamında ultrasonikasyon ile dağıtılmıştır. Ortam N_2 ile 10 dakika süre ile yıkanmış ve vakumlanmıştır. Manyetik karıştırıcı ile 300 rpm hızla karıştırılan polimerizasyon ortamı 80°C sıcaklığa getirilerek ATRP, bu sıcaklıkta 24 saat süre ile 300 rpm karıştırma hızında yapılmıştır.



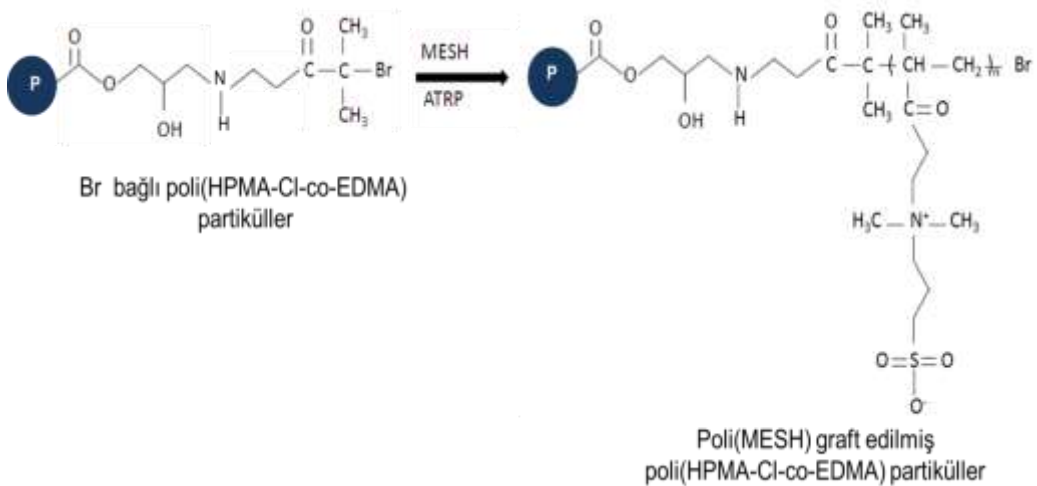
Şekil 3.6. Cl içeren partiküllerin üzerinde ATRP prosesi ile zwitteriyonik poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.

Kullanılan ikinci yöntemde ATRP başlatıcısının partiküller üzerinde oluşturulması amacıyla, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller EDA ile tepkimeye sokulmuştur. (Şekil 3.7A). Bu amaçla poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g), DMF (20 mL) ortamında, EDA (10 mL) ile etkileştirilmiştir. Reaksiyon 65°C sıcaklıkta, 24 saat süre ile 300 rpm karıştırma hızı ile çalkalamalı su banyosunda yapılmıştır. Elde edilen partiküllere -NH₂ grupları üzerinden ATRP için başlatıcı olarak kullanılacak terminal Br içeren BrIBuBr kovalent olarak bağlanmıştır (Şekil 3.7B). Bu amaçla, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller (1.5 g), THF (20 mL) ortamında dağıtılarak, sonuç dispersiyon buz banyosu içerisine alınmış ve +4°C'da tutulan dispersiyona BrIBuBr (2 mL), damla damla yaklaşık 5 dakikada eklenmiştir. Ortam 60°C'da 8 saat süreyle, 300 rpm karıştırma hızı varlığında bekletilerek BrIBuBr'ün partiküllere bağlanması sağlanmıştır. Partiküller önce THF, daha sonra metanol ve su ile 3'er kez ardışık santrifüleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak yıkanmıştır.



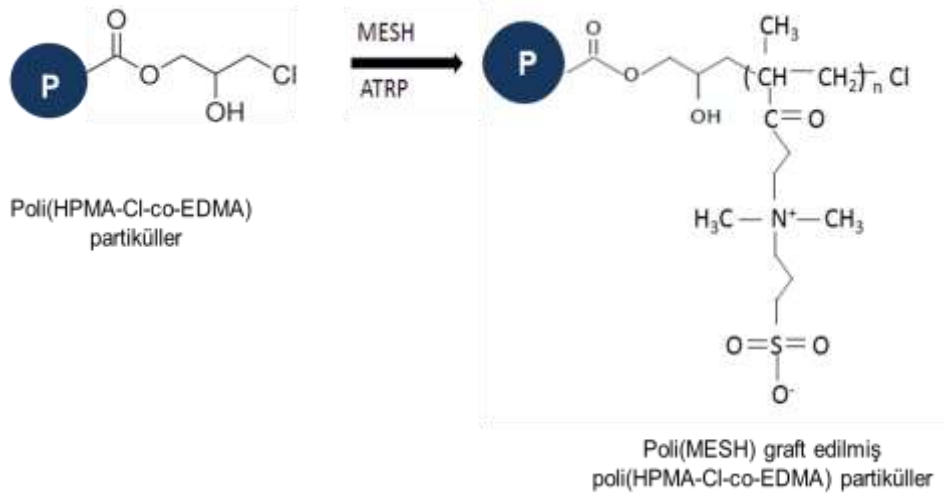
Şekil 3.7. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin BrBuBr ile reaksiyonu (A) EDA bağlanması, (B) BrBuBr bağlanması.

Zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirler, Br bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin üzerinde yüzey başlatıcılı ATRP yöntemi ile MESH monomerinin polimerizasyonu sonucu oluşturulmuştur (Şekil 3.8). Bu amaçla, ilk anlatılan ATRP yöntemi uygulanarak poli(MESH) graft edilmiş-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller elde edilmiştir.



Şekil 3.8. Br içeren partiküllerin üzerinde ATRP prosesi ile zwitteriyonik poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.

Üçüncü yöntemde ise yüzeyde bulunan Cl, başlatıcı olarak kullanılarak, zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirlerin poli(HPMA-Cl-co-EDMA) bazlı partiküller üzerinde ATRP yoluyla direkt olarak oluşumu sağlanmıştır (Şekil 3.9). Bu amaçla, ilk anlatılan ATRP yöntemi uygulanarak poli(MESH) graft edilmiş-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller elde edilmiştir.



Şekil 3.9. Cl içeren partiküllerin üzerinde direk ATRP prosesi ile zwitteriyonik poli(MESH) moleküler zincir oluşturulması.

3 farklı yöntem kullanılarak elde edilen poli(MESH) graft edilmiş-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) bazlı partiküller ardışık santrifüleme-dekantasyon yöntemi ile 3 kez distile-diyonize su ile yıkanmıştır.

3.2.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Karakterizasyonu

3.2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu

Poli(HPMA-cl-co-EDMA) partiküller, ortalama boy ve boy dağılım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle Şekil 3.10'da gösterilen taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope, SEM) (FEI, Quanta 200 FEG, A.B.D.) ile incelenmiştir. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller % 0.25'lik SLS çözeltisi içerisinde 1 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak ağırlıkça % 5 oranında partikül içerecek şekilde dağıtılmaktadır. Bu dispersiyondan 0.1 mL, SEM

cihazının örnek diski üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurutulmaktadır. Kurutulan örnekler plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme (physical vapor deposition) yöntemiyle yaklaşık 10 nm kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Altın ile kaplanan örnekler SEM cihazında ortalama boy ve boy dağılımının tespiti için yaklaşık 4000X, yüzey morfolojisinin incelenmesi için ise yaklaşık 20000X büyütme ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.10. Poli(HPMA-cl-co-EDMA) partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan Quanta 200 FEG SEM cihazı [250].

Ortalama boy değerinin tespiti için her bir örnek için alınan SEM fotoğrafında yaklaşık 100-200 partikülün boy ölçümleri yapılmış ve ortalama partikül boyu aşağıdaki ifade yardımıyla hesaplanmıştır [36-39].

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i} \quad (3.1)$$

$$CV = \left[\frac{\sum N_i (D_i - D_n)^2}{[N_T - 1]} \right]^{1/2} / D_n \times 100 \quad (3.2)$$

Burada D_n sayıca ortalama çap değerini (μm), N_i ise D_i (μm) çap değerine sahip partiküllerin sayısını ifade etmektedir.

Partiküllerin monodispers özelliği ise boy dağılımı için değişim katsayısı (coefficient of variation, CV) değeri hesaplanarak belirlenmiştir. CV değeri partikül boy standart sapma değerinin, sayıca ortama çap değerine oranıdır. CV değerleri

Eşitlik 3.2' ye göre hesaplanmıştır. Bu eşitlikte N_T , fotoğraftaki toplam partikül sayısını ifade etmektedir.

3.2.2.2. Ters Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC)

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ortalama gözenek boyutu, gözenek boy dağılımı ve gözeneklilik oranları ters büyüklükçe ayırma kromatografisi yöntemiyle belirlenmiştir. Öncelikle partiküller hareketli faz olarak etanol kullanımı ile 50 mm uzunluk ve 7.8 mm iç çap değerine sahip paslanmaz çelik kolonlara 20 MPa basınç altında dolgulanmıştır. İlgili dolgulama yöntemi literatürde yapılan bir çok benzer çalışmada kullanılmaktadır [40,51,159, 251-253]. Ters büyüklükçe ayırma kromatografisi yönteminde ortalama molekül ağırlığı ve moleküler çapı belli büyüklükçe ayırma kromatografisi standartları kullanılmıştır. Bu standartların Şekil 3.11'de gösterilen HPLC sisteminde, büyüklükçe ayırma kromatografisi modunda, gözenekliliği tayin edilecek olan materyal ile dolgulanmış kolonda alıkonma süreleri belirlenmiştir [252].



Şekil 3.11. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ortalama gözenek boyutu, gözenek boy dağılımı ve gözeneklilik oranlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan HPLC sistemi [254]

Yöntemde ortalama molekül ağırlığı değeri 180-80.000 Da arasında değişen dekstran standartlar (Sigma-Aldrich Co. A.B.D.) ve hareketli faz olarak su

kullanılmaktadır. Kolon dolumunu takiben 1 mL/dk akış hızında su ile 1 saat süreyle koşullandırılmakta ve su içerisinde 10 mg/mL derişiminde çözülerek hazırlanan dekstran standartlar ayrı ayrı enjekte edilerek (20 µL) kolona gönderilmektedir. Her bir standarda ait kromatogram refraktif indeks dedektörü (Refractive Index Detector-RID) ile kaydedilmektedir. Her bir kromatogramın pik tepe noktasından, standarda ait alıkonma süresi ve alıkonma süresinin akış hızı ile çarpımı ile o standarda ait alıkonma hacmi bulunmaktadır. Yöntemde fruktoz yani hem kolondaki partiküller arası boş hacme (inter-particular volume), hem de her bir partikülün içindeki bütün gözeneklere (intra-particular volume) girebilen boş-hacim izleyici molekülü (void-marker) olarak kullanılmaktadır. Ortalama molekül ağırlığı 80000 Da olan dekstran standardın ise yalnızca partiküller arası hacme (inter-particular volume) girebildiği kabul edilmektedir.

Kolondaki toplam partikül gözenek hacmi (V_p) Eşitlik 3.3 ile bulunmaktadır.

$$V_p = V_{180} - V_{80000} \quad (3.3)$$

Burada $V_{180} - V_{80000}$ sırasıyla fruktoz ve 80000 Da molekül ağırlığına sahip standartlar için alıkonma hacimlerini göstermektedir. Yöntem dekstran standartlar için standardın moleküler çapı ile molekül ağırlığı arasında

$$D_{si} = 0.062 (M_{wi})^{0.59} \quad (3.4)$$

bağıntısını kullanmaktadır [40,51,159, 251-253]. Yöntem bu bağıntı ile M_{wi} molekül ağırlığına sahip standardın gözenek çapı D_{si} 'den büyük bütün gözeneklere girebileceğini kabul etmektedir [251]. Buna göre molekül ağırlığı sırası itibariyle ardışık standartların alıkonma hacimleri arasındaki fark $[V_{i-1} - V_i]$, iki ardışık standartın düşük molekül ağırlıklı olanına karşı gelen gözenek boyutunun hacmini vermektedir. Her bir standart için elde edilen bu değer toplam partikül gözenek hacmine (V_p) bölünmesi ile belirli bir çapa sahip gözeneklerin hacimsel fraksiyonu elde edilmektedir (Eşitlik 3.5) [36].

$$X_i = \Delta V_{i-1} / V_p = \{[V_{i-1} - V_i] / V_p\} \times 100 \quad (3.5)$$

Gözenek boy dağılım eğrisi X_i değerinin $D_{s_{i-1}}$ değerine karşı grafiğe alınması ile hazırlanmaktadır. Medyan gözenek çapı (D_{pm}) ise gözenek dağılım eğrisindeki pik maksimum değer (ler)ini göstermektedir.

3.2.2.3. BET Yüzey Alanı Ölçüm Cihazı ile Karakterizasyon

Partiküllerin yüzey alanı Şekil 3.12'de gösterilen Quantochrome, Nova 2200e model Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (BET) ile belirlenmiştir. Yapılan ölçümlerde öncelikle partiküller 80°C 'da 24 saat süreyle kurutulmuştur. Ardından cihazın özel hücrelerine yerleştirilen partiküller 80°C 'de 6 saat süreyle vakumlanmış ve kalan nem tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardından ölçümler sıvı azot içerisinde yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm prensibi partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azotun buhar basıncından hesaplanması temeline dayanmaktadır. Analizler her bir örnekten yaklaşık olarak 0.1 g alınarak yapılmıştır. Cihazın 2 adet analiz istasyonuna sahip oluşu ile iki örneğin ölçümü birbirinden bağımsız ve eş zamanlı olarak yapılabilmektedir.



Şekil 3.12. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin yüzey alanlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan Quantochrome, Nova 2200e model Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçüm Cihazı (BET) [255]

3.2.2.4. Elementel Analiz ile Ligand İçeriklerinin Tayin Edilmesi

Ligand bağılı partiküllerin TEA-OH ve triazol halkası içerikleri (mg ligand/g partikül) cinsinden, Şekil 3.13'te gösterilen CHNS/O Elementel Analiz cihazı (Thermo-Scientific, Flash 2000, A.B.D.) ile azot tayini, poli(MESH) içerikleri ise kükürt tayini yapılarak tespit edilmiştir. Elementel analiz yoluyla öncelikle partikülün istenilen heteroatom (N veya S) içeriği belirlenmiş ve partikülde bağılı ligand'tan başka heteroatom kaynağı olmaması nedeniyle, ligandın heteroatom içeriği kullanılarak, bağılı ligand miktarı "mg ligand/g partikül" cinsinden ifade edilmiştir.



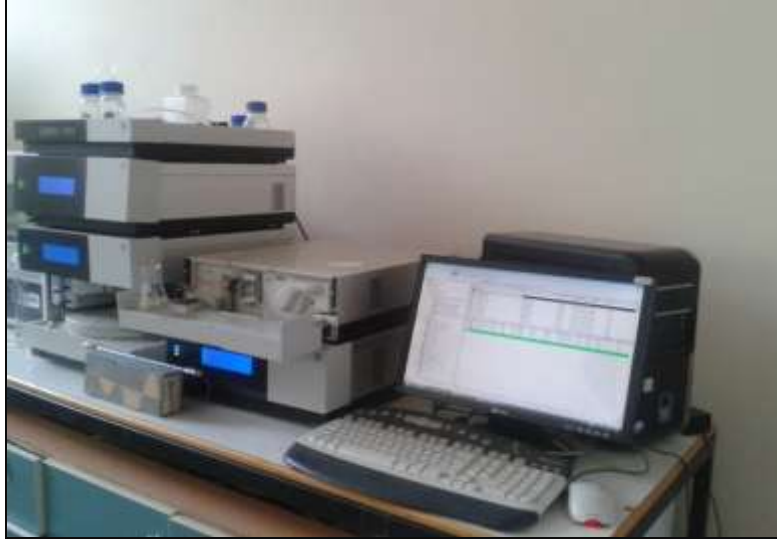
Şekil 3.13. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ligand içeriklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan CHNS/O Elementel Analiz (Thermo-Scientific, Flash 2000, A.B.D.) cihazı [256]

3.3. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC modunda Mikro-Sıvı Kromatografisi Performans Testleri

3.3.1. Ligand Bağılı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HPLC Kolonuna Dolgulanması

Ligand bağılı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin öncelikle ağırlıkça % 10 partikül içeren sulu süspansiyonu hazırlanmış ve bu süspansiyon enjektör ile paslanmaz çelik HPLC kolonuna (uzunluk 300 mm, iç çap: 2 mm) doldurularak, kolonun iki ucuna adaptörler takılmıştır. Bir HPLC pompası (Shimadzu, LD-10 ADVP, Japonya) ile kolondan 5 mL/dk akış hızı ile 15 dakika süreyle distile su geçirilerek,

partiküllerin kolon içerisinde, kolonun çıkış tarafına doğru dolgulanması sağlanmıştır. Kolondaki partiküllerin basılmasını takiben üst kısımda bulunan su, bir enjektör ile uzaklaştırılmış ve yerine yeni partikül süspansiyonu eklenerek HPLC pompasında distile su ile baskılama işlemi yinelenmiştir. Bu işlemlere ardışık olarak devam edilerek kolonun tamamının partiküller ile dolgulanması sağlanmıştır. Kolondaki partikül düzeyinin kolonunun üst sınırına ulaşmasını takiben akış hızı, kolon geri basınç değeri 250 bar oluncaya dek arttırılmış ve bu basınç değerinde kolondan distile su 15 dakika süreyle geçirilerek, yatak dolgusunun iyice baskılanması sağlanmıştır. Giriş tarafında partiküllerin basılmasıyla oluşan boşluk yeni partikül eklenerek doldurulmuş ve işlem ardışık olarak sürdürülmüştür. Kolondan 250 bar basınçta distile su geçişine kolon girişindeki yatak düzeyinde değişim olmayıncaya dek devam edilmiştir. Kolonun giriş tarafının baskılanmasını takiben akış yönü tersine çevrilmiş, ve yine 250 bar basınç altında distile su kolondan ters yönde 15 dakika süreyle geçirilerek, kolonun diğer ucunun baskılanması sağlanmıştır. Baskılanma sonucu oluşan boş hacme yeni partikül süspansiyonu eklenerek, baskılama işlemi yinelenmiş ve işleme seçilen kolon ucunda boşluk kalmayıncaya dek devam edilmiştir. Bu şekilde 250 bar basınç altında dolgulama işlemi tamamlanan kolondan 6 saat süreyle distile-deiyonize su geçirilmiştir. Partiküllerin geri-basınç akış hızı ilişkisi ise Şekil 3.14'te gösterilen mikro-sıvı kromatografisi (Dionex, Ultimate 3000, A.B.D.) sisteminde izokratik modda, hareketli faz olarak hacimce % 0.05 asetik asit içeren asetonitril/su (90/10 mL/mL) çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu hareketli faz, hidrofilik etkileşim kromatografisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılması nedeniyle seçilmiştir. Yapılan ölçümlerde hareketli faz akış hızı partikülün geri-basınç davranışına göre 0.1-1.0 mL/dk aralığında değiştirilerek, her bir akış hızında sistem 15 dakika bekletilmiş ve kolon ait geri-basınç değeri kaydedilmiştir. Yıkama işlemi tamamlanan kolonlar HILIC çalışmasında kullanılacak hareketli faz ile 2 saat süreyle 0.25 mL/dk akış hızında koşullandırılmıştır.



Şekil 3.14. Mikro-sıvı kromatografisi sistemi (mikro-LC)

3.3.2. Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküller ile HILIC Deneyleri

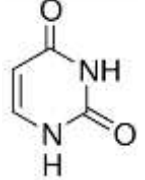
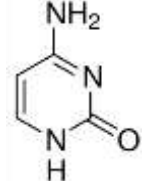
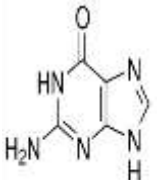
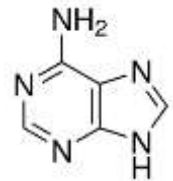
Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) çalışmaları, Dionex Ultimate 3000, A.B.D. mikro/nano-sıvı kromatografisi sisteminde ve izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolon, sisteme bağlanarak öncelikle hacimce % 0.05 asetik asit (AAc) içeren 90/10 (mL/mL) asetonitril/su çözeltisi ile 6 saat süre ile koşullandırılmıştır. Takiben yine % 0.05 AAc içeren ve çalışılacak ACN/su oranı ile hazırlanan hareketli faz ile 2 saat süre ile koşullandırılma işlemi yinelenmiştir. Bu işlem sonrasında istenilen analit karışımının enjeksiyonu yapılarak izokratik modda, analit karışımının son bileşeni kolonu terk edinceye kadar kromatografik ayırma işlemi sürdürülmüştür. Analit karışımının enjeksiyonu, otomatik olarak ve 1 μ L hacminde enjeksiyon döngüsü kullanılarak yapılmıştır.

HILIC deneylerinde analit karışımı olarak, yalnızca nükleosidler, peptidler, veya organik asitler içeren örnek karışımları ve bu grupların herbirinden seçilmiş analitleri bir arada içeren test karışımı kullanılmıştır. HILIC modunda yapılan kromatografik testlerde kullanılan analitlerin fiziksel özellikleri ve moleküler yapıları Çizelge 3.5'te verilmektedir.

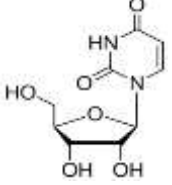
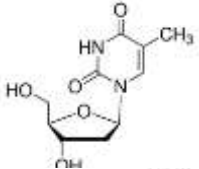
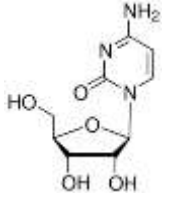
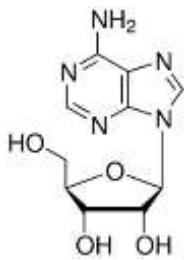
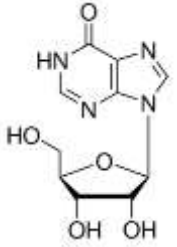
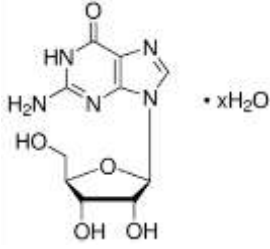
Her bir analit karışımı için öncelikle uygun pH değerinde hareketli faz ACN/su

oranı değiştirilerek, izokratik modda kromatografik deneyler yapılmıştır. Böylece kromatografik ayırımın yapılabildiği uygun ACN/su oranı belirlenmiştir. Belirlenen ACN/su oranı değerine sahip hareketli faz ile farklı akış hızlarında izokratik modda çalışılarak kromatogramlar alınmıştır. Kromatogramlar, UV dedektör kullanılarak ve çalışılan analit karışımı için literatürde önerilen uygun dalga boyu değeri seçilerek elde edilmiştir. Farklı hareketli faz akış hızları ve ACN/su oranları ile alınan kromatogramlarda, Bölüm 2.1.3'te verilen pik çözünürlüğü, alıkonma faktörü ve kademe yüksekliği gibi değerler hesaplanarak kolonların kromatografik performans analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.5. HILIC modunda yapılan kromatografik testlerde kullanılan analitlerin fiziksel özellikleri ve kimyasal yapıları

Analit	Temin edildiği firma	pKa	S _{su} (g/L)	S _{diğer} (g/L)	Kimyasal yapısı
<u>Nükleotidler</u>					
Urasil	Sigma Aldrich CO (Almanya)	9.5 [253,257]	çözünür [258]	alkollerde çözünmez [258]	
Sitozin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	4.68, 12.16 [253]	~7 [258]	alkollerde az çözünür [258]	
Adenin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	4.15, 9.8 [259]	~0.5 [258]	alkollerde az çözünür [258]	
Guanin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	9.92, 3.3, 9.2 [258,259]	çözünmez [258]	seyreltik asit çöz. (0.1 N HCl) veya KOH çözeltilerinde çözünür [258]	

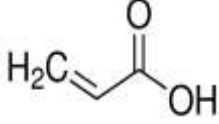
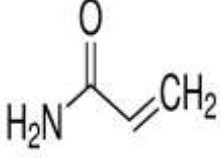
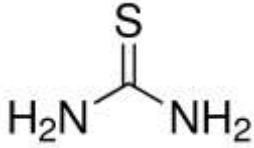
Çizelge 3.5. devam ediyor

Analit	Temin edildiği firma	pKa	S _{su} (g/L)	S _{diğer} (g/L)	Kimyasal yapısı
<u>Nükleosidler</u>					
Üridin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	8.5 [260]	çözünür [258]	alkollerde, DMSO, DMF, ACN, asetonda az çözünür [261]	
Timidin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	9.72, [261]	çözünür [258]	metanol,aseton kloroform,etil asetatta çözünür [258]	
Sitidin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	4.22, 12.5 [258]	çözünür [258]	alkollerde az çözünür [258]	
Adenozin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	3.7, [260]	çözünür	alkollerde çözünmez [258]	
İnosin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	8.8-9 [260]	16 [258]	----	
Guanozin	Sigma Aldrich CO (Almanya)	2.1, 9.2 [262]	~1 [258]	----	

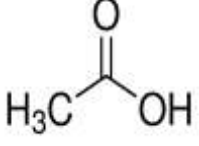
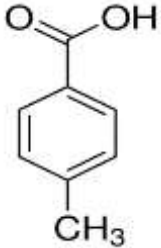
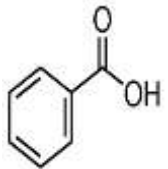
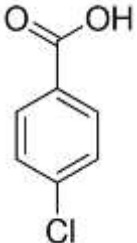
Çizelge 3.5. devam ediyor

Analit	Temin edildiği firma	pKa	S _{su} (g/L)	S _{diğer} (g/L)	Kimyasal yapısı
--------	----------------------	-----	-----------------------	--------------------------	-----------------

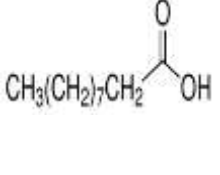
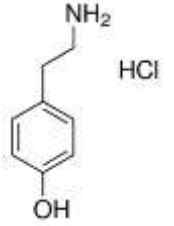
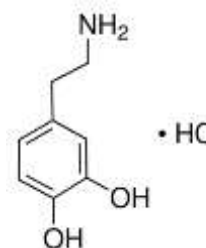
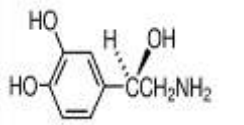
Akrilik Bileşenler

Akrilik asit	Sigma Aldrich C.O Almanya	4.35 [261]	çözünür [263]	-----	
Akrilamid	BDH Chemicals England	-----	çözünür [264]	-----	
Tiyüre	Sigma Aldrich Almanya	-----	çözünür [265]	-----	

Organik asitler

Asetik asit	Merck A. G. (Almanya)	4.76 [266]	çözünür [266]	-----	
p-Toluik asit	Sigma Aldrich C.O (Almanya)	4.27 [261]	sıcak suda çözünür [267]	asetonda çözünür [267]	
Benzoik asit	Sigma Aldrich C.O (Almanya)	4.2 [268]	2.9 [268]	alkoller,benzen ve eterde çözünür [268]	
					

Çizelge 3.5. devam ediyor

Analit	Temin edildiği firma	pKa	S _{su} (g/L)	S _{diğer} (g/L)	Kimyasal yapısı
4-Klorobenzoik asit	Sigma Aldrich C.O (Almanya)	----	sıcak suda çözünür [269]	-----	
n-Dekanoik asit	Sigma Aldrich C.O (Almanya)	----	çözünmez [270]	alkol ve eterde çözünür [270]	
<u>Katekolaminler</u>					
Tiramin hidroklorür	Sigma Aldrich C.O. Almanya	-----	~50 [271]	-----	
Dopamin hidroklorür	Sigma Aldrich C.O. Almanya	-----	çözünür [272]	~20 (alkolde) [272]	
Norepinefrin	Sigma Aldrich C.O. Almanya	8.85, 9.50 [273]	~12.5 [273]	----	

pKa: Asit ayrışma değeri, S: çözünürlük (g/L).

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

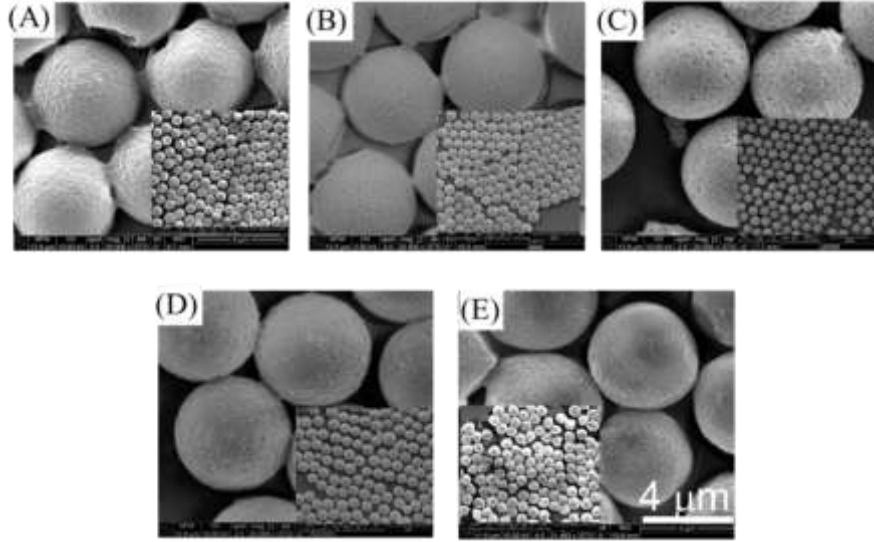
Tez kapsamında eşboyutlu-gözenekli formda poli(3-kloro-2-hidroksipropil metkarilat), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş, partiküllere farklı HILIC ligandlarının bağlanması sağlanmış ve türevlendirilen partiküllerin karakterizasyonu yapılmıştır. Sonraki basamakta partikül bazlı mikrobor kolonların mikro-sıvı kromatografisi sisteminde, HILIC modunda kromatografik performans testleri yapılmış, geliştirilen kolonların, polar organik moleküller ve polar biyokimyasalların kromatografik ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir.

4.1. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi için Sabit Faz Geliştirilmesi

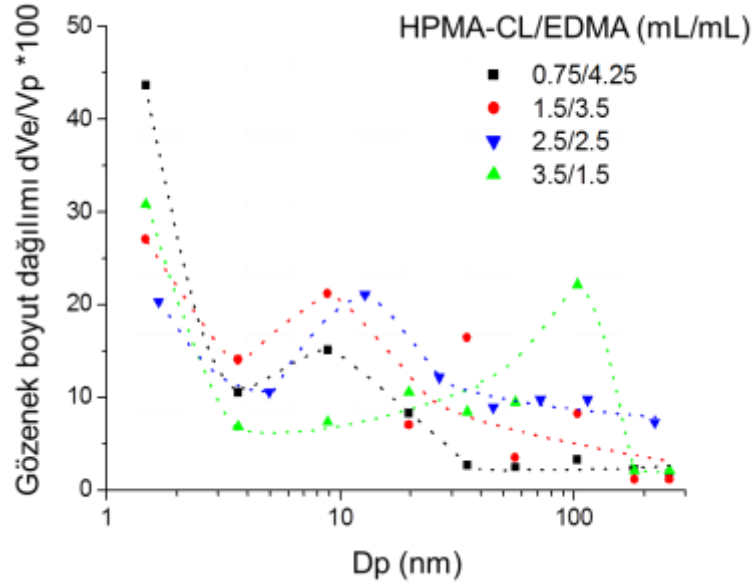
4.1.1. Eşboyutlu-Gözenekli Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

HILIC'de kullanılacak eşboyutlu-gözenekli partikül formunda sabit fazların eldesi için, çıkış materyali olarak hidrofilik formda, kolay türevlendirilebilme yeteneğine sahip ve literatürde daha önce kullanılmamış bir polimerik yapı, poli (3-kloro-2-hidroksipropil metakrilat-co-etilen-dimetakrilat), poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kopolimeri seçilmiştir. Eş boyutlu ve gözenekli poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül sentezinin ilk basamağında çıkış lateksi, dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilmiş, daha sonra çok basamaklı mikrosüspansiyon tekniği ile monomer faz bileşimi değiştirilerek mikrobor kolonda kullanıma uygun ortalama partikül boyutu ve gözeneklilik özelliklerine sahip partiküllerin eldesi sağlanmıştır.

Monomer faz bileşimi değiştirilerek elde edilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin partikül boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.1'de sunulmuştur. Üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ters büyüklükçe ayırma kromatografisi yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri ise Şekil 4.2'de verilmektedir. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için gerek SEM fotoğrafları, gerekse gözenek dağılım eğrilerinin değerlendirilmesi ile tayin edilen boy ve gözeneklilik özellikleri ise Çizelge 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin SEM fotoğrafları. HPMA-Cl/EDMA oranı (mL/mL): (A) 0.75/4.25, (B) 1.5/3.5, (C) 2.5/2.5, (D) 3.5/1.5, (E) 4.25/0.75. Büyütme oranı: Büyük resim: X20000, Küçük resim: X4000



Şekil 4.2. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ters büyüklükçe ayırma kromatografisi yöntemi ile elde edilen gözenek boy dağılım eğrileri

Çizelge 4.1. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin boy ve gözeneklilik özellikleri

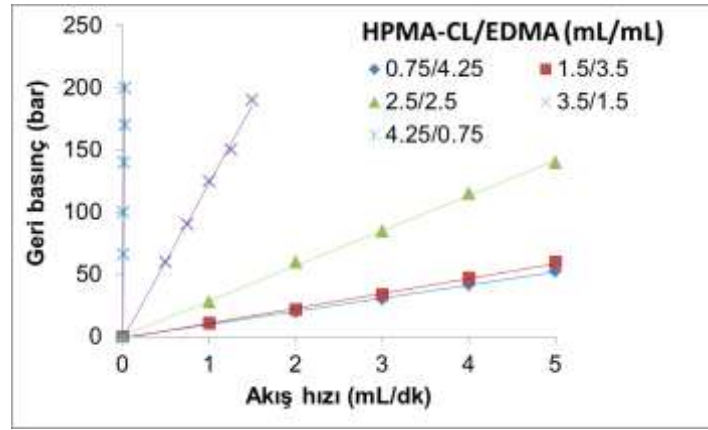
HPMA-Cl/EDMA ^a (mL/mL)	Dp ^b (µm)	CV ^c (%)	dm ^d (nm)	ε ^e (%)	ÖYA ^f (m ² /g)
0.75/4.25	5.14	4.58	9	33.2	146.3
1.50/3.50	4.80	4.92	9	40.5	65.2
2.50/2.50	5.50	3.30	14	45.9	60.0
3.50/1.50	5.40	4.51	106	29.4	14.7
4.25/0.75	4.95	4.32	t.e.	t.e.	2.1

a: Monomer faz bileşimi, b: Ortalama partikül boyu, c: Boy dağılımı için değişim katsayısı, d: Medyan gözenek boyutu, e: Gözeneklilik oranı, f: Özgül yüzey alanı. t.e.: tayin edilmedi.

Buradan görüldüğü gibi monomer faz bileşiminin değişmesi, bir başka deyimle monomer fazındaki çapraz bağlayıcı derişiminin değişmesi, ortalama partikül boyu ve boy dağılımı değişim katsayısı değerinde önemli değişime neden olmamaktadır. Bu durum ortalama partikül boyu ve boy dağılımının kullanılan monomer/çıkış lateksi oranı tarafından kontrol edilmesinden kaynaklanmaktadır. Farklı monomer/faz bileşimleri ile elde edilen partiküllerin SEM fotoğraflarına bakıldığında yüzey gözenekliliğinin özellikle % 50'den büyük çapraz bağlayıcı (EDMA) derişimlerinde daha belirgin olduğu söylenebilir (Şekil 4.1). Bu çapraz bağlayıcı derişim aralığında gözeneklilik oranı değerlerinin de yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Yine aynı çizelgeden, artan çapraz bağlayıcı derişimi ile partikül özgül yüzey alanı değerinin de belirgin şekilde artış gösterdiği gözlenmektedir. Bu durum Şekil 4.2'de verildiği gibi yüksek çapraz bağlayıcı derişimleri ile küçük gözenek fraksiyonlarının ağırlıklı olduğu partiküllerin eldesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum farklı kimyasal yapıya sahip eşboyutlu-gözenekli partiküllerin sentezi için önerilen partikül oluşum mekanizmasına göre artan çapraz bağlayıcı derişimi ile mikropartikül formu içerisinde gözenek yapıcı

çözücü varlığında daha küçük çapraz bağlı nanopartiküllerin oluşumu ve agregasyonu ile açıklanmaktadır [36,37,248]. Buradan görüldüğü gibi geliştirilen yöntem, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin eşboyutlu-gözenekli formda üretimine imkan vermektedir. Değişim katsayılarının küçük oluşu da monodispersiteyi işaret etmektedir.

Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için kolon geri-basıncının hareketli faz akış hızı ile değişimi ise Şekil 4.3'te verilmektedir.



Şekil 4.3. Farklı monomer faz bileşimleri ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için kolon geri-basıncının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kolon: 50x7.8 mm i.ç., Hareketli faz: distile su

Buradan görüldüğü gibi sabit akış hızı değerinde kolon geri-basıncı artan çapraz bağlayıcı derişimi ile belirgin bir azalma göstermektedir. Bu durum artan çapraz bağlayıcı derişimi ile kolon gözenekliliğinin (partikül içi ve partiküller arasının toplamı) artmasından kaynaklanmaktadır. Çapraz bağlayıcı derişimi ile partikül boyutunun yaklaşık olarak sabit kalması nedeniyle, ilgili etkinin büyük ölçüde partikül içi gözeneklilik artışından kaynaklandığı söylenebilir. Burada da 4.25/0.75 mL/mL HPMA-Cl/EDMA oranı ile üretilen partiküllerde kolon geri-basınç değerinin çok yüksek olmasından ötürü, ters-büyükölçüde ayırma kromatografisi yöntemiyle gözenek boy dağılımı ve gözeneklilik tayini yapılamadığı da görülmektedir.

Elde edilen partiküllerin boy, gözeneklilik ve geri basınç özelliklerinin değerlendirilmesi sonucunda 2.5/2.5 mL/mL HPMA-Cl/EDMA oranı ile üretilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ligand bağlanması amacıyla destek materyali olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.2. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Türevlendirilmesi ve Karakterizasyonu

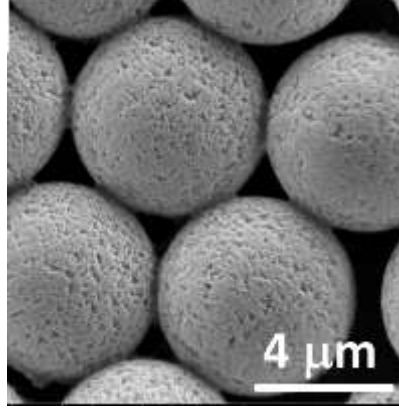
4.1.2.1. TEA-OH Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Karakterizasyonu

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere TEA-OH bağlanması, partiküllerin kloropropil grubu ile TEA-OH'ın tersiyer amin grubu arasındaki tek basamaklı reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Bağlanma reaksiyonu sonrasında partiküllerin SEM ile yüzey morfolojisi ve gözenek yapısı, BET yüzey alanı ölçüm sistemi ile özgül yüzey alanı ve elementel analiz ile ligand içerikleri tayin edilerek, ligand bağlı partikül özellikleri belirlenmiştir. Bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.4'te verilmektedir. Buradan TEA-OH bağlanması ile poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin yüzey morfolojisinde önemli bir değişim meydana gelmediği ve yüzeyin gözeneklilik özelliklerinin korunduğu görülmektedir.

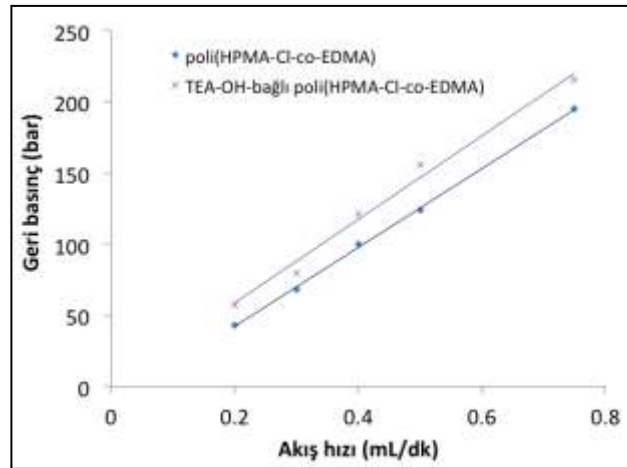
Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için $60 \text{ m}^2/\text{g}$ olan özgül yüzey alanı değeri TEA-OH bağlanması ile $48.4 \text{ m}^2/\text{g}$ değerine düşmektedir. Bu durum mikrogözeneklerin bir kısmının TEA-OH ile dolmasından kaynaklanmaktadır. TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ligand içeriği ağırlıkça %1.19'dur. Azot tayini için yapılan elemental analizler istenilen ligandın yapıya bağlandığını göstermiştir. Literatürde HILIC kromatografik sabit faz sentezine yönelik benzer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen ligand içeriklerinin HILIC modunda kromatografik kullanım için uygun aralıkta olduğu düşünülmektedir [48,50]

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ve TEA-OH ile türevlendirilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile mikrobör kolonda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Her iki durumda da artan akış hızı ile geri basınç değerlerinin doğrusal şekilde arttığı gözlenmektedir. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-

co-EDMA) partiküller ile dolgulanan kolonun geri-basınç değeri daha sabit akış hızı için daha yüksektir. Geri basınç değerindeki doğrusal artış kolon materyalinde artan basınçta deformasyon oluşmadığının göstergesi olup, 0.20-0.75 mL/dk akış hızı aralığında sorunsuz bir şekilde kromatografik analiz yapılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.4. TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı. Büyütme oranı: X19000



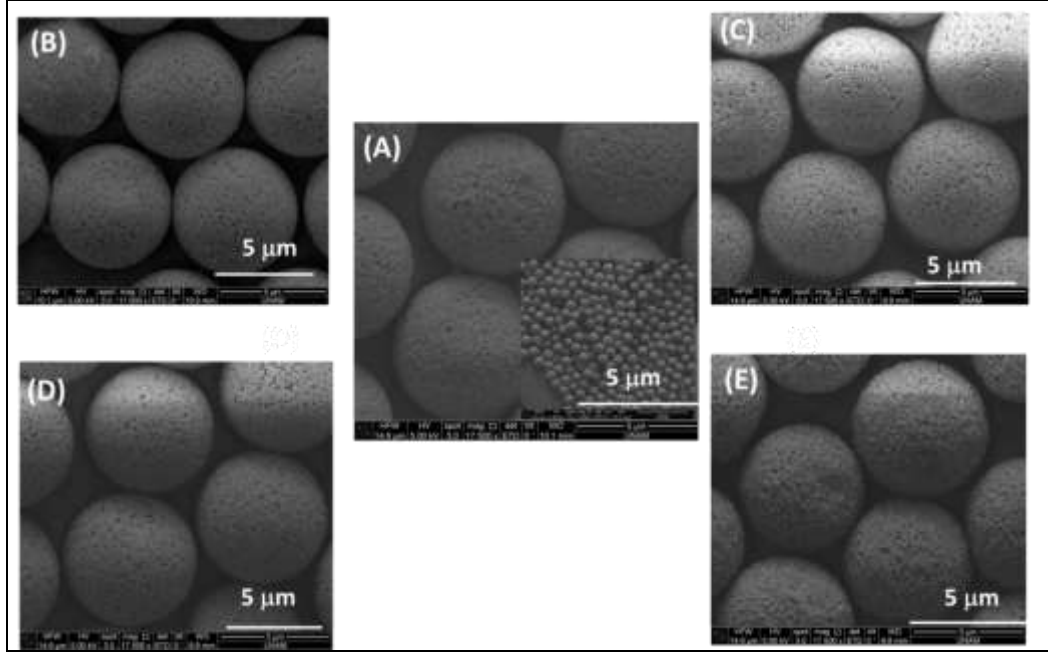
Şekil 4.5. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve TEA-OH ile türevlendirilen poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanan mikrobor kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAc içeren 90/10 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300 x 2 mm iç çap.

4.1.2.2. Triazol Halka Formunda Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Kullanımı

Eşboyutlu ve gözenekli yapıda poli(HPMA-Cl-Co-EDMA) partiküller kolay bağlanma (click chemistry) yöntemi kullanılarak polar triazol ligandı içeren forma dönüştürülmüş ve HILIC deneylerinde sabit faz olarak kullanılmıştır. Bu amaçla, poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller önce sodyum azid ile etkileştirilerek klor grubu azid formuna dönüştürülmüş, takiben alkin grubu içeren propargil alkol ile tepkimeye sokularak hidroksimetil grubu içeren triazol halkası formunda polar ligandın partikül üzerinde oluşumu sağlanmıştır. Bağlanma yöntemleri, ligand bağlanması sırasında farklı çözücü ve sıcaklıklar denenerek oluşturulmuş ve yapılan karakterizasyonlar ile uygunluğu gösterilmiştir.

Triazol bağlanma reaksiyonu öncesi ve sonrasında partiküllerin yüzey morfolojilerini ve gözenek yapısını gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.6'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi ligand bağlanması ile normal partiküllere kıyasla partikül bütünlüğü, yüzey morfolojisi ve gözenek yapısında ligand bağlama işlemi ile önemli bir değişim olmamaktadır. Türevlendirme sonrası poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin heteroatom ve bağlı ligand içerikleri ile bağlanma reaksiyonu sonrasında ölçülen özgül yüzey alanları Çizelge 4.2'de verilmektedir.

Buradan görüldüğü gibi partiküllerin bağlı ligand içerikleri, ligand türüne göre ağırlıkça % 1.0-4.0 aralığında değişmektedir. Azot tayini için yapılan elemental analizler istenilen ligandların yapıya bağlandığını göstermiştir. Literatürde HILIC kromatografik sabit faz sentezine yönelik benzer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen ligand içeriklerinin HILIC modunda kromatografik kullanım için uygun aralıkta olduğu düşünülmektedir [48,50].



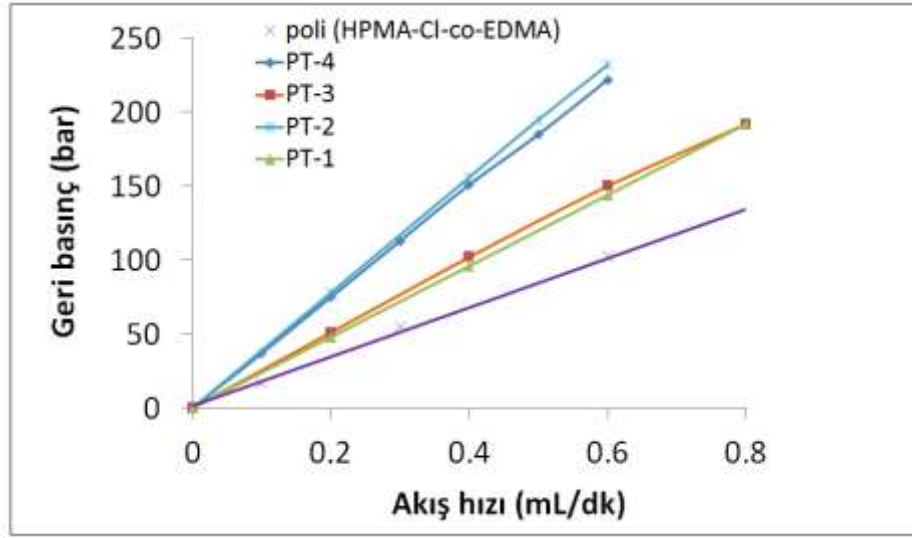
Şekil 4.6. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin ve farklı koşullarda propargil alkol bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları. Partikül (A) Normal partikül, (B) PT-1 (60/50), (C) PT-2 (60/RT), (D) PT-3 (80/RT), (E) PT-4 (80/50) .

Çizelge 4.2. Ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin gözeneklilik özellikleri ve ligand içerikleri

Partikül Kodu (Sentez sıcaklıkları)	Heteroatom	%Heteroatom	Ligand (mg/g partikül)	ÖYA (m ² /g)
P-T1 (60/50)	N	0.94	18.8	60.0
P-T2 (60/RT)	N	0.93	18.6	53.0
P-T3 (80/RT)	N	3.41	68.2	48.0
P-T4 (80/50)	N	3.68	73.6	60.0

ÖYA: Özgül yüzey alanı

Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ve ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile doldurulan kolonlardan elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Türevlendirme sonrası; ligand bağlı partiküller ile doldurulan kolonun geçirgenliği, gözeneklerin ligand molekülleri ile kapatılmasına bağlı olarak azalmıştır. Artan akış hızı ile geri basınç değerlerinin doğrusal şekilde arttığı gözlenmektedir. Geri basınç-akış hızı grafiği 0.1-0.6 mL/dk akış hızı aralığında kromatografik analiz yapılabileceğini göstermektedir.

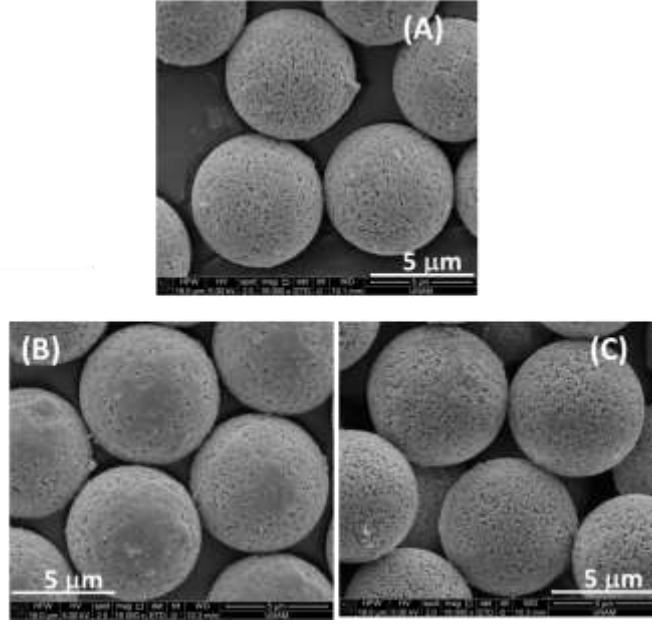


Şekil 4.7. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve farklı koşullarda propargil alkol bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanan mikrobor kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAc içeren 94/6 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300x2 mm iç çap.

4.1.2.3. Zwitteriyonik Ligand Bağlı Eşboyutlu-Gözenekli Formdaki Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin Eldesi ve Karakterizasyonu

Zwitteriyonik formda makromoleküler ligand, sentezlenen reaktif poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile uygun koşullarda etkileştirilerek, partiküller üzerine kovalent olarak bağlanmıştır. Bu gruptaki çalışmalarda zwitteriyonik sülfobetain grubu içeren poli(MESH) moleküler zincirleri, ATRP yöntemi ile poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül yüzeylerine bağlanmıştır.

Eşboyutlu-gözenekli formdaki poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllere poli(MESH) moleküler zincirlerinin bağlanmasında üç farklı yöntem izlenmiştir. Amaç zincir uzunluğunu ve polariteyi değiştirerek farklı gözenek yapısına, polariteye ve dolayısıyla farklı kromatografik ayırma yeteneğine sahip partikül bazlı kolonların eldesidir. Bağlanma reaksiyonu sonrasında partiküllerin yüzey morfolojilerini ve gözenek yapısını gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.8’de verilmektedir.



Şekil 4.8. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında yüzey morfolojilerini gösteren SEM fotoğrafları. Partikül türü (A) ClPrTMS-b-ATRP, (B) BrIBuBr-b-ATRP, (C) HPMA-Cl-b-ATRP partiküller

Buradan görüldüğü gibi ligand bağlanması ile normal partiküllere kıyasla partikül bütünlüğü, yüzey morfolojisi ve gözenek yapısında önemli bir değişim olmamaktadır.

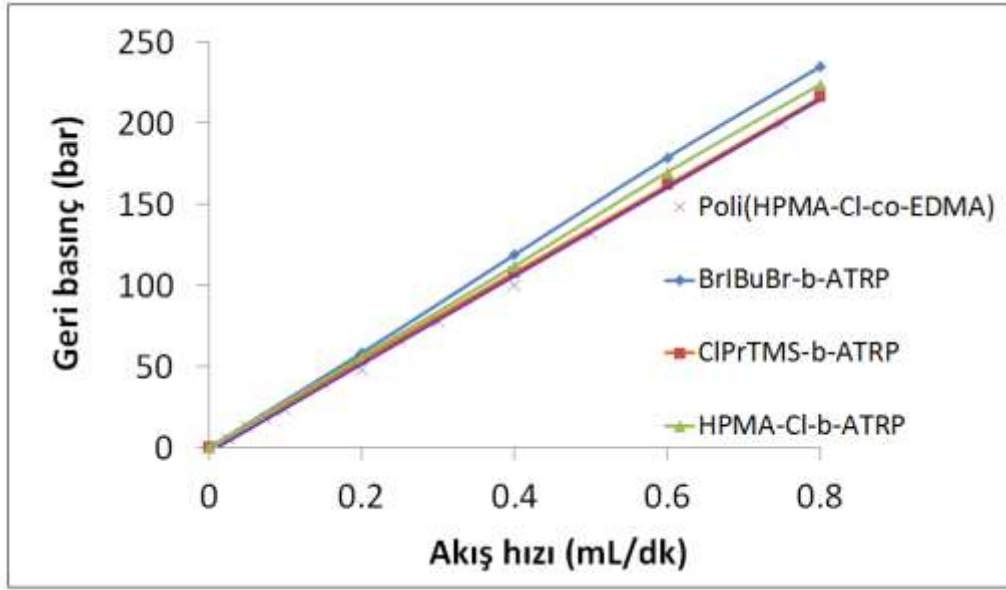
Zwitteriyonik ligand bağlanan poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin heteroatom ve bağlı ligand içerikleri ile bağlanma reaksiyonu sonrasında ölçülen özgül yüzey alanları Çizelge 4.3’te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin gözeneklilik özellikleri ve ligand içerikleri

Partikül	Heteroatom	%Heteroatom	Ligand (mg/g partikül)	ÖYA (m ² /g)
CIPrTMS-b-ATRP	S	0.29	25.3	35.1
BrIBuBr-b-ATRP	S	1.71	149.2	13.5
HPMA-Cl-b-ATRP	S	0.31	27.1	49.5

ÖYA: Özgül yüzey alanı

Kükürt tayini için yapılan elemental analizler istenilen ligandların yapıya bağlandığını göstermiştir. Buradan görüldüğü gibi partiküllerin ligand içerikleri, başlatıcı türüne göre ağırlıkça % 0.29-1.70 aralığında değişmektedir. Literatürde HILIC kromatografik sabit faz sentezine yönelik benzer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen ligand içeriklerinin HILIC modunda kromatografik kullanım için uygun aralıkta olduğu görülmektedir [48,50]. Türevlendirme sonrası, partikül özgül yüzey alanı değerinde yaklaşık % 20-70 aralığında bir azalma ortaya çıkmaktadır. Bu davranış, gözeneklerin bir kısmının ligand molekülleri ile kapatılmasından ve ligandın makromoleküler formda olmasından kaynaklanmaktadır. Zwitteriyonik ligand içeren poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin bağlanma reaksiyonu sonrasında kolon geri basıncının hareketli faz akış hızı ile değişimi ise Şekil 4.9'da verilmektedir.

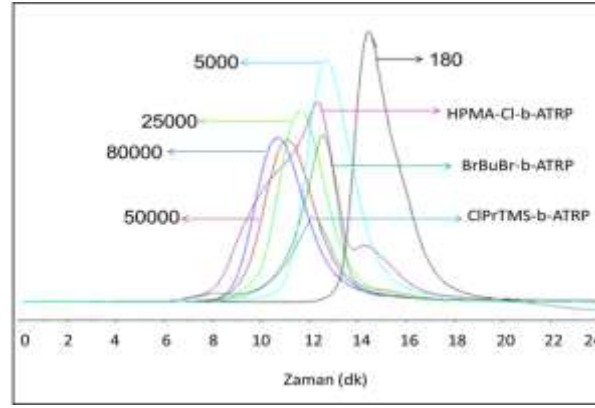


Şekil 4.9. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) ve farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgularan mikrobör kolonlarda elde edilen geri-basınç-akış hızı grafikleri. Hareketli faz: % 0.05 AAç içeren 90/10 mL/mL ACN/su. Kolon boyutu: 300x2 mm iç çap.

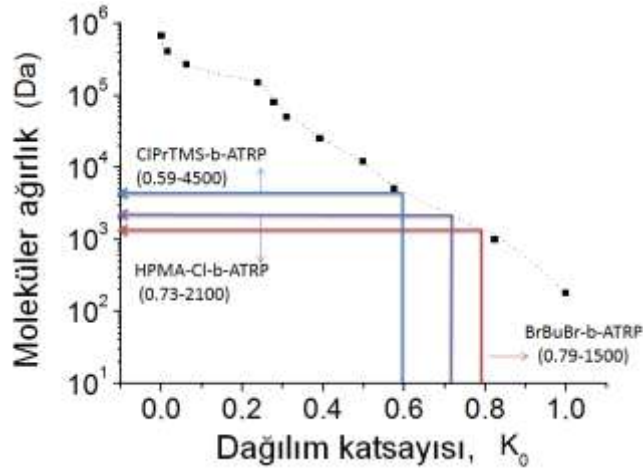
Buradan görüleceği üzere gözeneklerin bir kısmının ligand molekülleri ile kapatılmasına bağlı olarak kolon geçirgenliğinde oluşan düşme nedeniyle, ligand bağlı partiküllerde, bağlı olmayan partikülle kıyasla, sabit akış hızında biraz daha yüksek geri-basınç değerleri gözlenmektedir. Burada HILIC deneylerinde kullanılması planlanan kolon boyutu seçilmiş, HILIC deneylerinde yaygın olarak tercih edilen bir hareketli faz türü kullanılarak geri-basınç değerleri not edilmiştir. Bağlanan bütün ligandlar için çalışılacak akış hızı aralığında kolon-geri basıncının hareketli faz akış hızı ile değişiminin doğrusal ve mikro-sıvı kromatografisi sistemi için makul bir aralıkta olduğu elde edilen davranıştan görülmektedir. Özellikle, geri-basınç akış hızı ilişkisinde doğrusaldan sapan (genellikle parabolik) bir değişimin gözlenmemiş olması seçilen partiküllerin, partikül boyunun ve gözenekliliğinin ve uygulanan ligand bağlama yönteminin mikro sıvı kromatografisi sisteminde HILIC modunda çalışma için uygun olduğunu göstermektedir.

Üç farklı polimerin ortalama molekül ağırlığı büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC) tekniği ile hesaplanmıştır. Suda çözenen polimerlerin molekül ağırlığı tayini için büyüklükçe ayırma kromatografisinde dekstran standartları ile elde edilen

kromatogramlar Şekil 4.10'da gösterilmektedir. GPC kromatogramlarından elde edilen sonuçlara göre, belirli kütle ağırlıklarındaki dekstran standartların analiz sırasında vermiş oldukları pik maksimum noktaları kullanılarak, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 4.11) Bu eğri yardımıyla sentezlenen polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları HPMA-Cl-b-ATRP, BrBuBr-b-ATRP ve ClPrTMS-b-ATRP partiküller için sırasıyla 2200, 1500, 4500 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Ortalama molekül ağırlıkları M_w : 180-80.000 Da olan dekstran standartlar kullanılarak elde edilen kromatogramlar . Hareketli faz: su, Akış hızı: 0.1 mL/dk, Kolon: 50 x 7.8 mm i.d. Dedektör: RID



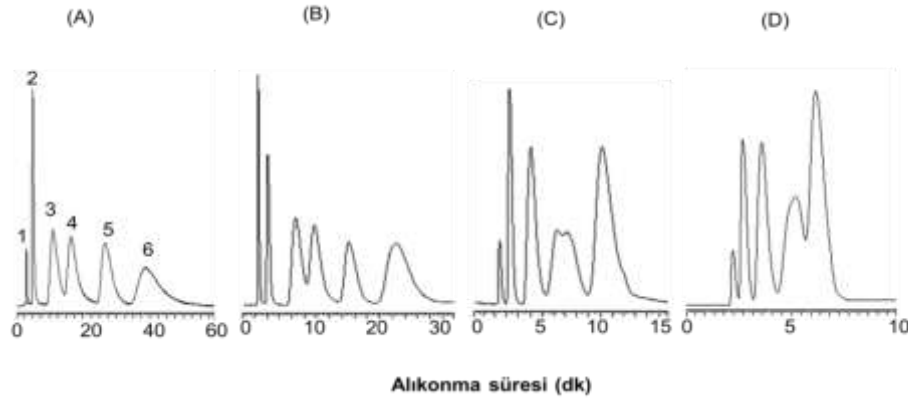
Şekil 4.11. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller için dekstran standartlar ile elde edilmiş SEC kalibrasyon eğrisi.

4.2. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Performans Testleri

Bu bölümde, yapılan kromatografik deneylerde ayırma ortamı olarak farklı hidrofilik ligandlar ile türevlendirilmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri içeren mikrobor kolonların kromatografik performansları hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) modunda incelenmiştir.

4.2.1. TEA-OH Bağlı-Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) Partiküllerin HILIC Modunda Sabit Faz Olarak Kullanılması ile Yapılan Kromatografik Çalışmalar

TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikül bazlı kolon ile yapılan kromatografik çalışmalar izokratik koşullarda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada öncelikle hareketli faz için uygun asetonitril/su (ACN/su) oranının belirlenmesi sağlanmıştır. Takiben en uygun ACN/su oranı ile farklı akış hızlarında kromatografik ayırma davranışı incelenmiştir. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda, farklı ACN/su oranları ile elde edilen kromatogramlar Şekil 4.12'de verilmektedir. Kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.4'te verilmektedir.



Şekil 4.12. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile test karışımının izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 260 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 96.5/3.5, (B) 95.0/5.0, (C) 92.5/7.5, (D) 90.0/10.0, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin.

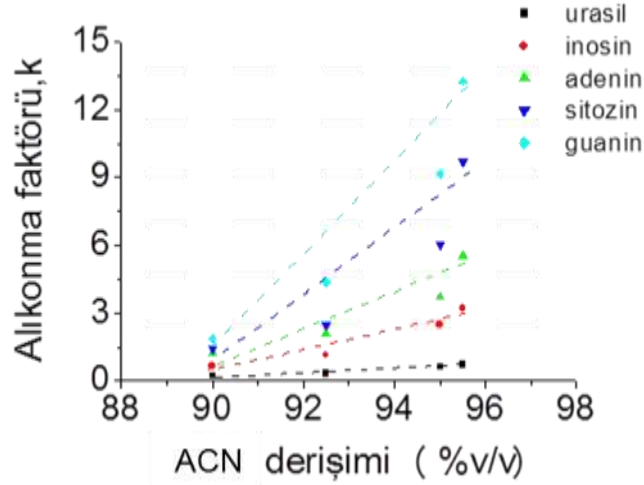
Çizelge 4.4. TEA-OH-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller içeren kolonda farklı ACN/su^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

Pik çözünürlüğü					
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)	R(6/5)
96.5/3.5	1.76	2.01	1.42	1.64	1.56
95.0/5.0	1.64	1.92	1.32	1.56	1.50
92.5/7.5	1.53	1.84	1.23	ayrım yok	1.35
90.0/10.0	1.46	1.67	1.10	ayrım yok	0.74

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Akış hızı: 0.5 mL/dk Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin

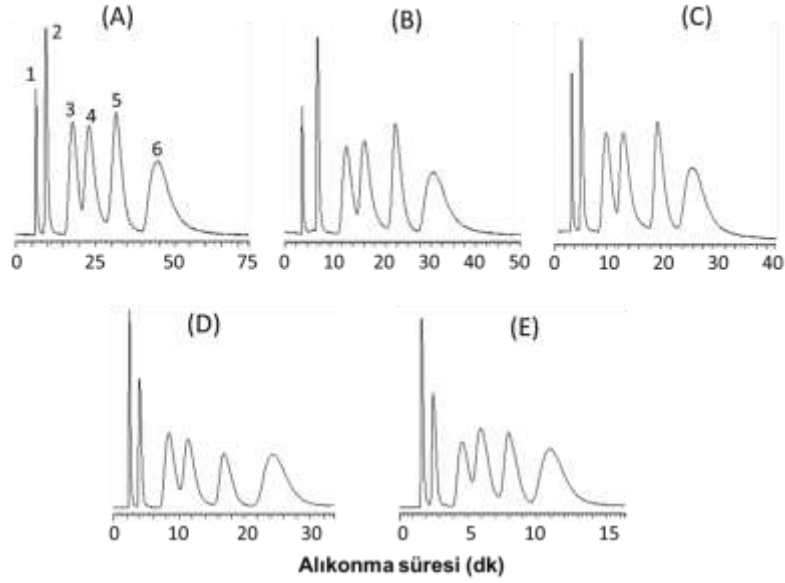
Çizelge 4.4'ten 96.5/3.5 ve 95.0/5.0 mL/mL ACN/su oranları ile elde edilen çözünürlük değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum test karışımının izokratik ayrımı için belirtilen aralığın uygun olduğunu göstermektedir. Şekil 4.12'ye bakıldığında ACN derişimi arttığında hareketli faz polaritesinin azalması ile analitlerin alıkonmasının arttığı gözlenmektedir. Dolayısıyla 90.0/10.0 mL/mL ACN/su oranı ile en kısa analiz süresi elde edilmiştir. Ancak, analiz süresi ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında en uygun ACN/su oranı değeri 95.0/5.0 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.13'te alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değışimi görülmektedir. Piklerin birbirine en yakın olduğu ACN derişimi % 90.0 iken, birbirinden uzaklaştığı ACN derişimleri % 95.0 ve % 96.5 olarak görünmektedir. Analitlerin polaritesi arttıkça kolonda tutulmaları ve dolayısıyla alıkonma faktörü de artmaktadır. HILIC sisteminde daha polar bileşikler sabit fazın üzerinde yer alan sabit hidrofilik tabaka ile daha güçlü etkileşim göstermekte ve kolonu daha geç terk etmektedir. Kromatogramlar ve alıkonma faktörü değerleri grafiği incelendiğinde analitlerin çıkış sırası toluen, urasil, inosin, adenin, sitozin, guanin şeklindedir ve analitlerin çıkış sırasına göre alıkonma faktörü değerleri de

artmaktadır. HILIC sistemi ve elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında analit çıkış sırasına uygun olarak bileşenlerin polaritesinin (hidrofilik özelliği) arttığı söylenebilir.



Şekil 4.13. Test karışımı analit grubu ayırımında farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi

Şekil 4.14'te ve Çizelge 4.5.'te, TEA-OH-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller içeren kolon ile en uygun ACN derişiminde, akış hızı 0.20-0.75 mL/dk aralığında değiştirilerek izokratik modda test karışımının ayırımının yapıldığı kromatogramlar ve kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri verilmiştir. Kromatografik ayırımın özellikle düşük akış hızları (0.2 ve 0.3 mL/dk) ile daha başarılı olduğu görülmektedir. Diğer akış hızlarında inosin ve sitozin ayırımının daha zor yapıldığı dikkati çekmektedir.



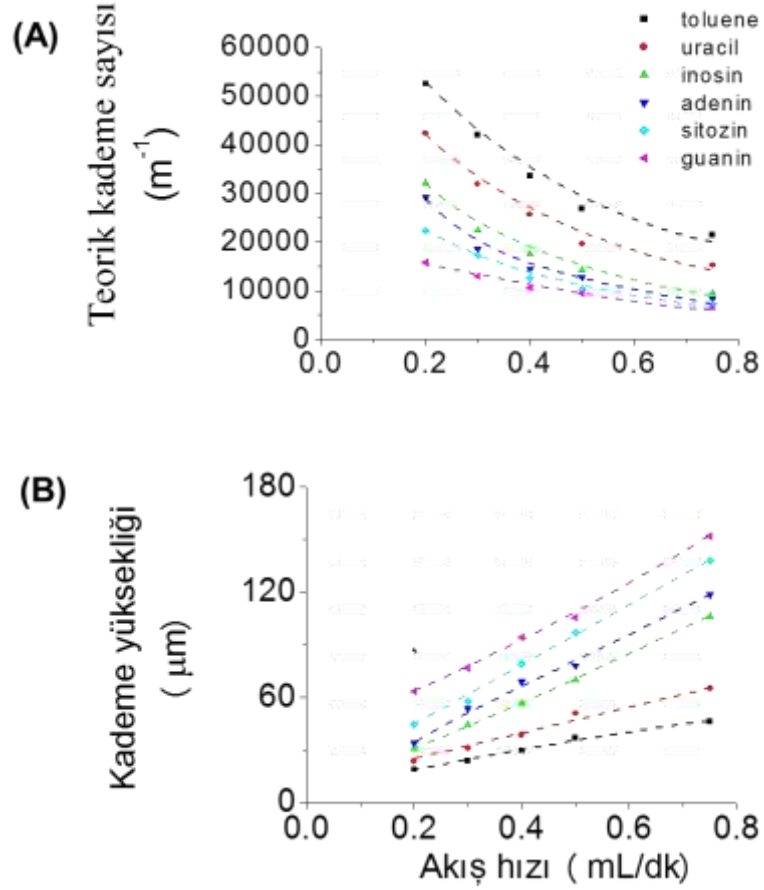
Şekil 4.14. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda test karışımının izokratik ayırımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin.

Farklı akış hızlarında elde edilen kromatogramlardan yararlanılarak (Şekil 4.14) TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda, hareketli faz akış hızının etkisi teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliği'ne (van-Deemter grafiği) etkisi tanımlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir. Çizelge 2.6'da silika ve polimer bazlı HILIC kolonlar için farklı analitler ile saptanmış kademe yüksekliği değerlerine bakıldığında, TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri içeren HILIC kolonunun özellikle polimer bazlı HILIC kolonları ile kıyaslanabilir ayırma performansına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Ancak silika bazlı HILIC kolonlarında gözlenen kolon verimi değerlerinin, TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri içeren HILIC kolonuna kıyasla daha yüksek olduğu not edilmelidir.

Çizelge 4.5. Test karışımı kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

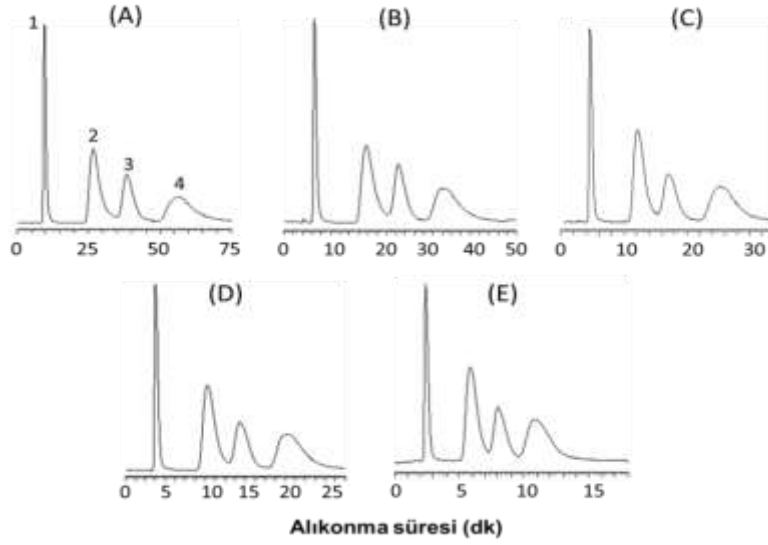
Pik Çözünürlüğü					
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)	R(6/5)
0.20	1.89	2.22	1.43	1.72	1.65
0.30	1.85	2.11	1.38	1.63	1.61
0.40	1.72	1.98	1.35	1.61	1.52
0.50	1.64	1.92	1.32	1.56	1.50
0.75	1.56	1.84	1.21	1.42	1.46

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. inosin, 4. adenin, 5. sitozin, 6. guanin.



Şekil 4.15. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda test karışımının izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.14'te verilmektedir.

Yapılan çalışmalar ile nükleotidlerin izokratik ayırımı için en uygun ACN/su hacimsel oranı 95.0/5.0 mL/mL olarak saptanmıştır. En uygun ACN/su oranında, akış hızı 0.20-0.75 mL/dk aralığında değiştirilerek, nükleotidlerin kromatografik ayırımının yapıldığı kromatogramlar Şekil 4.16'da, çözünürlük değerleri ise Çizelge 3.3.'te verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi geliştirilen kolon ile nükleotidlerin izokratik ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir.



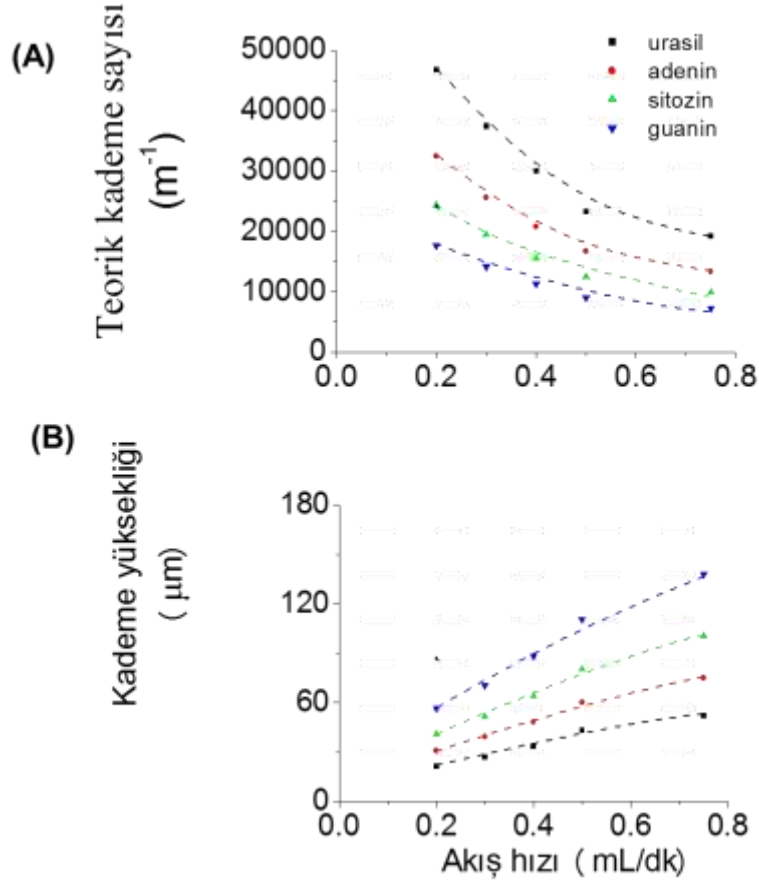
Şekil 4.16. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleotidlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. urasil, 2. adenin, 3. sitozin, 4. guanin.

Çalışılan kolonda, nükleotidler analit olarak kullanıldığında, teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi Şekil 4.17’de verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi bütün nükleotidler için artan akış hızı ile teorik kademe sayısı azalmakta ve kademe yüksekliği ise artmaktadır. Grafikte urasil ile 47.000 m^{-1} değerine ulaşmıştır. Kademe yüksekliği ise farklı nükleotidler için 20-150 μm aralığında değişmektedir. Bu aralık Çizelge 2.6’da polimer bazlı HILIC kolonları için verilen kademe yüksekliği değerleri ile kıyaslandığında, geliştirilen kolonun izokratik nükleotid ayrımı için mevcut kolonlar ile aynı mertebede kolon verimi değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.6. Nükleotidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

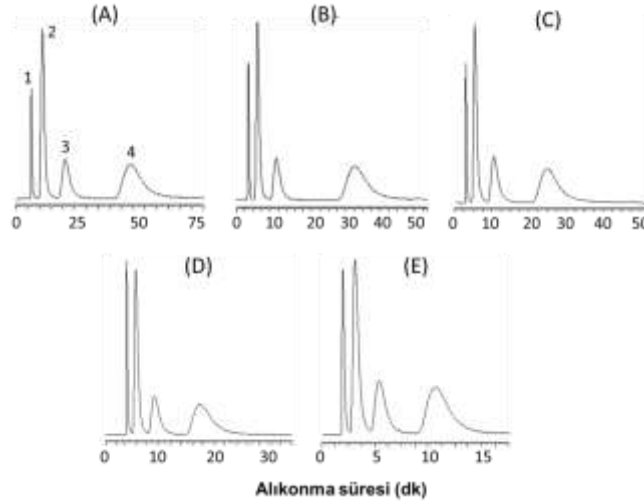
Pik Çözünürlüğü			
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.20	3.65	1.53	1.82
0.30	3.47	1.45	1.75
0.40	3.25	1.36	1.63
0.50	3.14	1.27	1.55
0.75	3.08	1.22	1.44

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. urasil, 2. adenin, 3. sitozin, 4. guanin.



Şekil 4.17. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleotidlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.16'da verilmektedir.

Aynı kolonda nükleosid karışımında izokratik koşullarda kromatografik ayırımı incelenmiştir. Yapılan ön deneyler ile nükleosidlerin ayırımı için ise en uygun ACN/su oranı 95.0/5.0 mL/mL olarak belirlenmiştir. Şekil 4.18'de belirlenen ACN/su oranı ile farklı akış hızlarında izokratik modda nükleosidlerin ayırımının yapıldığı kromatogramlar verilmektedir. Elde edilen çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.7'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi çalışılan bütün akış hızlarında nükleosidlerin kromatografik ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışılan en yüksek akış hızı (0.5 mL/dk) ile kromatografik ayırım 15 dakika'dan daha kısa sürede gerçekleşmektedir.



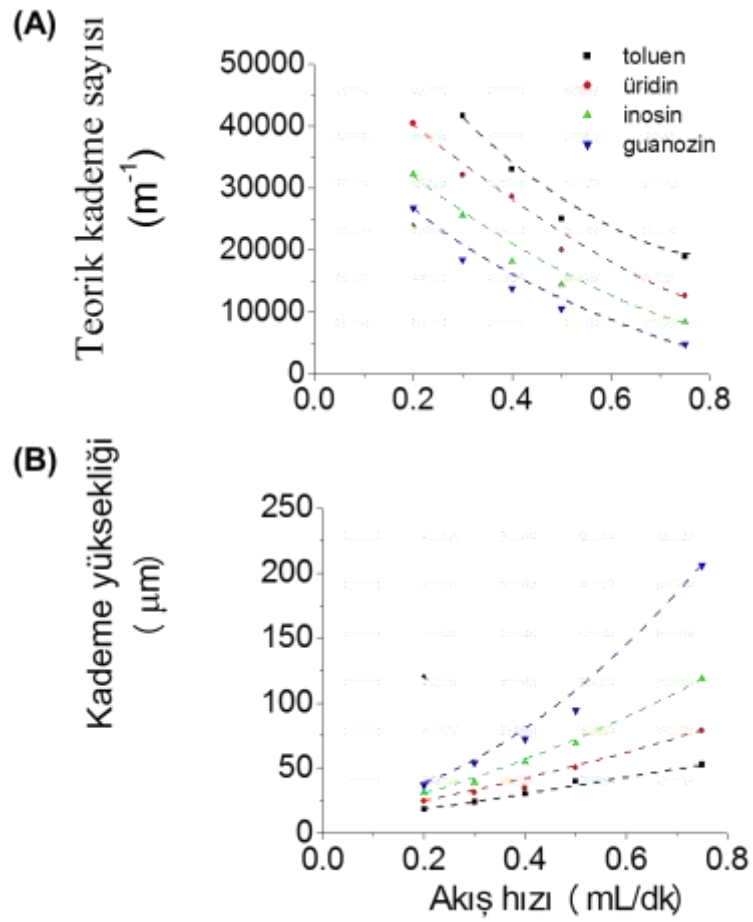
Şekil 4.18. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayırımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin.

Çizelge 4.7. Nükleosidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Pik Çözünürlüğü			
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.20	1.94	2.21	2.94
0.30	1.83	2.10	2.75
0.40	1.78	1.67	2.63
0.50	1.65	1.58	2.45
0.75	1.52	1.51	2.34

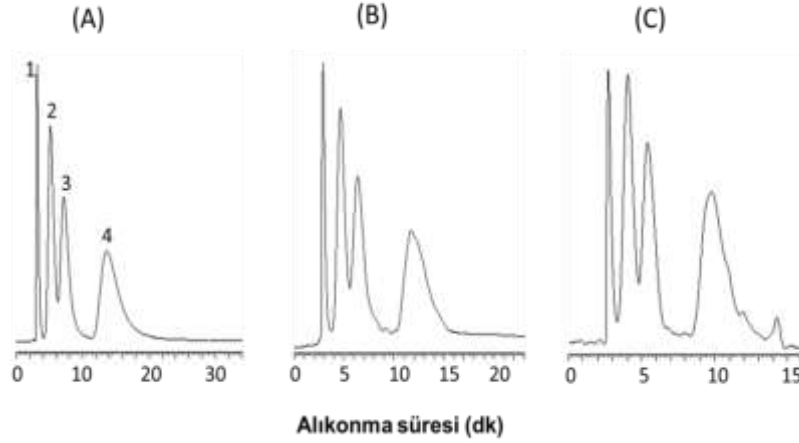
a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin.

Nükleosidler kullanıldığında, teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafik Şekil 4.19'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi artan akış hızı ile teorik kademe sayısı azalırken; kademe yüksekliği artmaktadır. Teorik kademe sayısı üridin ile 41000 m^{-1} değerine ulaşmıştır. Farklı nükleosidlerin kademe yüksekliği değerleri ise 18-205 μm aralığında değişim göstermektedir. Bu değerler, Çizelge 2.6'da polimer bazlı HILIC kolonlarında nükleosidler için verilen kademe yüksekliği değerlerine göre daha iyidir.



Şekil 4.19. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.18'de verilmektedir.

Kromatografik ayırma deneylerinde organik asit karışımı asetik asit, p-toluik asit, benzoik asit, 4-klorobenzoik asit ile hazırlanmıştır. Farklı ACN/su oranları ile alınan kromatogramlar ve hesaplanan çözünürlük değerleri sırasıyla Şekil 4.20 ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.



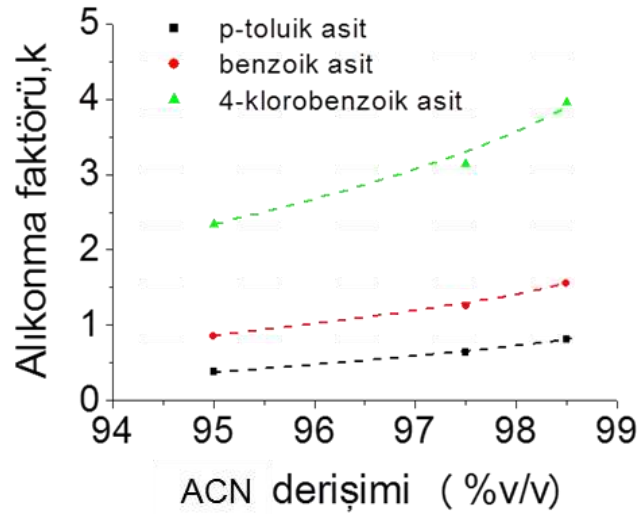
Şekil 4.20. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile organik asitlerin izokratik ayırımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 220 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 98.5/1.5 (B) 97.5/2.5, (C) 95.0/5.0, Pik sırası: 1. Asetik asit, 2. p-toluik asit, 3. benzoik asit, 4. 4-klorobenzoik asit.

Şekil 4.21'de alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişim grafiği görölmektedir. Analitlerin polaritesi arttıkça kolonda tutulmaları ve dolayısıyla alıkonma faktörü de artmaktadır. Şekil 4.20'deki farklı ACN derişimleri ile alınan kromatogramlara Çizelge 4.8'de hesaplanan çözünürlük değerlerine ve Şekil 4.21'deki alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimine bakılarak en uygun ACN/su oranı hacimce 98.5/1.5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. TEA-OH-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda organik asit karışımı için farklı ACN/su^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

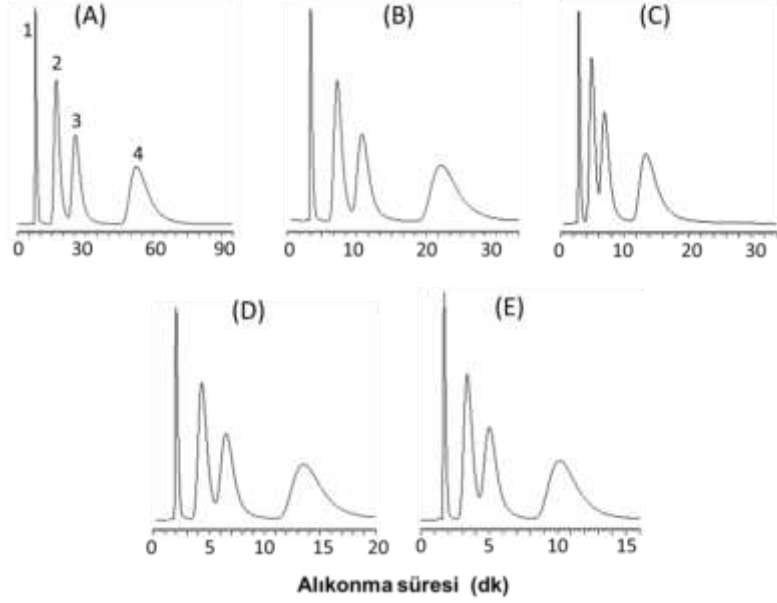
Pik çözünürlüğü			
ACN/Su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
98.5/1.5	1.71	1.12	1.62
97.5/2.5	1.43	1.05	1.52
95.0/5.0	1.35	1.00	1.47

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Akış hızı: 0.5 mL/dk, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 220 nm, Pik sırası: 1. asetik asit, 2. p-toluik asit, 3. benzoik asit, 4. 4-klorobenzoik asit.



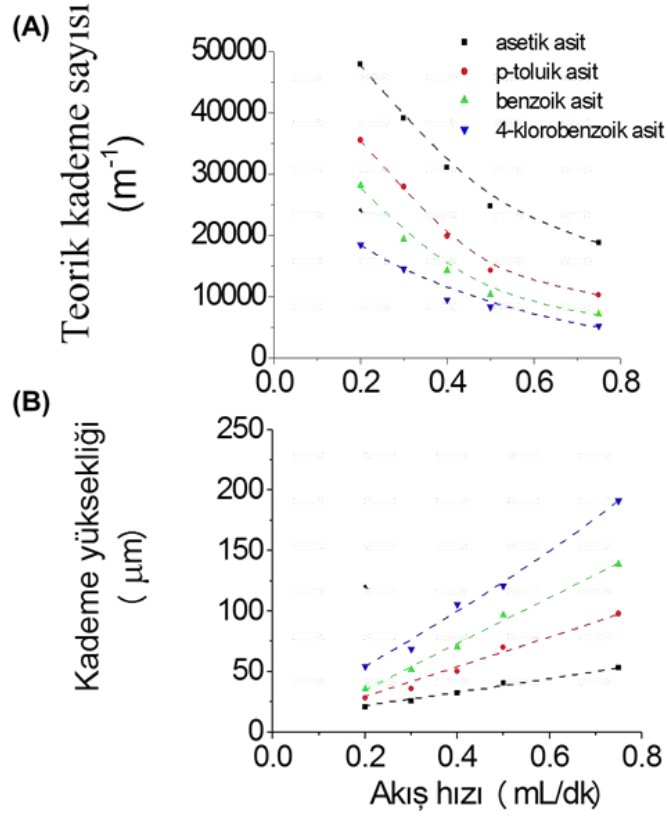
Şekil 4.21. Organik asitlerin ayırımında ACN derişimi ile alıkonma faktörünün değişimi

Farklı hareketli faz akış hızları ile alınan kromatogramlar Şekil 4.22'de verilmektedir.



Şekil 4.22. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda organik asitlerin izokratik ayırımına hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.20, (B) 0.30, (C) 0.40, (D) 0.50, (E) 0.75, UV dedektör, 220 nm, Pik sırası: 1. asetik asit, 2. p-toluik asit, 3. benzoik asit, 4. 4-klorobenzoik asit.

Çalışılan kolonda organik asitler kullanıldığında, farklı akış hızlarında alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.23'te verilmektedir.



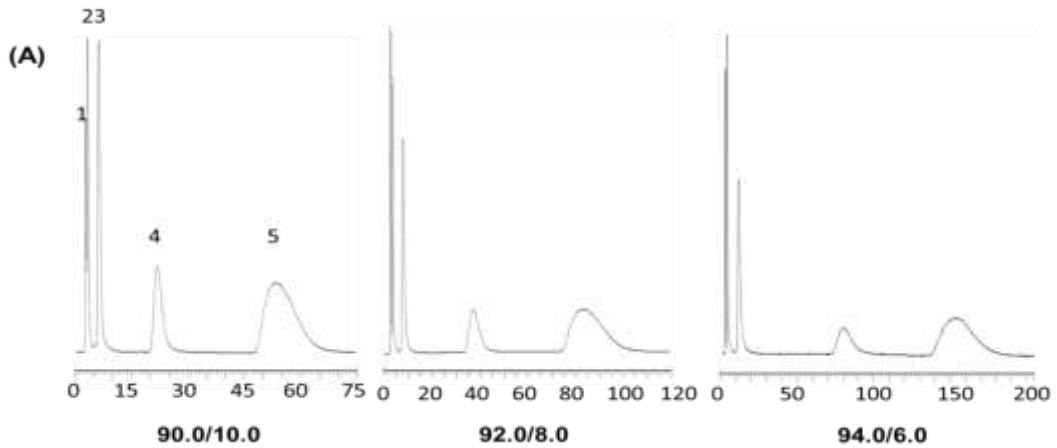
Şekil 4.23. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosidlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.22'de verilmektedir.

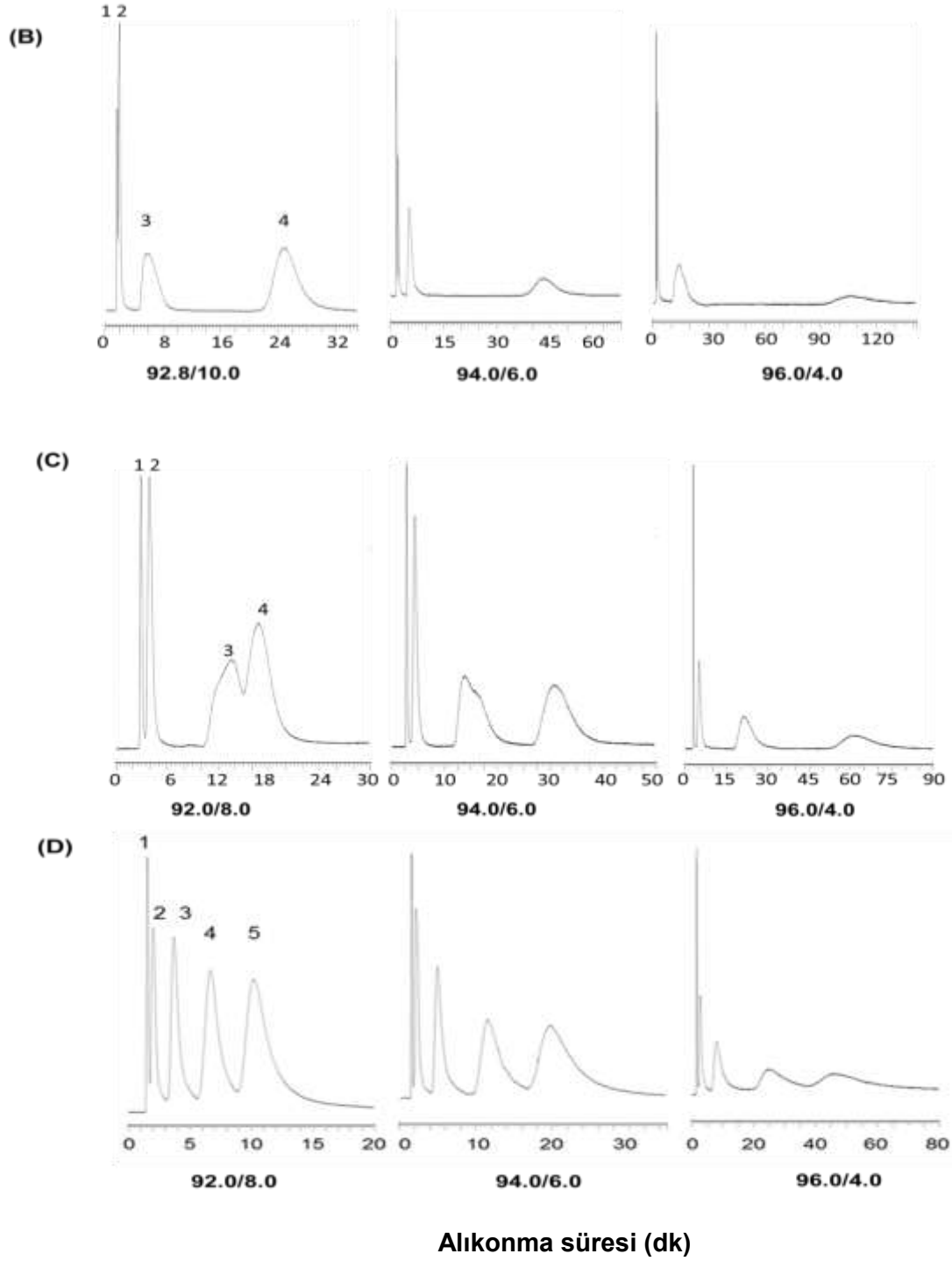
Buradan görüldüğü gibi teorik kademe sayısı artan akış hızı ile düşerken; kademe yüksekliği artan akış hızı ile artış göstermektedir. Teorik kademe sayısı asetik asit ile 48000 m⁻¹ değerine ulaşmıştır. Buradan organik asitlerin kademe yüksekliği değerlerinin 20-192 μm aralığında değiştiğini göstermektedir. Çizelge 2.6'da silika bazlı kolonlar için izokratik modda benzoik asit türevleri ile elde edilen kademe yüksekliği değerleri yer almaktadır. Buradan elde edilen maksimum kademe yüksekliği değerinin yaklaşık 90 μm civarında olduğu görülmektedir. Bu karşılaştırma TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partikülleri içeren HILIC kolonunun benzoik asit türevlerini ayırma performansının silika bazlı HILIC kolonlarına kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir. Özellikle asidik formda ligandları içeren silika bazlı HILIC kolonları ile daha iyi kademe yüksekliği değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Çalışmada kullanılan ligandın bazik

karakterde olması, benzoik asit türevlerinin ligand ile etkileşiminin uzamasına, dolayısıyla pik genişlemesine neden olmaktadır. Bu durum ise kolon veriminin daha düşük olmasını gerektirmektedir.

4.2.2. Triazol halkası formunda ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin HILIC modunda sabit faz olarak kullanılması ile yapılan kromatografik çalışmalar

Ligand bağlama koşulları değiştirilerek sentezlenen triazol halkası bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin kromatografik performanslarının incelenmesi amacıyla öncelikle nükleosid karışımının kromatografik ayrımı yapılmıştır. Çizelge 3.2'de verilen farklı sentez koşulları ile elde edilen PT-1, PT-2, PT-3 ve PT-4 kolonlarında nükleosidlerin analit karışımı olarak kullanıldığı, farklı ACN/su oranları ile elde edilen kromatogramlar Şekil 4.24 'te verilmektedir. Alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.9'da verilmektedir.





Şekil 4.24. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda farklı ACN/su oranları ile nükleosid karışımının izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.4 mL/dk, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A), (D) 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4. adenozin, 5.guanozin. (B), (C) 1. toluen, 2. timidin, 3. adenozin, 4.guanozin

Çizelge 4.9. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımı için farklı ACN/su^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

Kolon: PT-1 Pik çözünürlüğü				
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)
90.0/10.0	1.33	2.50	4.84	2.92
92.0/8.0	1.42	3.68	5.29	3.01
94.0/6.0	1.66	4.47	6.21	3.16

Kolon: PT-2 Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
92.0/8.0	1.22	1.76	3.90
94.0/6.0	1.33	2.75	5.53
96.0/4.0	1.42	3.18	5.68

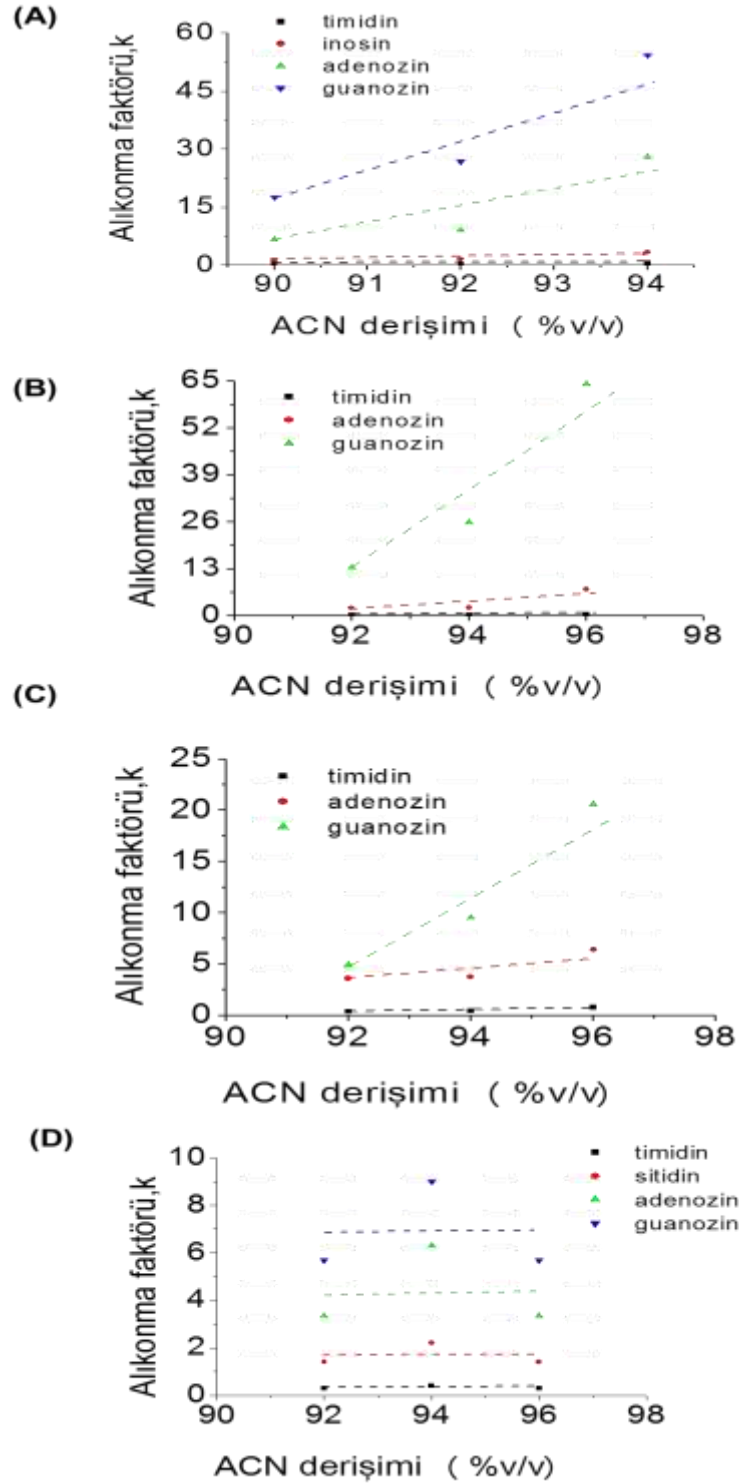
Kolon: PT-3 Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
92.0/8.0	1.33	2.42	0.66
94.0/6.0	2.07	2.53	2.17
96.0/4.0	2.20	2.95	2.50

Çizelge 4.9. devam ediyor

Kolon: PT-4				
Pik çözünürlüğü				
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)
92.0/8.0	1.15	2.11	1.61	1.50
94.0/6.0	1.37	2.35	1.74	1.60
96.0/4.0	1.43	2.50	1.90	1.75

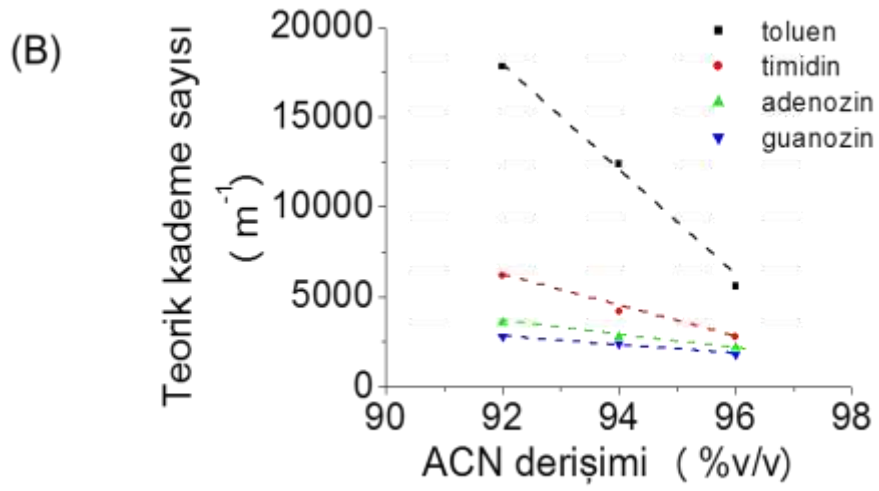
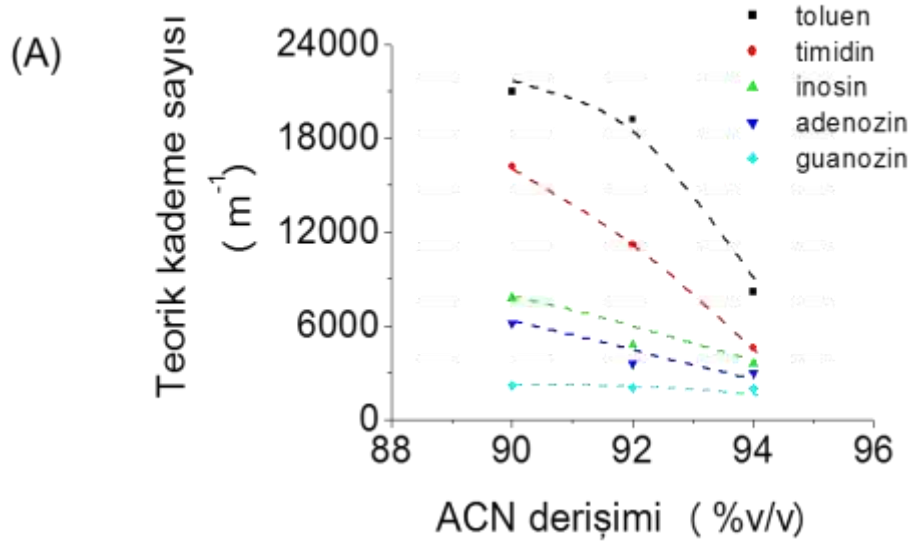
a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Akış hızı: 0.4 mL/dk Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 254 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4. adenozin, 5.guanozin.

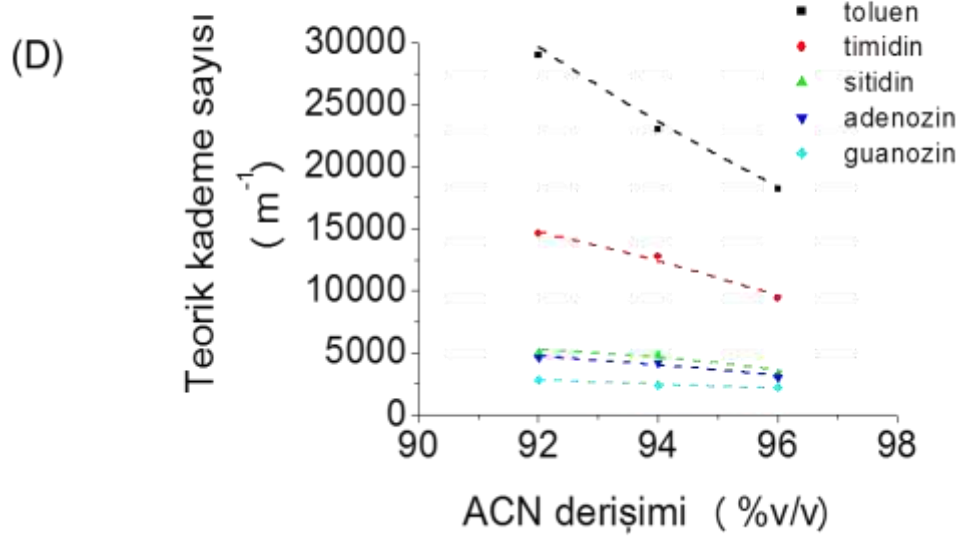
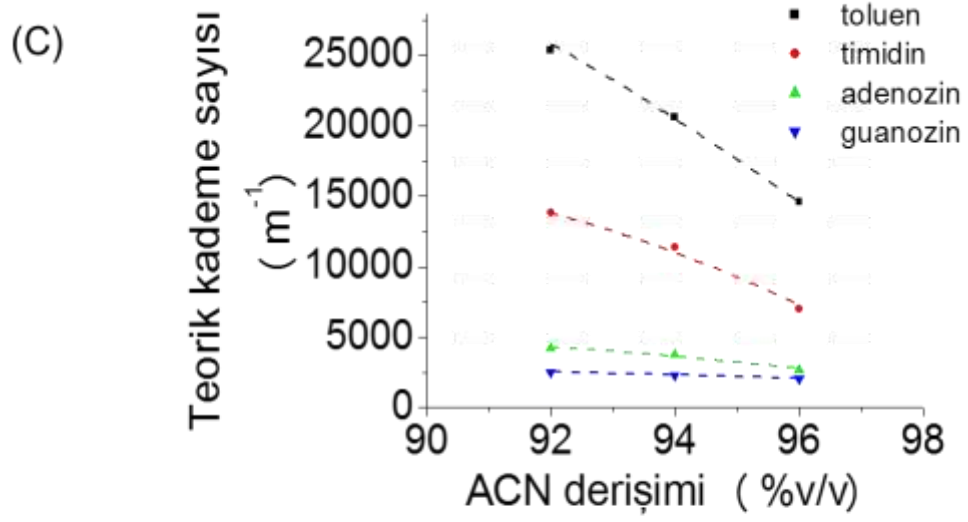
Kromatogramlardan ve çözünürlük değerlerinden görüldüğü üzere PT-1 (60/50) kodlu kolonda 92.0/8.0 mL/mL; PT-2 (60/RT) , PT-3 (80/RT) ve PT-4 (80/60) kodlu kolonlarda ise 94.0/6.0 mL/mL ACN/su oranı ile en uygun sürede iyi bir kromatografik ayırımın elde edilebildiği görülmektedir. Ancak hazırlanan kolonlar içerisinde bağıl olarak en kısa analiz süresi ile tatminkar bir kromatografik ayırımın PT-4 kodlu kolon ile elde edildiği görülmektedir. Bu kolonun dikkat çekici bir diğer özelliği, artan ACN derişimi ile pik çözünürlüğünde önemli bir değişim gözlenmemesidir. Alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi sentezlenen bütün kolonlar için Şekil 4.25'te verilmektedir. Buradan PT-4 kodlu kolonun davranışının diğer kolonlardan farklı olduğu net olarak görülmektedir. Diğer kolonlar ACN derişimi ile, alıkonma faktöründe bariz bir artış gözlenmesine karşın PT-4 kodlu kolonda alıkonma faktörünün ACN derişimi ile önemli bir değişim göstermediği gözlenmektedir. Bu durum PT-4 kodlu kolay bağlanma formülasyonu ile ayırma ortamının yeterince hidrofilize edilebildiğini, yani mikroküreler üzerinde yeterli derişimde triazol halkası oluşturulabildiğini göstermektedir.



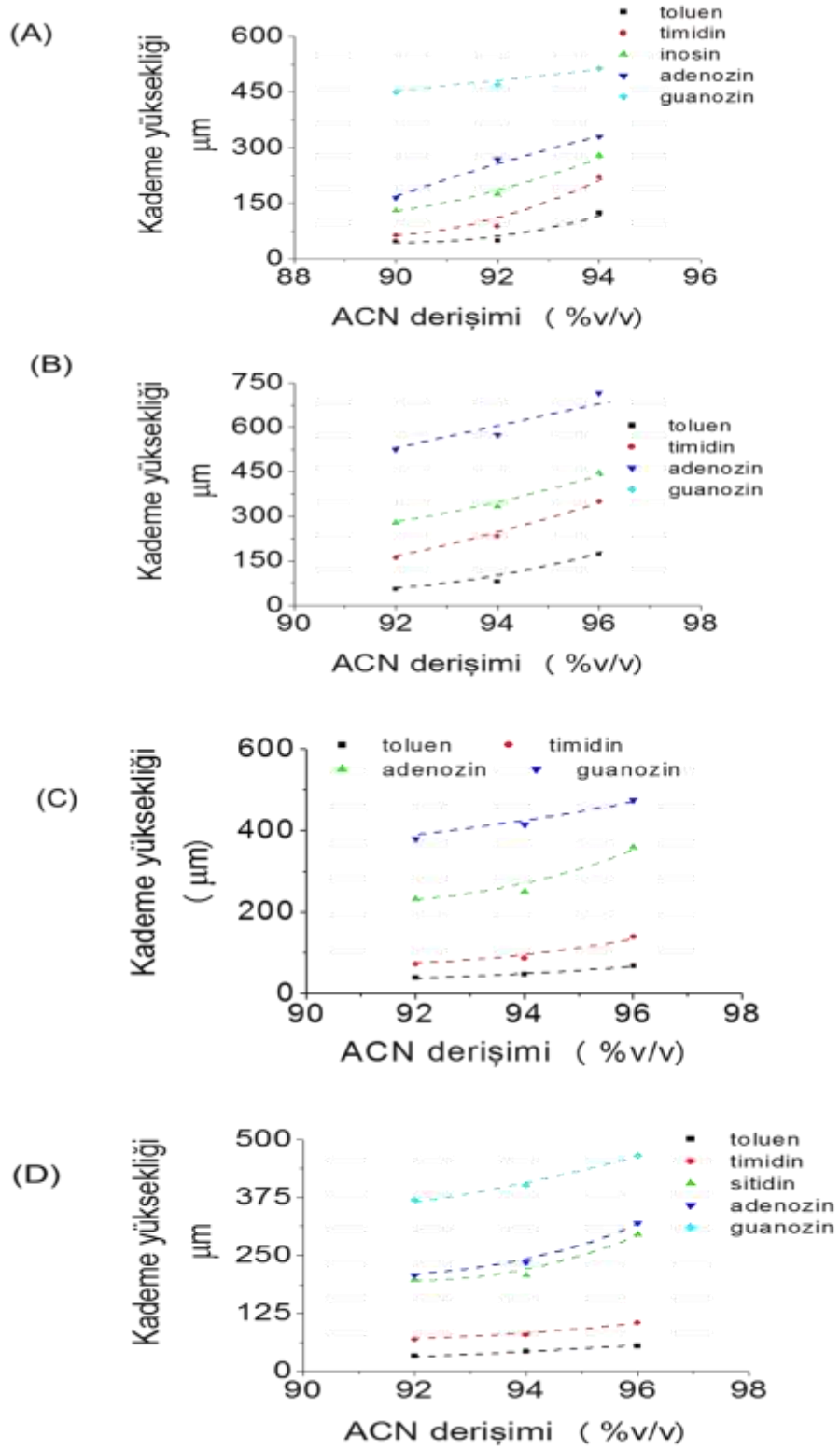
şekil 4.25. (A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarında nükleosid karışımı ayırımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi.

Kolon veriminin iki farklı ölçüsü olan teorik kademe sayısının ve teorik kademe yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.26 ve 4.27’de verilmektedir.



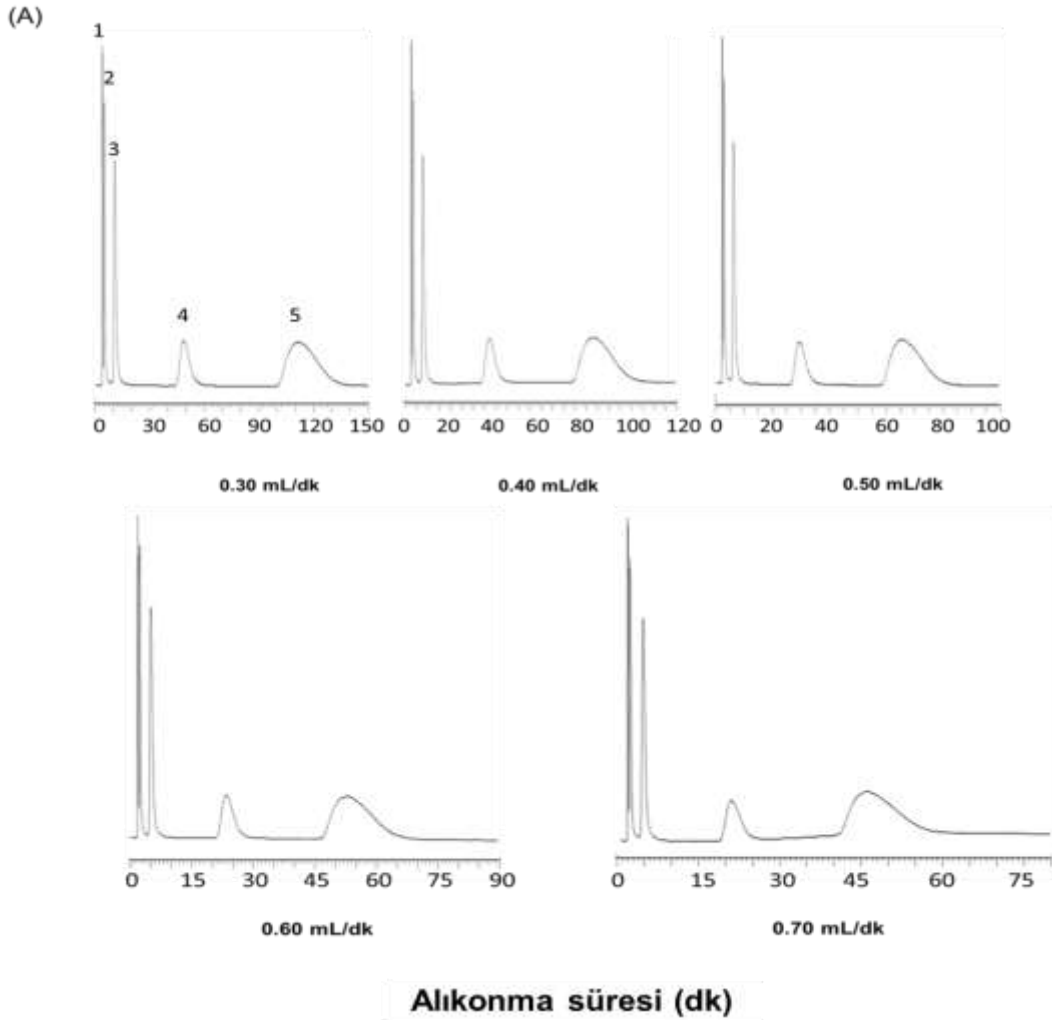


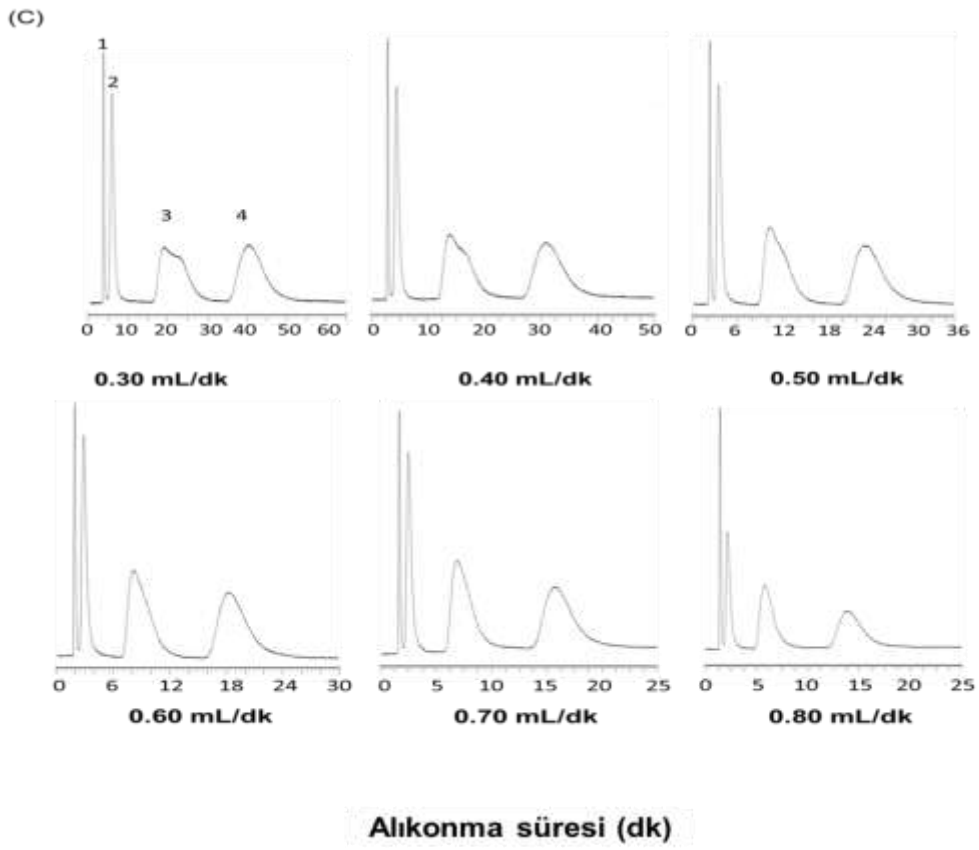
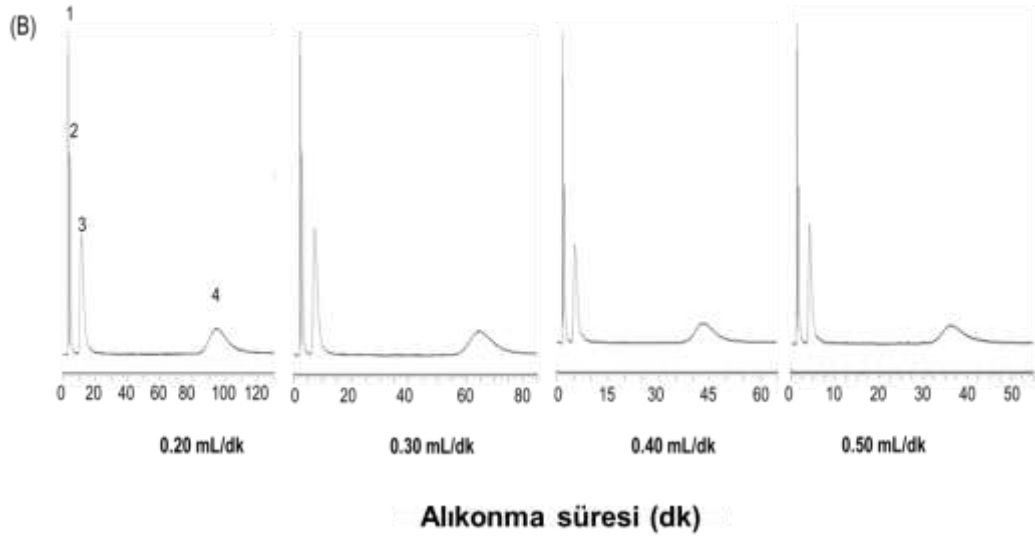
şekil 4.26. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda n¼kleosid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının ACN derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar şekil 4.24'te verilmektedir.

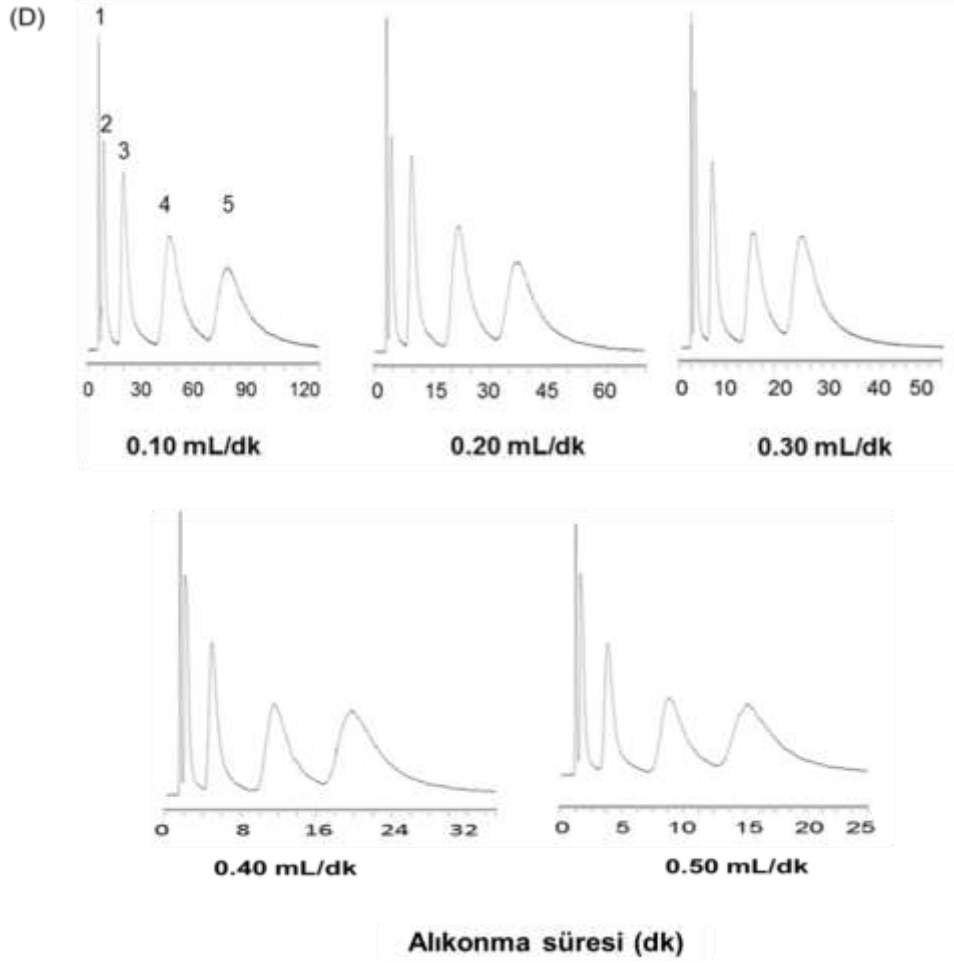


Şekil 4.27. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.24'te verilmektedir.

Analiz süresi, çözünürlük değerleri ve teorik kademe sayısı göz önüne alındığında en uygun ACN/su oranı değeri PT-1 (60/50) kolonu için 92.0/8.0 mL/mL, PT-2 (60/RT), PT-3 (80/RT) ve PT-4 (80/50) kodlu kolonlar için 94.0/6.0 mL/mL olarak belirlenmiştir. Kolonlar için belirlenen uygun ACN derişimi ile farklı akış hızlarında, kolonların nükleosidleri ayırma davranışları izlenmiştir. Farklı akış hızları ile izokratik modda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.28'de ve bu kromatogramlar kullanılarak hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.10'da verilmektedir.







Şekil 4.28. (A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarında nükleosid bileşenlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A) 92.0/8.0 (B), (C), (D) 94.0/6.0 mL/mL, (UV) dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A), (D) 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4. adenozin, 5.guanozin. (B), (C) 1. toluen, 2. timidin, 3. adenozin, 4.guanozin.

Çizelge 4.10. (A) PT-1 (60/50), (B) PT-2 (60/RT) , (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımı için farklı hareketli faz akış hızları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

Kolon: PT-1

Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92/8 mL/mL

Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)
0.30	1.60	4.04	6.40	3.44
0.40	1.42	3.68	5.29	3.01
0.60	1.25	3.42	4.97	2.44
0.70	1.20	3.20	4.78	2.30

Kolon: PT-2

Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 94/6 mL/mL

Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.20	1.56	2.80	6.30
0.30	1.30	2.77	5.84
0.40	1.22	2.75	5.60
0.50	1.17	2.63	5.40

Çizelge 4.10. devam ediyor

Kolon: PT-3

Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 94/6 mL/mL

Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.20	2.08	3.16	2.24
0.40	2.06	2.53	2.17
0.60	1.53	2.03	1.95
0.80	1.39	1.95	1.90

Kolon: PT-4

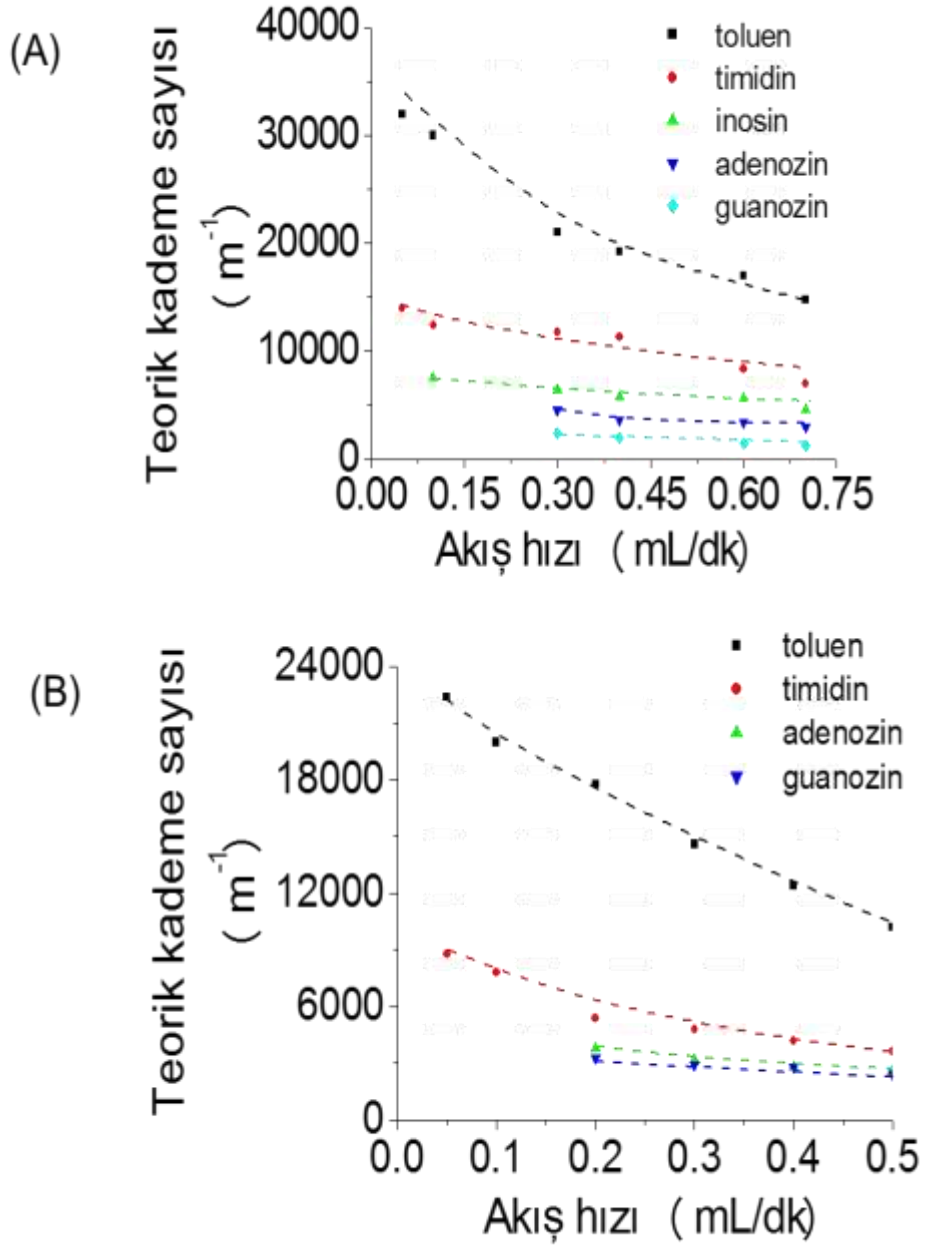
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 94/6 mL/mL

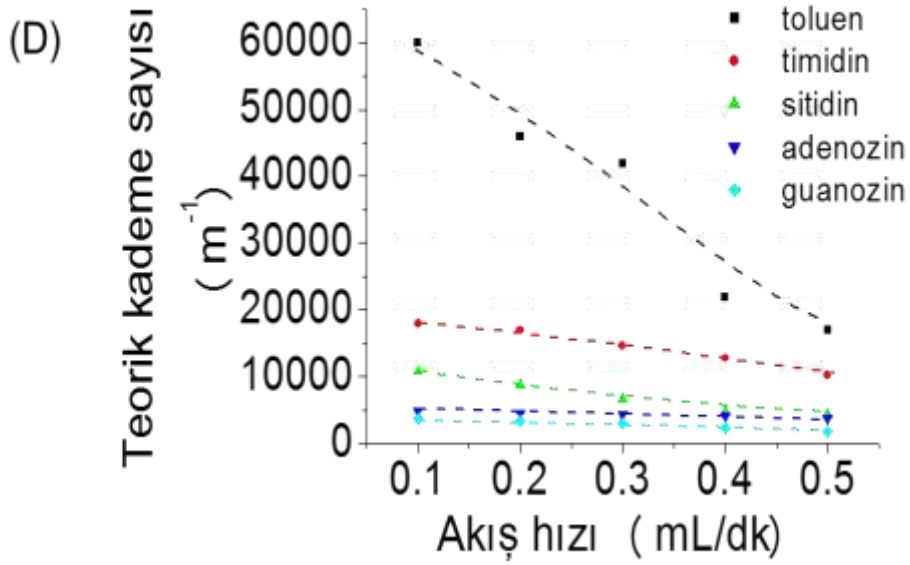
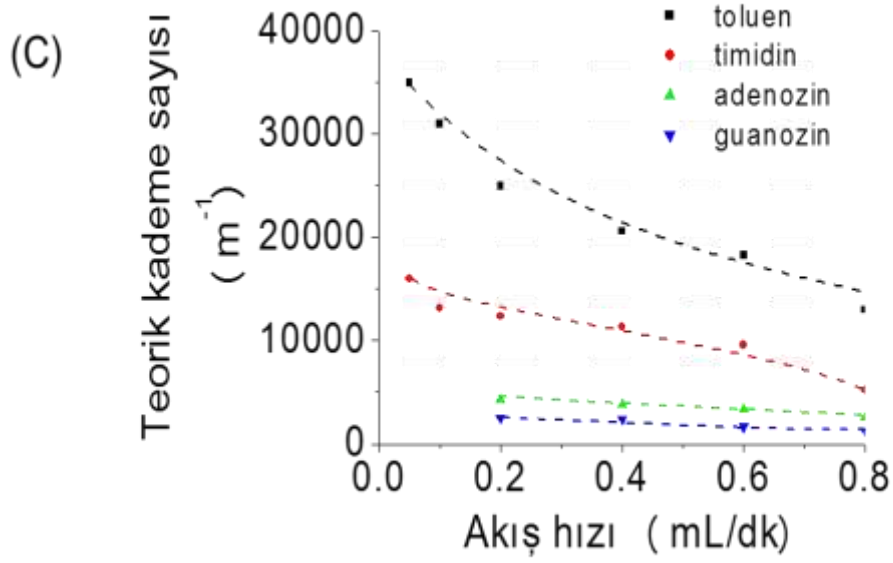
Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)	R(5/4)
0.10	1.86	2.62	2.25	1.50
0.20	1.66	2.53	2.21	1.48
0.30	1.55	2.40	2.06	1.32
0.40	1.43	2.35	1.90	1.25
0.50	1.17	2.19	1.87	1.20

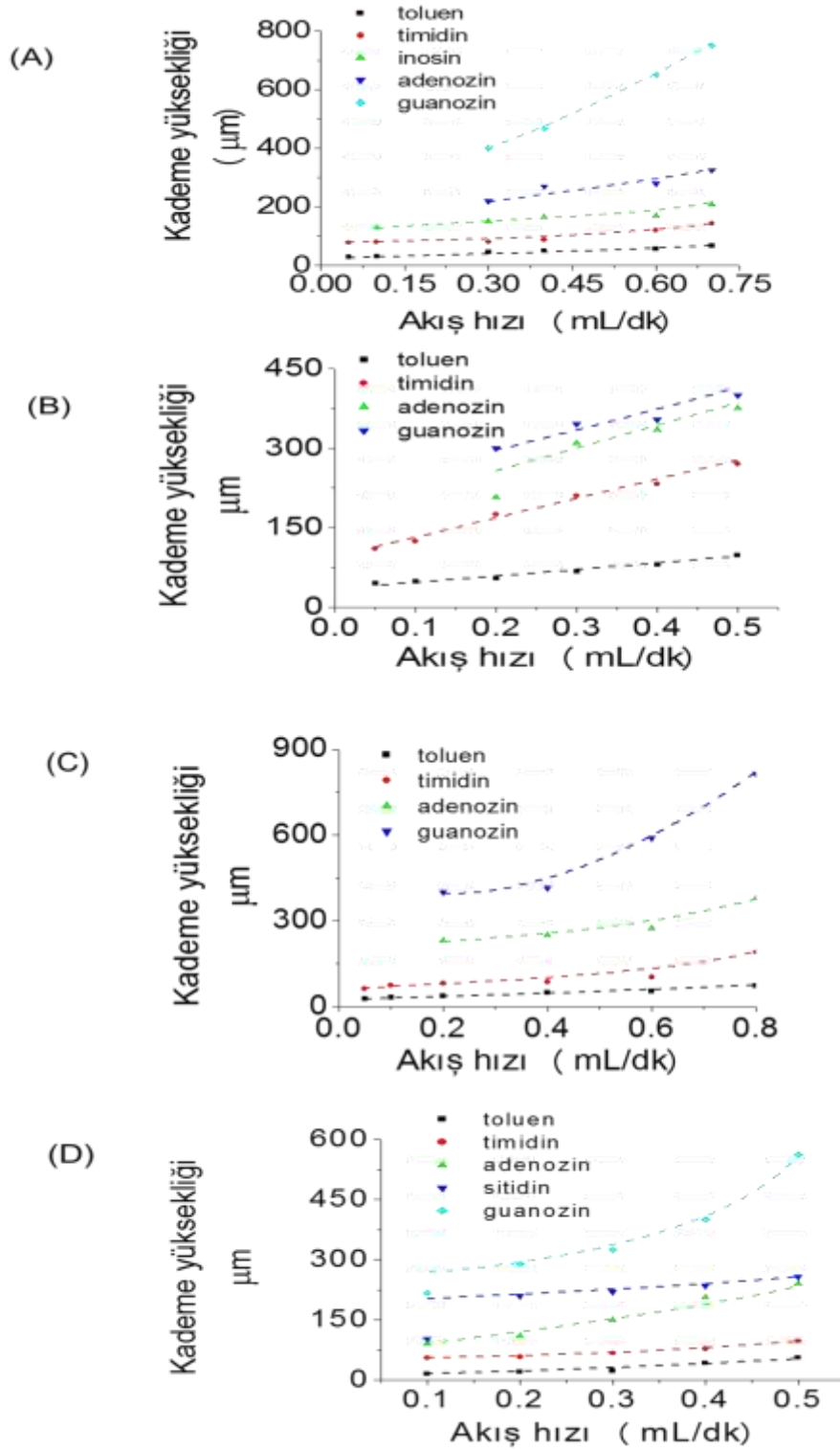
a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A), (D) 1. toluen, 2. timidin, 3. sitidin, 4. adenzin, 5.guanozin. (B), (C) 1. toluen, 2. timidin, 3. adenzin, 4.guanozin.

Kolon veriminin iki farklı ölçüsü olan teorik kademe sayısının ve teorik kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi farklı kolay bağlanma formülasyonları ile üretilen kolonlar için sırasıyla Şekil 4.29 ve 4.30'da verilmektedir.





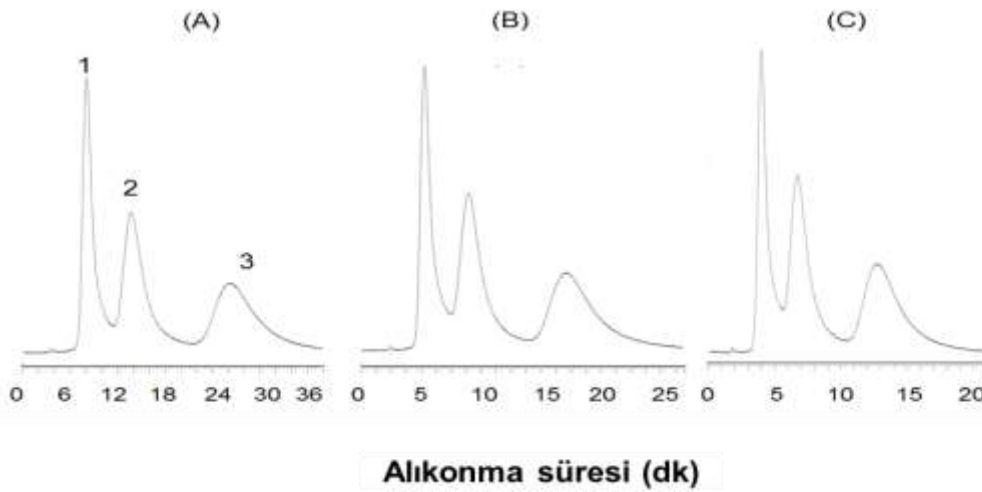
Şekil 4.29. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.28'de verilmektedir.



Şekil 4.30. A) PT-1 (60/50) (B) PT-2 (60/RT) (C) PT-3 (80/RT) (D) PT-4 (80/50) kodlu kolonlarda nükleosid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.28'de verilmektedir.

PT-4 kodlu kolonda referans analit (toluen) ile 60000 kademe/m ve nükleosidler ile 20000 kademe/m değerine ulaşan ayırma verimleri elde edilmiştir. Diğer kolonlarda ise referans analit ile 30000, nükleosidler ile 10000 kademe/m değerinin altında değerler gözlenmiştir. Bu sonuçlar, triazol halkası ile türevlendirilen kolonun kromatografik performansının TEA-OH ligandı içeren HILIC kolonuna kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir.

PT-4 kodlu kolonda HILIC modunda katekolaminlerin kromatografik ayrımı da çalışılmıştır. Ön deneyler ile 20 mM derişiminde, pH 4 amonyum asetat tamponu kullanımının kromatografik ayrımı iyileştirdiği görülmüştür. Bu deneylerde, ayırım için en uygun ACN/20 mM amonyum asetat tamponu (pH 4) hacimsel oranı 95/5 mL/mL olarak saptanmıştır. Bu koşullarda farklı hareketli faz akış hızları ile, katekolaminlerin izokratik ayrımının yapıldığı kromatogramlar Şekil 4.31'de, hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.11'de verilmektedir.



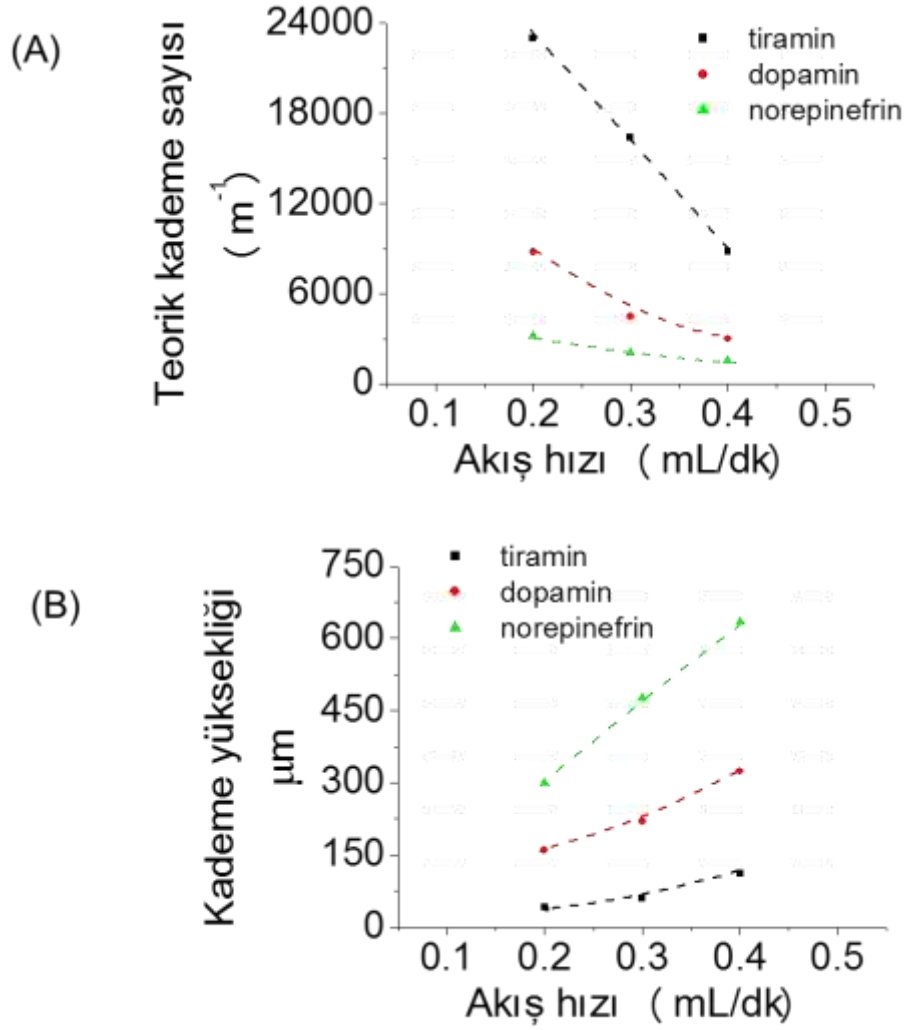
Şekil 4.31. PT-4 kodlu triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda katekolaminlerin farklı hareketli faz akış hızları ile izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli fazda ACN/pH4 20 mM amonyum asetat tamponu hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.2, (B) 0.3, (C) 0.4, UV dedektör, 270 nm, Pik sırası: 1. tiramin, 2. dopamin, 3. Norepinefrin.

Çizelge 4.11. Katekolamin karışımı kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Pik Çözünürlüğü			
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.20	2.60	1.90	2.20
0.30	2.44	1.80	2.09
0.40	2.41	1.76	2.06

a: Kromatografik koşullar: Hareketli fazda ACN/pH4 20 mM amonyum asetat tamponu hacimsel oranı: 95/5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 270 nm, Pik sırası: 1. tiramin, 2. dopamin, 3. Norepinefrin.

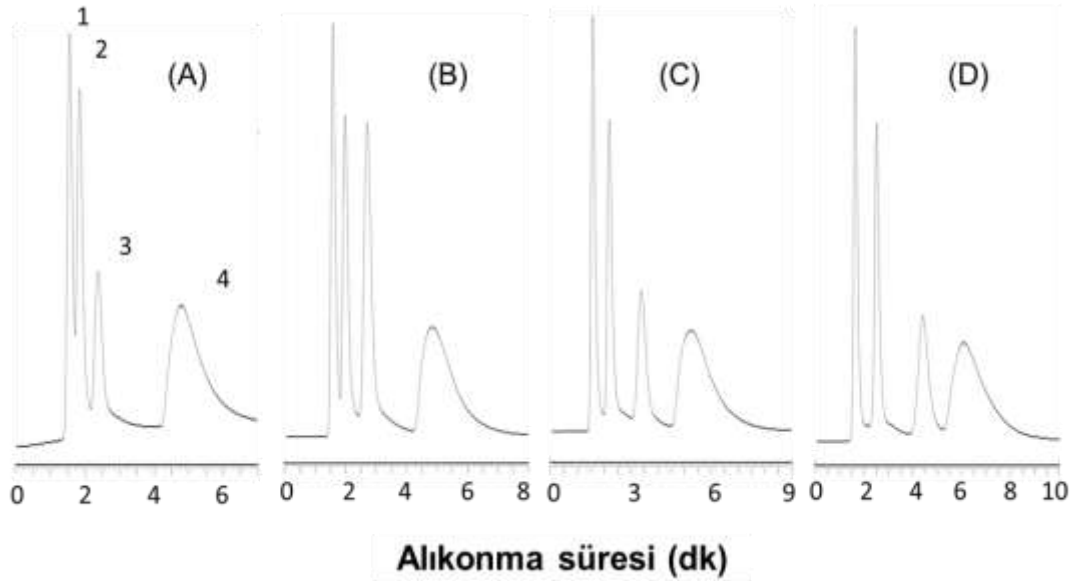
Şekil 4.31 ve Çizelge 4.11'den katekolaminlerin 1.5'un üzerinde çözünürlük değerleri ile ayrıldığı görülmektedir. Ayrıca pik çözünürlük değerleri akış hızı ile önemli bir değişim göstermemektedir. Bunun anlamı artan akış hızı ile ayırıcılığın korunarak, analiz süresinin kısılmasıdır. Bu sonuçlar geliştirilen kolon ile katekolaminlerin izokratik ayrımının yapılabildiğini göstermektedir. Katekolaminlerin ayrımında, farklı akış hızlarında alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.32'de verilmektedir.



Şekil 4.32. Triazol halkası bağlı -poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda katekolaminlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.31’de verilmektedir.

Buradan görüldüğü gibi analitler için teorik kademe sayısı artan akış hızı ile düşüş göstermektedir. Buna bağlı olarak kademe sayısı artmaktadır. Bu durum ayırma veriminin hareketli faz akış hızının artışı ile azaldığını göstermektedir. En yüksek teorik kademe sayısı tiramin ile $24000 m^{-1}$ olarak gözlenmiştir. Sonuçlar triazol ligandı ile elde edilen kolonun, katekolaminler için, nükleotidlere göre daha iyi bir ayırma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

Kromatografik performansı dikkate alınarak seçilen PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşenlerin kromatografik ayrımı da gerçekleştirilmiştir. Bu ayırım 4 farklı ACN/su oranı için denenmiştir. Şekil 4.33'deki kromatogramlardan ve Çizelge 4.12'deki çözünürlük değerlerinden görüldüğü gibi 95.0/5.0 mL/mL ACN/su oranında iyi bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Bu kromatogramlara ait çözünürlük değerlerine bakıldığında bu değerlerin büyük ölçüde eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin üzerinde olduğu görülmektedir, bu da aynı zamanda başarılı bir kromatografik ayırımın yapıldığının göstergesidir. Alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi veren Şekil 4.34'e bakıldığında piklerin birbirine 90.0/10.0 mL/mL ACN/su oranlarında yakın olduğu, 95.0/5.0 mL/mL ve 97.5/2.5 mL/mL ACN/su oranlarında ise daha iyi bir ayırım olduğu gözlenmektedir. Analitlerin polaritesi arttıkça kolonda tutulmaları ve dolayısıyla alıkonma faktörü de artmaktadır.

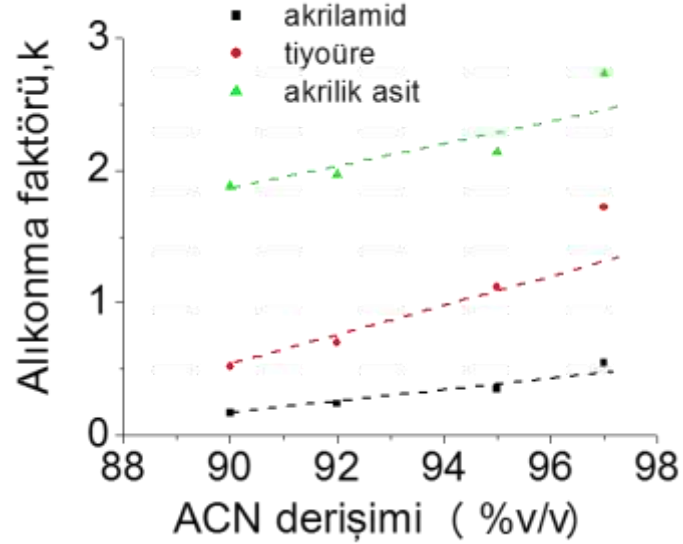


Şekil 4.33. Triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda farklı ACN/su oranları ile akrilik bileşenlerin izokratik ayrımı Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.4 mL/dk, UV dedektör, 260 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) 90.0/10.0, (B) 92.0/8.0, (C) 95.0/5.0, (D) 97.0/3.0, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.

Çizelge 4.12. PT-4 kodlu kolonda farklı ACN/su^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

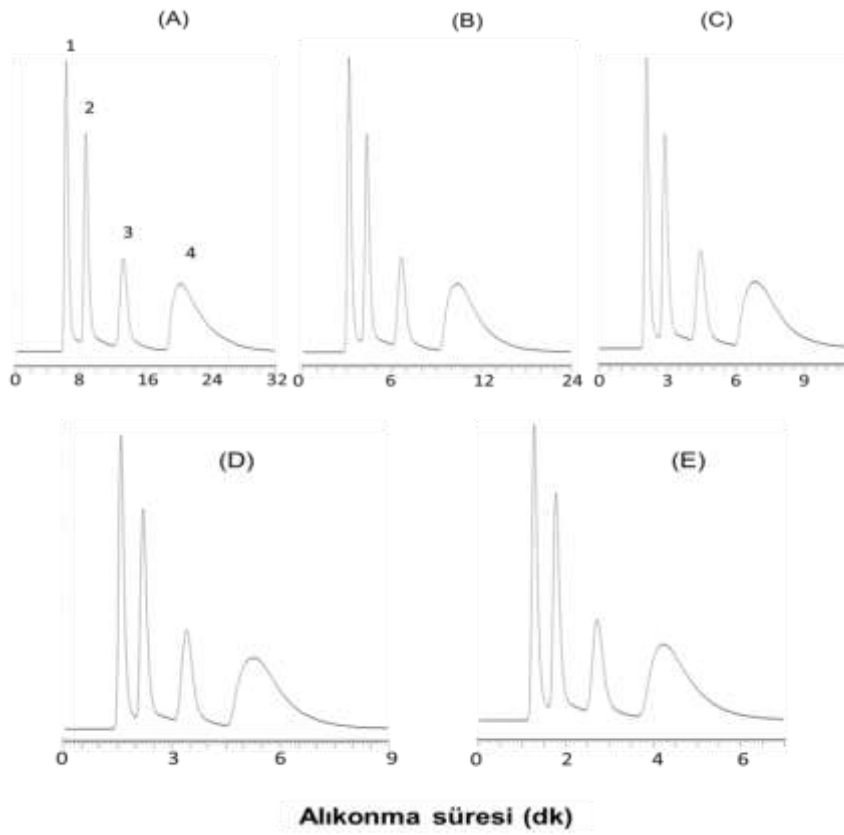
Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
90.0/10.0	0.91	1.54	2.25
92.5/7.5	1.47	1.93	1.71
95.0/5.0	2.00	3.28	1.50
97.5/2.5	2.73	3.38	1.30

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Akış hızı: 0.4 mL/dk Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.



Şekil 4.34. PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşen karışımı ayırımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi.

Kolon için en uygun hareketli faz derişiminin (95.0/5.0 mL/mL) belirlenmesinin ardından kolonun farklı akış hızlarında ayırma davranışı incelenmiştir. Şekil 4.35'te farklı hareketli faz akış hızlarında alınan kromatogramlar ve Çizelge 4.13'te bu kromatogramlardan elde edilen çözünürlük değerleri verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi, kromatografik ayırım 0.1-0.5 mL/dk aralığındaki bütün akış hızı değerlerinde yapılabilmektedir. 0.5 mL/dk akış hızında kromatografik ayırımın 5 dk gibi kısa bir sürede başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir.



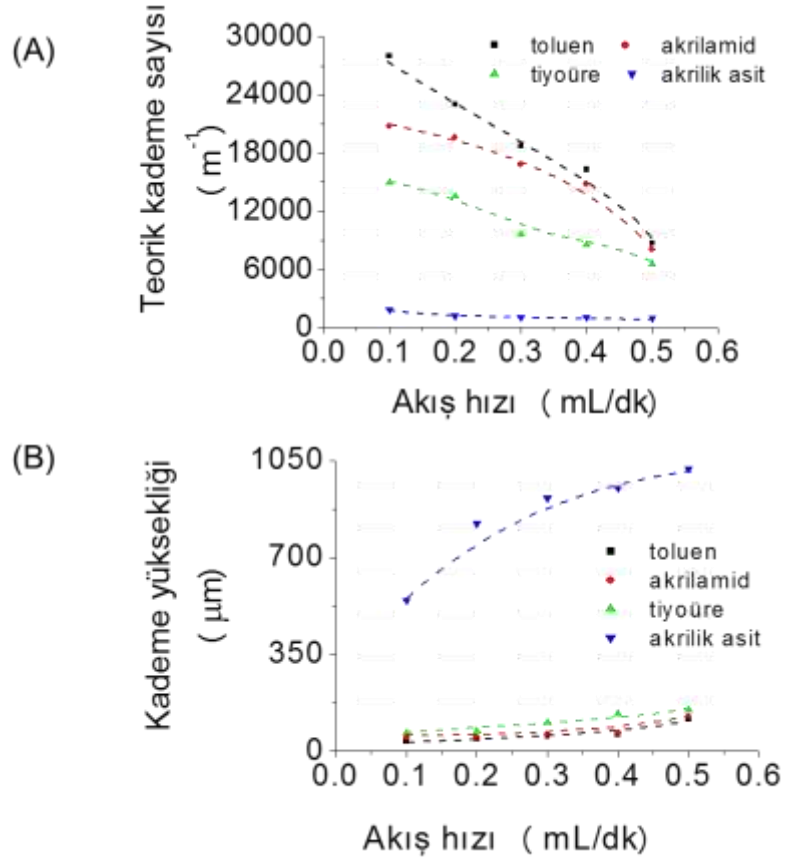
Şekil 4.35. Triazol halkası bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşenlerin izokratik ayırımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95.0/5.0 mL/mL, Akış hızı (mL/dk): (A) 0.1, (B) 0.2, (C) 0.3, (D) 0.4, (E) 0.5, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.

Çizelge 4.13. Akrilik bileşikler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Pik Çözünürlüğü			
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	2.88	3.47	1.96
0.20	2.72	3.40	1.80
0.30	2.65	3.32	1.70
0.40	2.00	3.28	1.60
0.50	1.97	2.80	1.50

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95.0/5.0 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 260 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.

Akrilik bileşikler analit olarak kullanıldığında, farklı akış hızlarında alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.36'da verilmektedir. Şekil 4.36'da teorik kademe sayısı artan akış hızı ile düşerken; kademe yüksekliği artan akış hızı ile artış göstermektedir. Teorik kademe sayısı alıkonmayan analit ile hesaplandığında 30000 m^{-1} değerine ulaşmıştır. Özellikle akrilamid ve tiyoüre analitleri için teorik kademe yüksekliği değerlerinin 50-150 μm aralığında değiştiği görülmektedir. Kromatografik çalışmalar, triazol halkası-bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonun, Çizelge 2.6'da verilen silika ve polimer bazlı kolonlarla karşılaştırıldığında, HILIC modunda başarılı bir ayırma performansına sahip olduğunu göstermektedir. Kolonda akrilik asit için bulunan yüksek kademe değeri, akrilik asitin zıt yüklü triazol ligandı ile elektrostatik etkileşimi ile açıklanabilir.

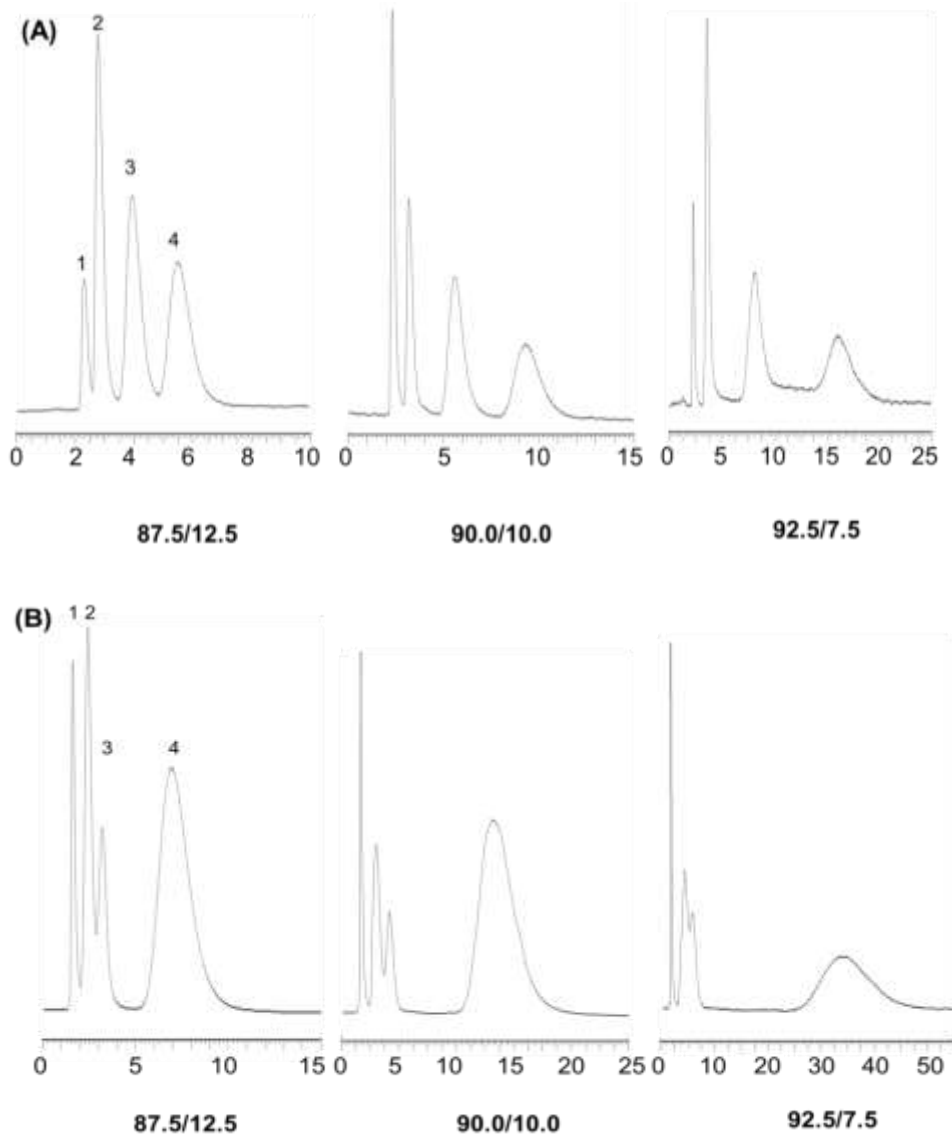


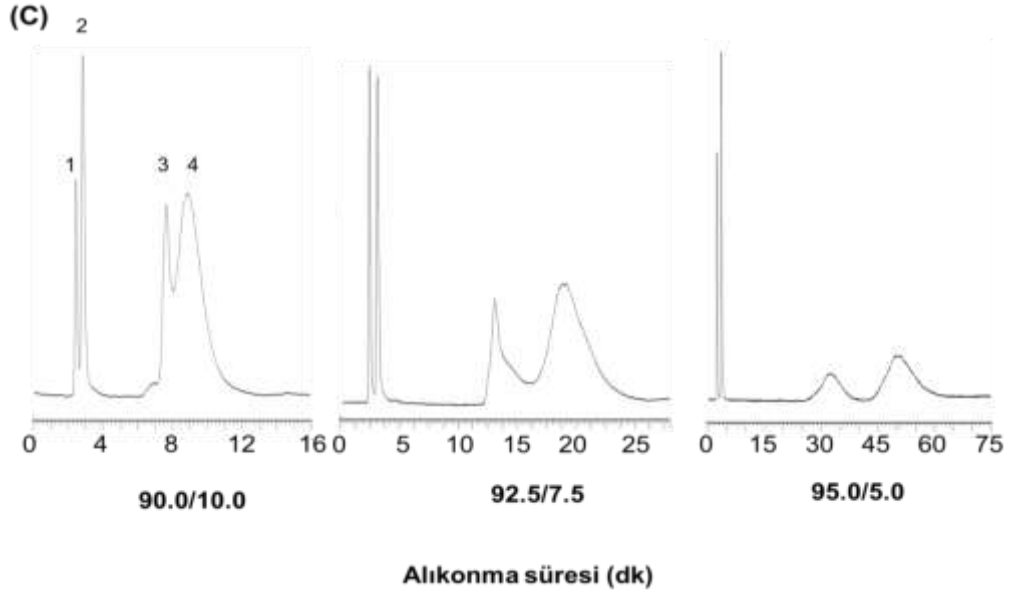
Şekil 4.36. Triazol halkası bağlı -poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış PT-4 kodlu kolonda akrilik bileşenlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe sayısı (B) kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.35'te verilmektedir.

4.2.3. Zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküllerin HILIC modunda sabit faz olarak kullanılması ile yapılan kromatografik çalışmalar

Zwitteriyonik formda, 3-(metakrilamino)propil dimetil(3-sulfopropil) amonyum hidroksit (MESH) monomeri kullanılarak yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu ile zwitteriyonik sabit faz sentezi yapılmıştır. Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak sentezlenen partiküllerin HILIC modunda, izokratik koşullarda, ayırma ortamı olarak kullanılması ile elde edilen kromatografik performanslar bu bölümde verilmektedir.

Zwitteriyonik ligand bağlı partiküllerin HPLC kolonuna dolgulanmasını takiben, toluen, urasil, adenin ve guanin analitlerini içeren nükleotid karışımı ile kromatografik performans deneylerine geçilmiştir. HILIC deneylerinde toluen alıkonmayan analit olarak kullanılmıştır. Farklı yüzey başlatıcı türleri ile elde edilen (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4) zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonlarda, farklı ACN/su oranları kullanılarak elde edilen kromatogramlar Şekil 4.37'de verilmektedir. Bu kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.14'te verilmektedir.





Şekil 4.37. Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak SI-ATRP ile elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonlarda farklı ACN/su oranları ile nükleotid karışımının izokratik ayrımı. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+su + % 0.05 AAc, Akış hızı: 0.5 mL/dk, UV dedektör, 254 nm, ACN/su oranı (mL/mL): (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP, (C) HPMA-Cl-b-ATRP, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. adenin, 4. guanin.

Çizelge 4.14. Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak SI-ATRP ile elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonlarda nükleotid karışımı için farklı ACN/su^a oranları ile alınan kromatogramlardan hesaplanan çözünürlük değerleri

Kolon: Cl-PTMS-b-ATRP			
Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
87.5/12.5	1.33	1.63	1.42
90.0/10.0	2.43	2.76	2.07
92.5/7.5	3.04	2.98	2.18

Kolon: BrIBuBr-b-ATRP			
Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
87.5/12.5	1.66	0.77	2.00
90.0/10.0	2.08	1.21	2.87
92.5/7.5	2.20	1.14	2.96

Kolon: HPMA-Cl-b-ATRP			
Pik çözünürlüğü			
ACN/su (mL/mL)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
90.0/10.0	1.22	4.11	0.50
92.5/7.5	1.85	4.25	1.04
95.0/5.0	2.00	4.38	1.24

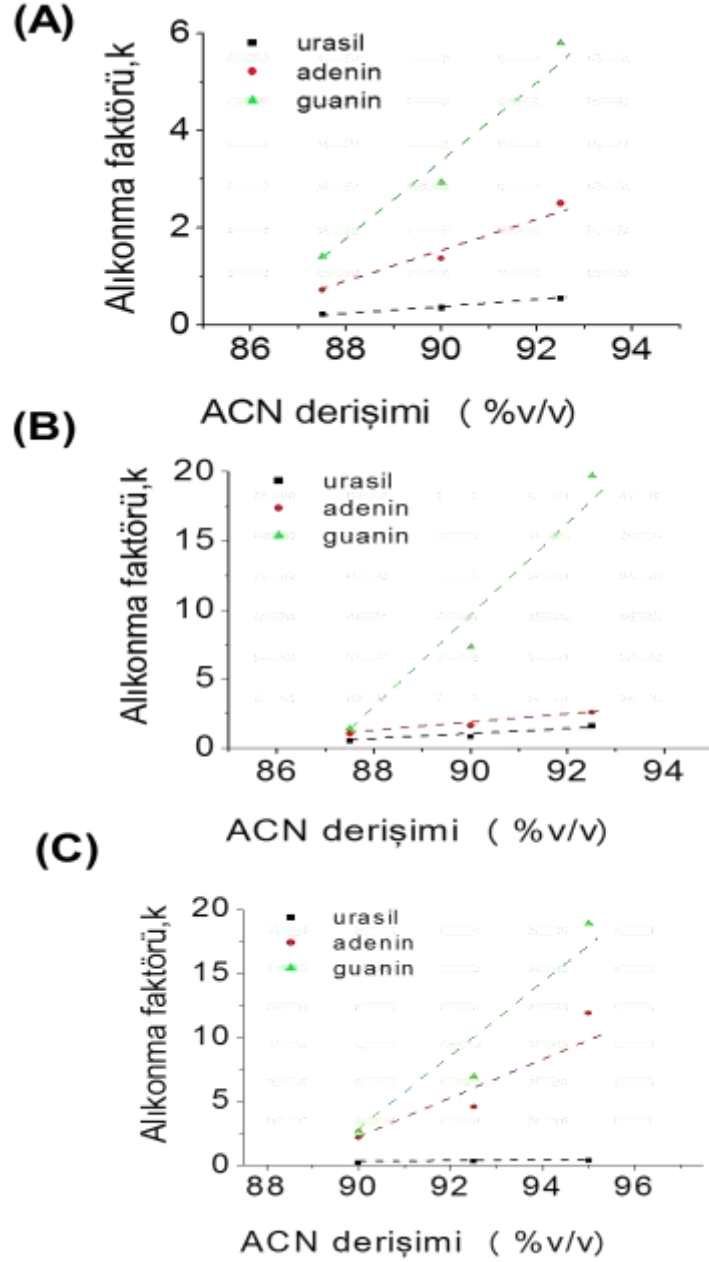
a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN/su, Akış hızı: 0.5 mL/dk Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 254 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. adenin, 4. guanin

Şekil 4.37A'da ve Çizelge 4.14'ten görüldüğü gibi analit olarak nükleotidler kullanıldığında Cl-PTMS-b-ATRP kolonu için çözünürlüğü daha yüksek (ayrımı daha iyi) kromatogramlar elde edilmiştir. Özellikle 90/10 ACN/su oranı ile elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında bu etki daha açık bir şekilde görülmektedir. Cl-PTMS-b-ATRP kodlu kolon, bu hareketli faz ile dörtlü nükleotid karışımının ayrımını 12 dakika gibi kısa bir sürede çok iyi bir şekilde yapabilmektedir.

Şekil 4.37B'de BrIBuBr-b-ATRP kolonu için verilen kromatogramlar ve Çizelge 4.14'te verilen çözünürlük değerleri incelendiğinde bütün ACN derişimlerinde urasil ve adenin analitlerinin birbirinden net bir şekilde ayrılmadığı görülmektedir. 90/10 mL/mL ACN/su oranı ile daha iyi çözünürlük değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu durumda kromatografik ayırma yaklaşık olarak 20 dakika sürmektedir. ACN derişimi arttığında hareketli faz polaritesinin azalması ile analitlerin alıkonma süreleri artmaktadır; ancak bu durumda analiz süresinin de uzadığı gözlenmektedir. Bu kolon için analiz süresi ve çözünürlük değerleri göz önüne alındığında en uygun ACN/su oranı değeri 90/10 mL/mL olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.37C ve Çizelge 4.14'te HPMA-Cl-b-ATRP kolon için verilen kromatogramlar ve çözünürlük değerleri incelendiğinde yalnızca 90/10 mL/mL ACN/su oranı ile piklerin birbirinden ayrıldığı görülmektedir. Ancak bu derişimde ayırma süresinin oldukça uzun olduğu (> 1 saat) not edilmelidir. .

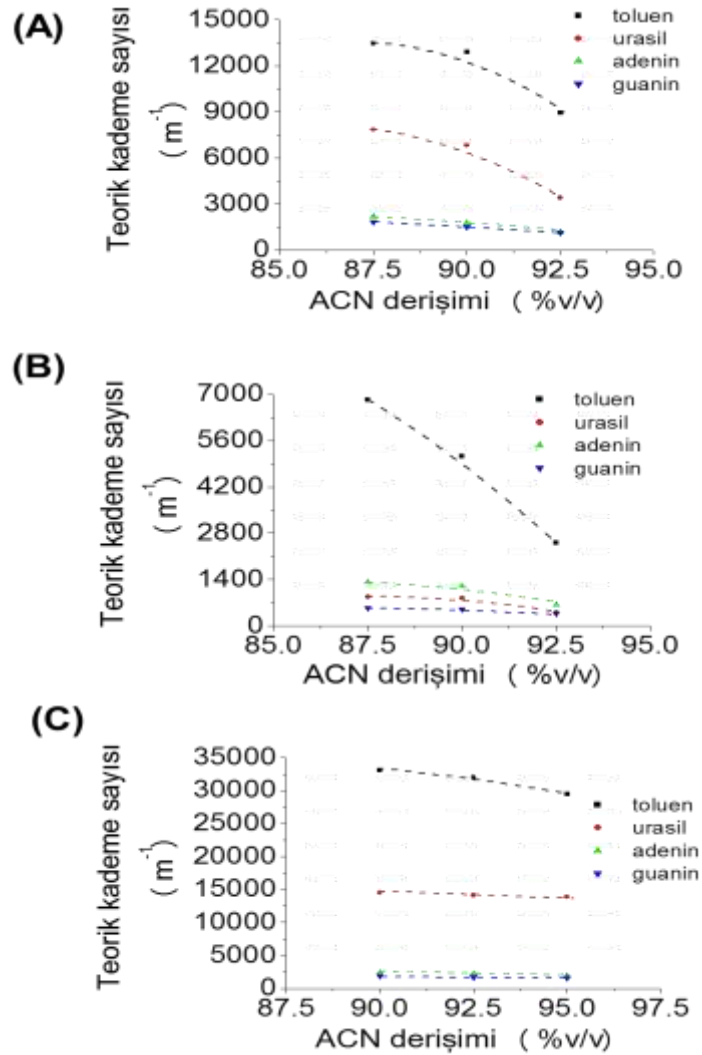
Farklı yüzey başlatıcı türleri kullanılarak SI-ATRP ile sentezlenen kolonlar için alıkonma faktörünün ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.38'de verilmektedir. En iyi ayırımın yapıldığı Cl-PTMS-b-ATRP kolonda, piklerin birbirine 87.5/12.5 mL/mL ACN/su oranlarında çok yakın olduğu, 90/10 mL/mL ve 92.5/7.5 mL/mL ACN/su oranlarında ise daha iyi bir ayırımın oluştuğu gözlenmektedir. Diğer kolonlar için ise ancak en yüksek ACN derişiminde alıkonma faktörlerinin birbirinden yeterince uzak olduğu görülmektedir. Analitlerin polaritesi arttıkça kolonda tutulmaları ve dolayısıyla alıkonma faktörleri de artmaktadır.



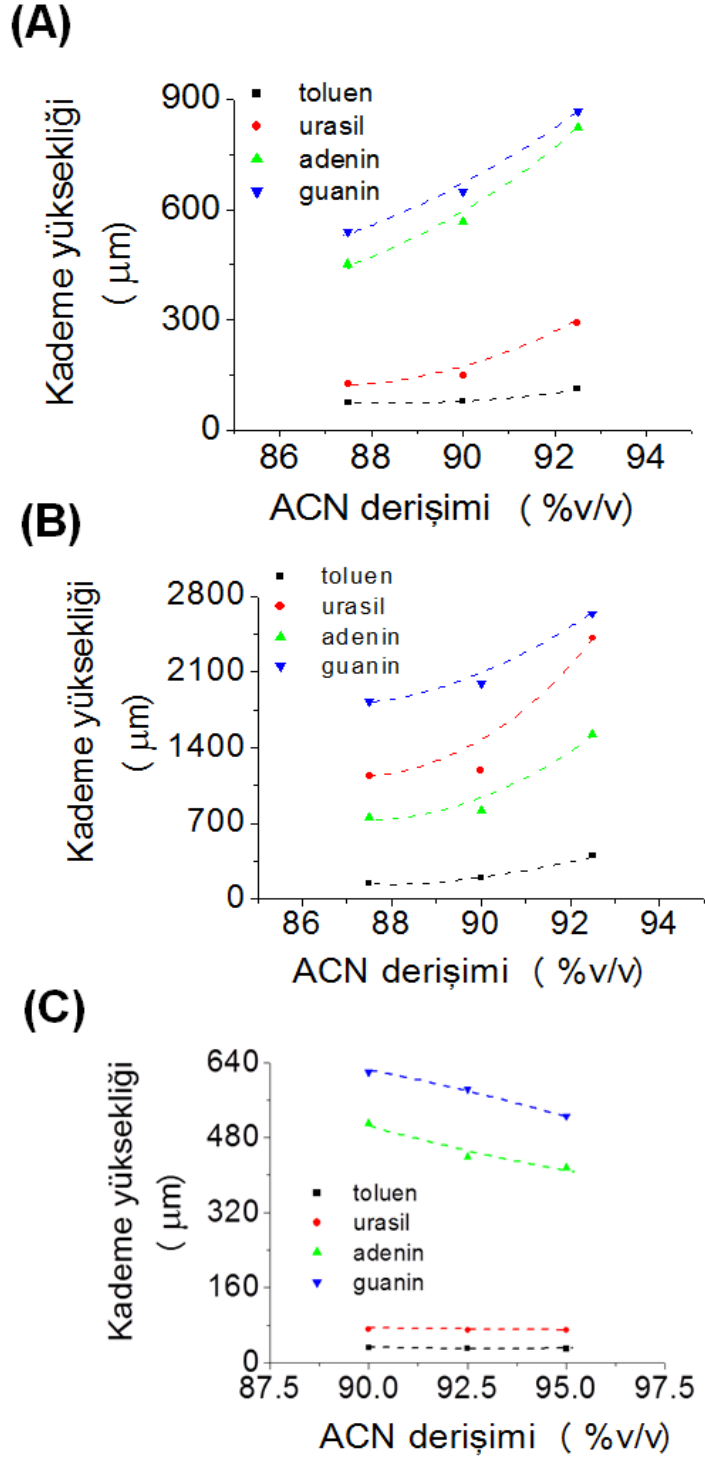
Şekil 4.38. (A) CI-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-CI-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımı ayırımı için farklı ACN derişimleri ile alıkonma faktörlerinin değişimi

Kromatografik performansın ve ayırma gücünün iki önemli kriteri olan teorik kademe sayısının ve kademe yüksekliğinin ACN derişimi ile değişimi Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'da verilmektedir. HPMA-CI-b ATRP kolonda toluen ve urasil için teorik kademe sayısı değerleri diğer kolonlara kıyasla daha yüksek, ancak adenin ve

guanin için elde edilenler ise daha düşüktür. Bu kolonun özellikle daha hidrofobik analitler için daha yüksek verim davranışı göstermesi dikkati çekmektedir. Bu durum kolonun hidrofilik ligand ile aşırı yüklenmesinin sonucu olabilir. Urasil hariç diğer nükleotidler için elde edilen verim değerleri, tüm analitler için elde edilen çözünürlük değerleri ve analiz süresi de dikkate alındığında Cl-PTMS-b-ATRP kolonun daha iyi kromatografik performansa sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.14, Şekil 4.39 ve 4.40).

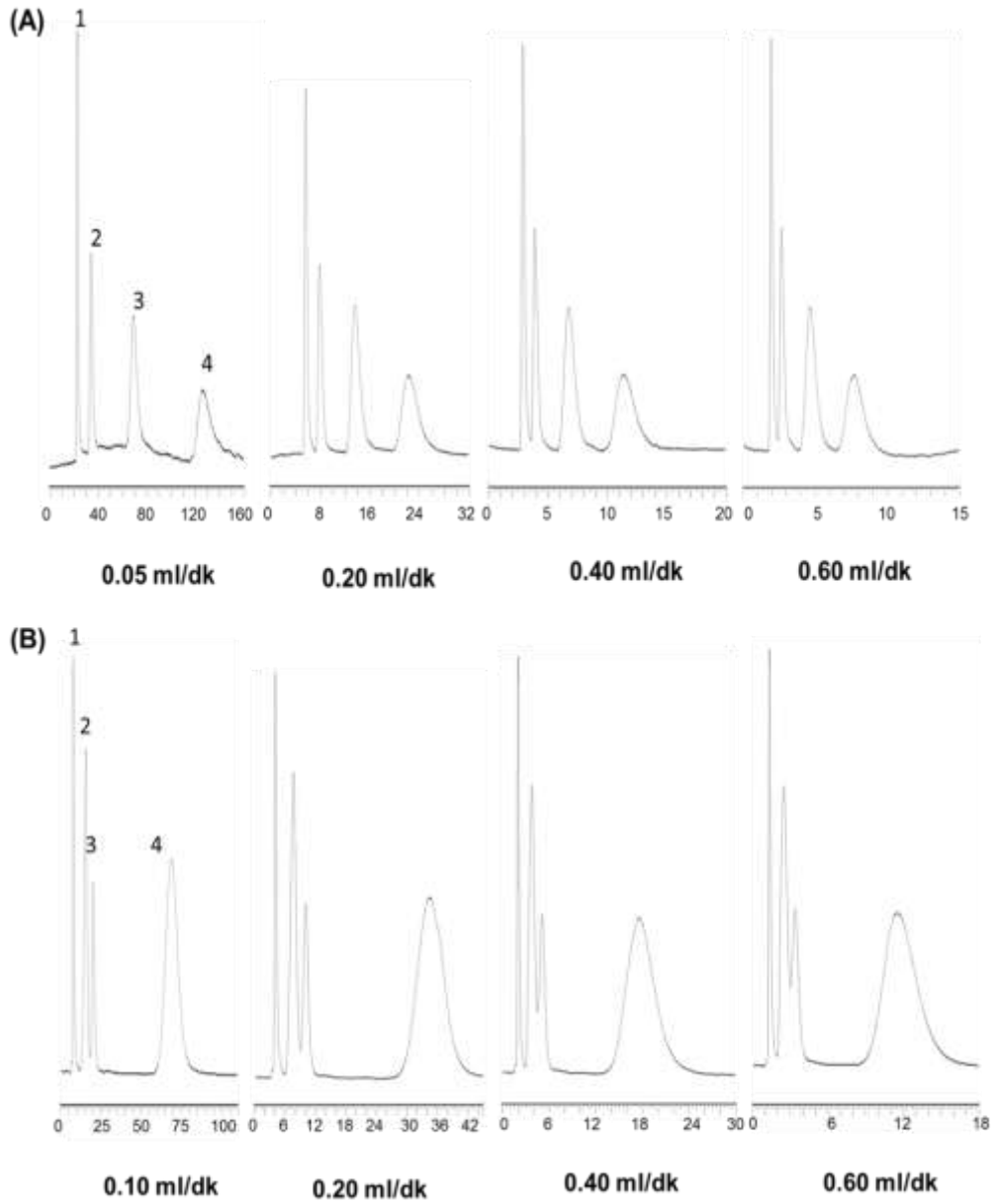


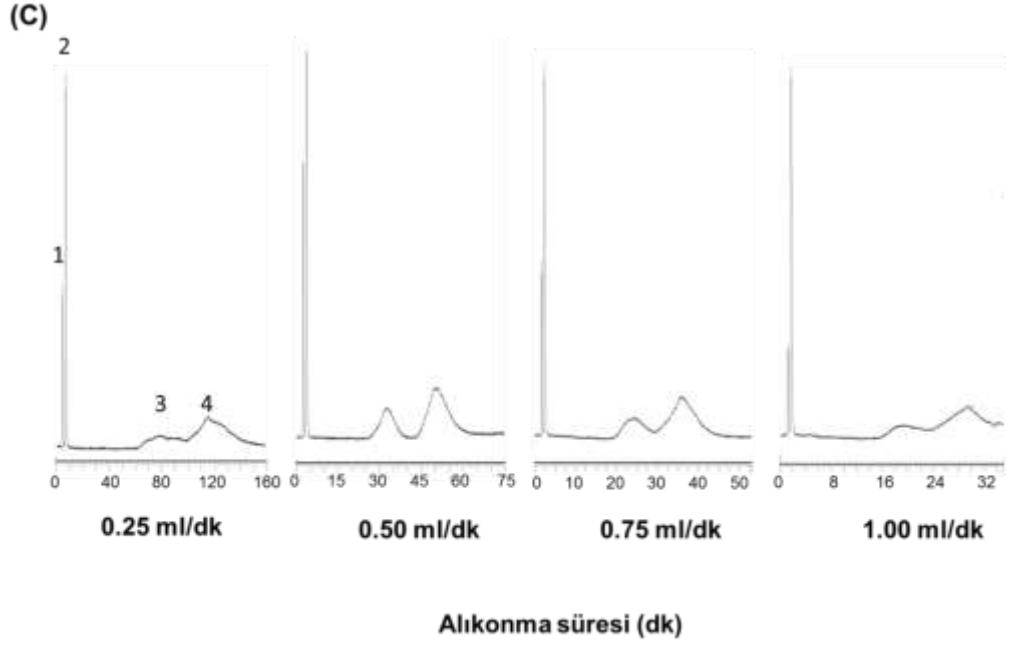
Şekil 4.39. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMa-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz derişimi ile derişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.37’de verilmektedir.



Şekil 4.40. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz derişimi ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.37 'de verilmektedir.

Şekil 4.41'de ve Çizelge 4.15'te, sırasıyla zwitteriyonik ligand bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) dolgulı kolonlar ile en uygun ACN derişiminde, akış hızının değiştirilmesi ile elde edilen kromatogramlar ve bu kromatogramlardan hesaplanan çözünlük değerleri verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi Cl-PTMS-b-ATRP kolonda bütün akış hızlarında, BrİBuBr-b-ATRP kolonda ise en düşük akış hızı olan 0.10 mL/dk akış hızında nükleotid izokratik ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Cl-PTMS-b-ATRP kolonda akış hızının 0.05 ml/dk'dan 0.60 ml/dk değerine çıkarılması ile analiz süresi 10 kat azalmaktadır.





Şekil 4.41. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonda nükleotid karışımının izokratik ayırımında hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A), (B) 90/10 mL/mL (C) 95/5 mL/mL, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. urasil, 3. adenin, 4. guanin.

Çizelge 4.15. Nükleotidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri.

Kolon: CI-PTMS-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 90/10 mL/mL
Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.05	5.00	5.44	3.86
0.20	3.64	3.70	2.53
0.40	2.85	3.10	2.42
0.50	2.26	2.76	2.07
0.60	2.22	2.56	1.96

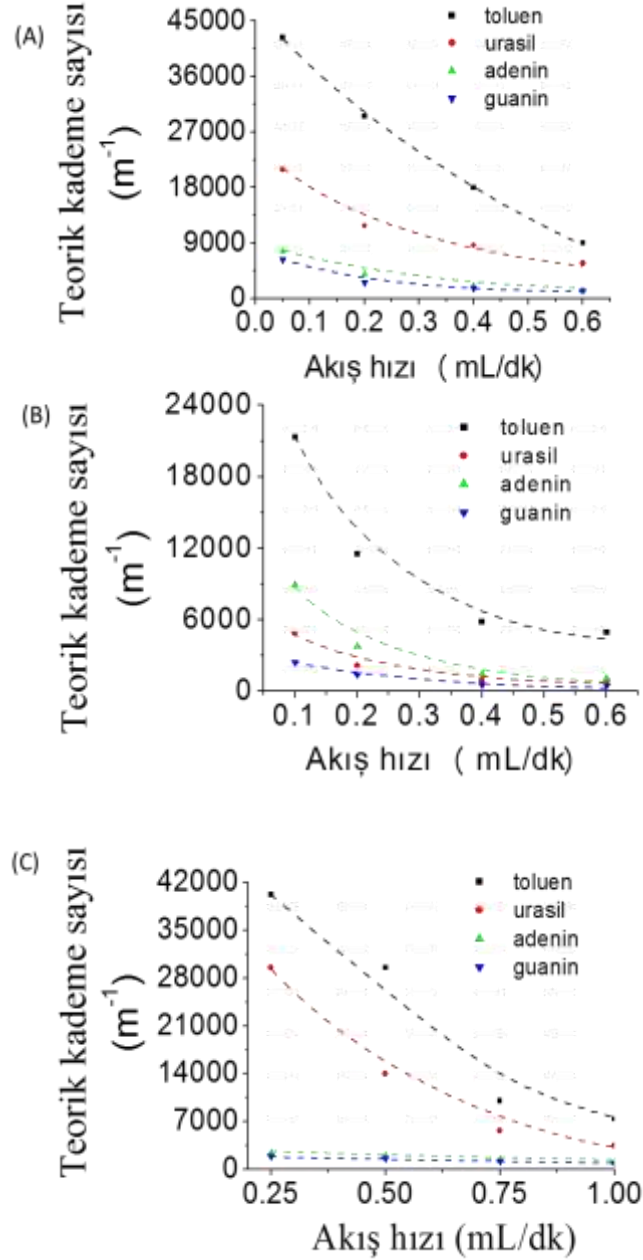
Kolon: BrIBuBr-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 90/10 mL/mL
Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	4.93	2.22	6.17
0.20	3.30	1.43	4.60
0.40	2.66	1.25	3.11
0.50	2.28	1.10	2.82
0.60	2.10	1.00	2.70

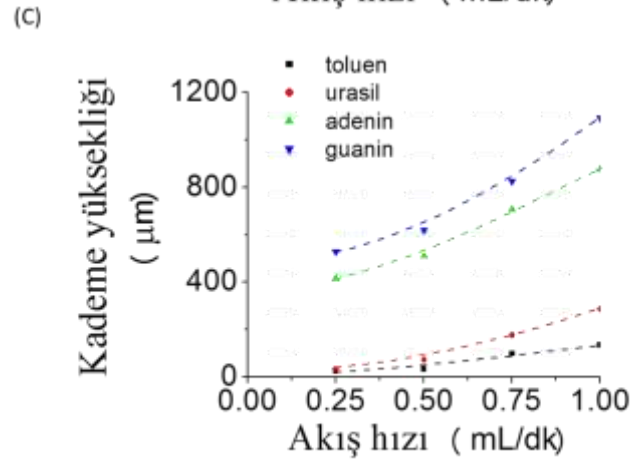
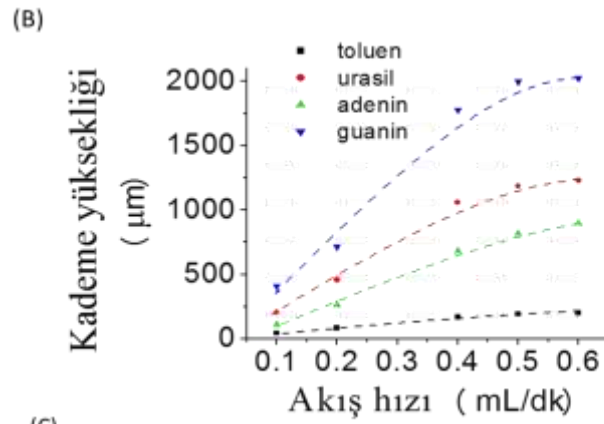
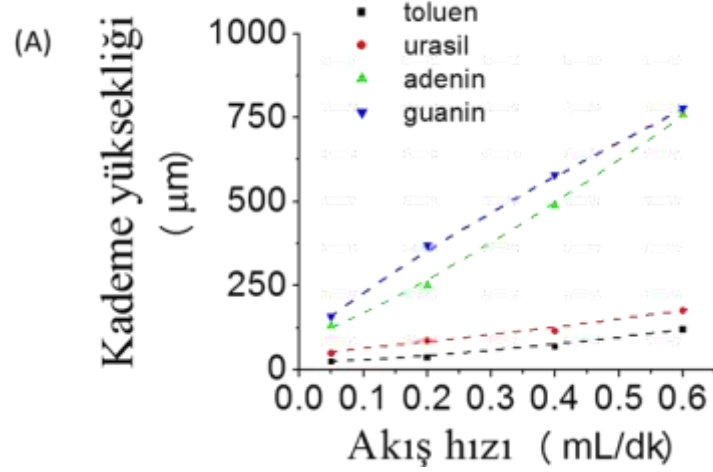
Kolon: HPMA-CI-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95/5 mL/mL
Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.25	2.50	5.00	1.30
0.50	2.00	4.38	1.25
0.75	1.89	4.00	1.13
1.00	1.76	3.87	1.09

Farklı yüzey başlatıcıları kullanılarak SI-ATRP ile sentezlenen kolonlar için teorik kademe sayısının ve teorik kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi (van-Deemter grafikleri) Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te verilmektedir.



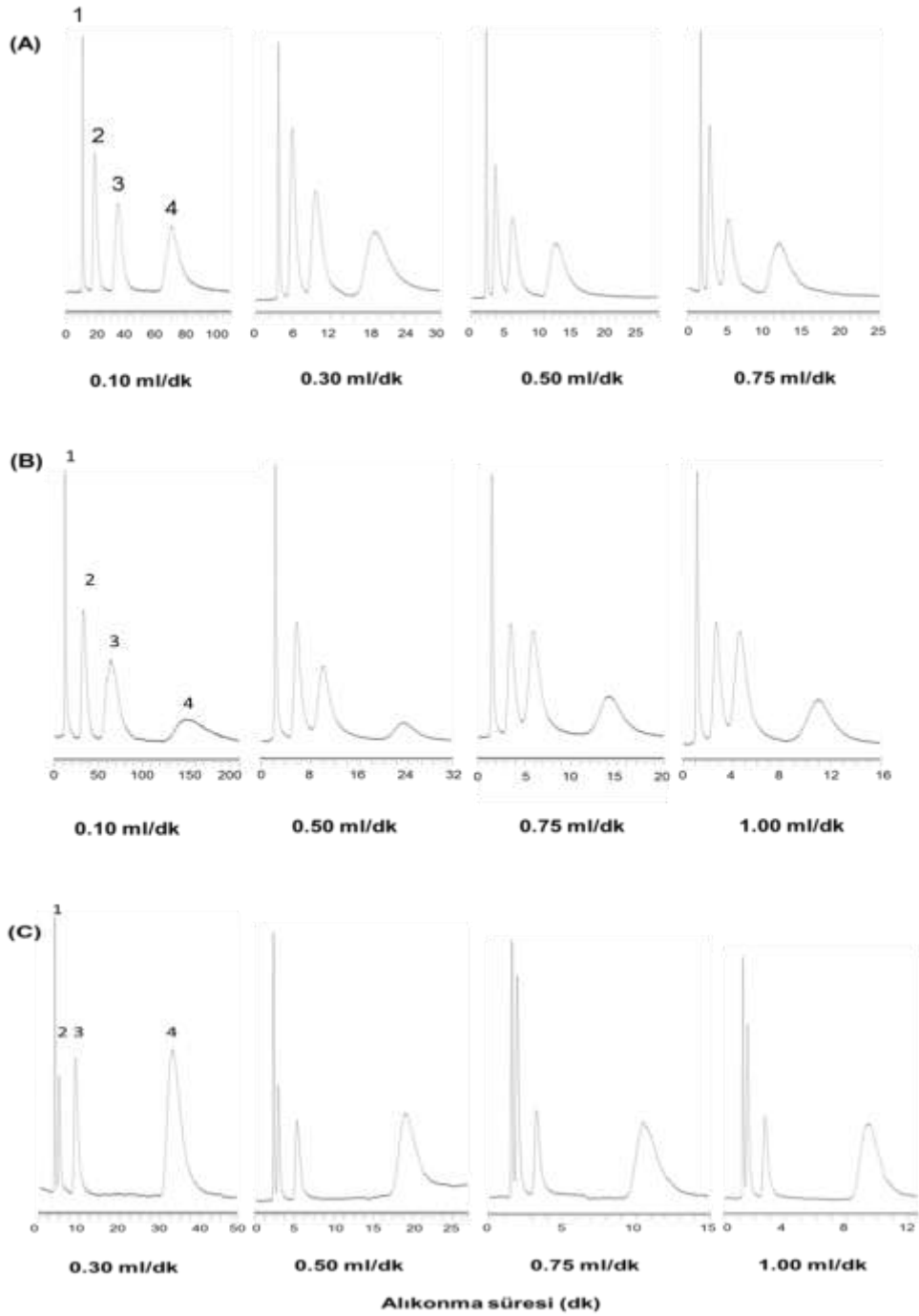
Şekil 4.42. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.41'de verilmektedir.



Şekil 4.43. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-CI-b-ATRP kolonlarında nükleotid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.41’de verilmektedir.

Kolon verimi grafikleri incelendiğinde, Cl-PTMS-b-ATRP kolonda alıkonmayan analit, toluen ile 45000 kademe/m değerlerine ulaşan teorik kademe sayısının düşük akış hızlarında elde edilebildiği görülmektedir. Nükleotidler için elde edilen teorik kademe sayıları ise referans analite kıyasla daha düşüktür. En yüksek teorik kademe sayısı urasil ile Cl-PTMS-b-ATRP kolonda 0.05 mL/dk akış hızında 21000 kademe/m olarak saptanmıştır. Elde edilen ayırma verimleri analiz Cl-PTMS-b-ATRP kolonun nükleotidler için özellikle 0.1 mL/dk gibi düşük akış hızlarında başarılı bir ayırma performansına sahip olduğunu göstermektedir.

Farklı yüzey başlatıcıları kullanılarak SI-ATRP ile sentezlenen kolonlarda nükleosidlerin de izokratik ayırımı incelenmiştir. Ön deneyler ile nükleosidlerin kromatografik ayırımında tüm kolonlar için en uygun ACN/su hacimsel oranı 92.5/7.5 mL/mL olarak saptanmıştır. Bu ACN/su oranında, akış hızı 0.1-1.0 mL/dk aralığında değiştirilerek, nükleosidlerin ayırımının yapıldığı kromatogramlar Şekil 4.44'te, elde edilen çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.16'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi hareketli faz akış hızının artışı, çözünürlük değerlerinde önemli bir farklılık olmaksızın, analiz süresini Cl-PTMS-b-ATRP ve HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarda yaklaşık olarak 1/4 oranında; BrIBuBr-b-ATRP kolonda ise 1/12 oranında azaltmaktadır. Bütün akış hızlarında elde edilen çözünürlük değerlerinin iyi bir kromatografik ayırım için eşik değer olarak kabul edilen 1.5 değerinin üzerinde olması; Cl-PTMS-b-ATRP kolonda nükleosidlerin kromatografik ayırımının başarıyla yapılabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.44. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMa-Cl-b-ATRP kolonda nükleosidlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, (UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A),(C) 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin (B) 1. timidin, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin.

Çizelge 4.16. Nükleosidler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları^a ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Kolon: Cl-PTMS-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL
Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	3.61	2.90	3.29
0.30	2.57	2.00	2.25
0.50	2.44	1.79	2.09
0.75	2.41	1.75	2.06

Formül: BrIBuBr-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL
Pik çözünürlüğü

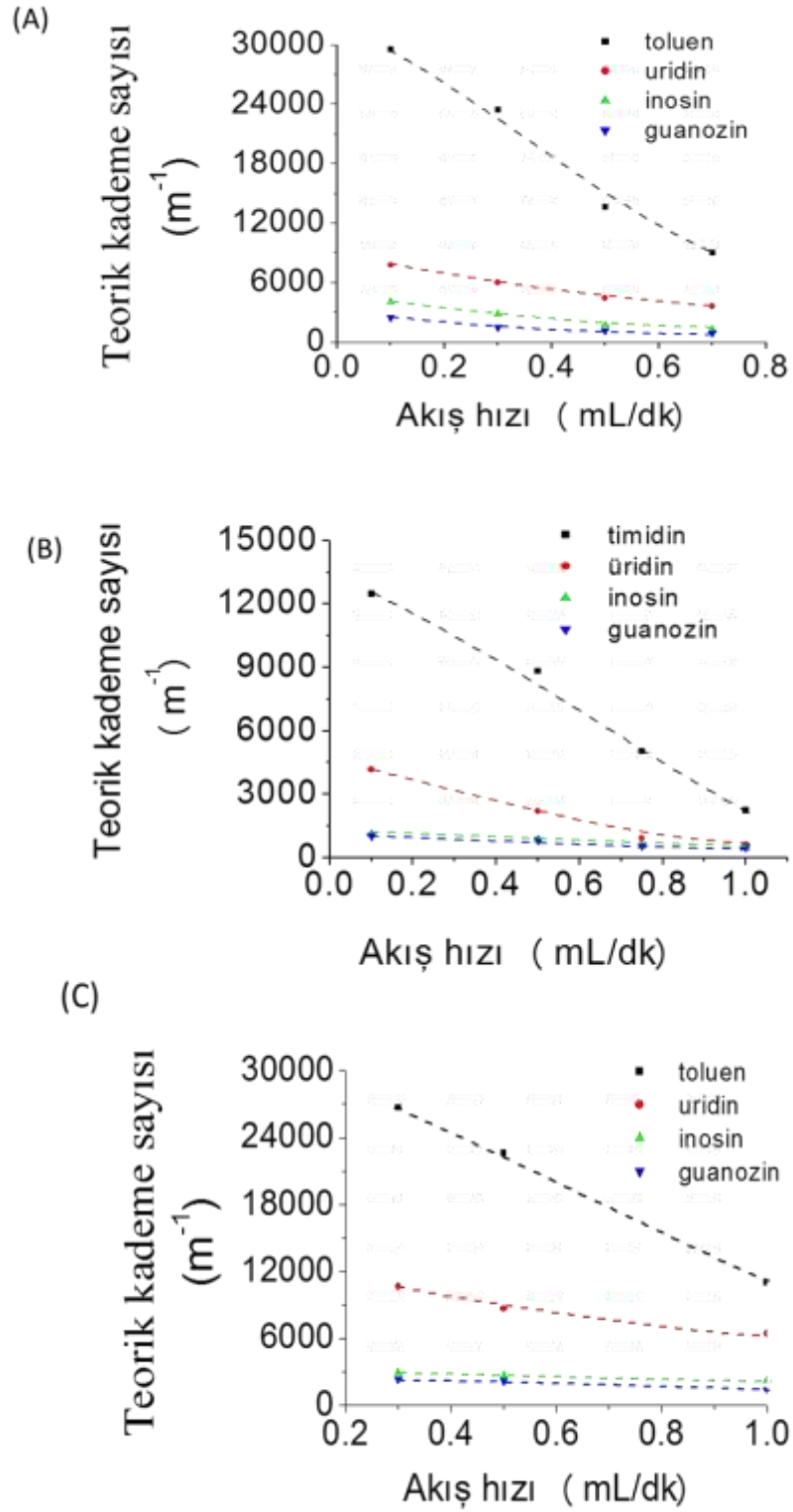
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	4.80	1.90	2.44
0.50	3.25	1.63	2.41
0.75	2.63	1.40	2.38
1.00	2.28	1.29	2.13

Çizelge 4.16. devam ediyor

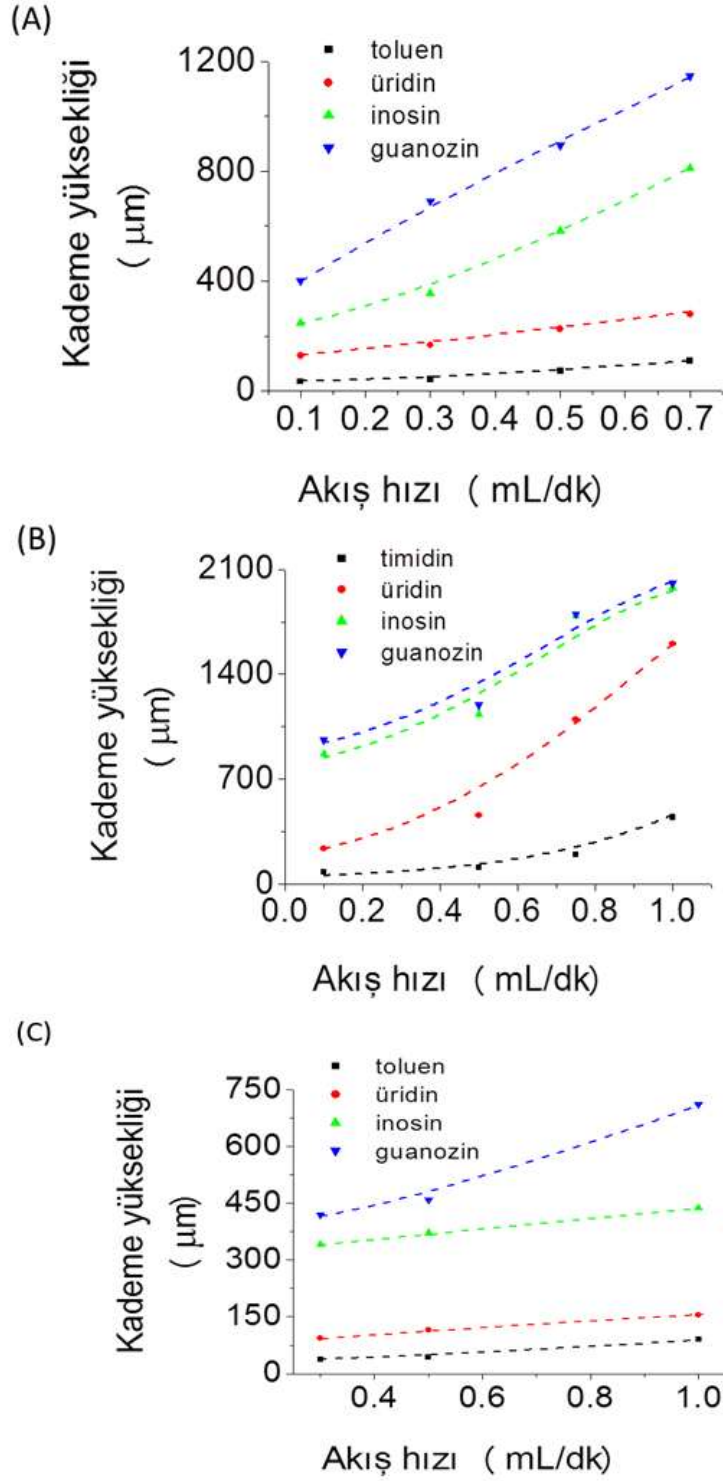
Kolon: HPMA-CI-b-ATRP			
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL			
Pik çözünürlüğü			
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.30	2.50	3.66	6.06
0.50	1.75	3.23	5.50
0.75	1.23	2.95	4.70
1.00	1.10	2.50	3.80

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAC, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: (A),(C) 1. toluen, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin (B) 1. timidin, 2. üridin, 3. inosin, 4. guanozin.

Nükleosidler analit olarak kullanıldığında, farklı akış hızlarında alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.45 ve Şekil 4.46'da verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi CI-PTMS-b-ATRP ve HPMA-CI-b-ATRP kolonlar ile bağıl olarak yüksek kolon ayırma verimleri elde edilmektedir. Ancak, HPMA-CI-b-ATRP kolonda en düşük akış hızı (0.3 mL/dk) hariç toluene ve üridin kromatografik ayırımının tam olarak yapılamaması bu kolonun önemli bir dezavantajını oluşturmaktadır. Sonuçta tüm nükleosidler ile elde edilen çözünürlük ve kolon verimi değerleri düşünüldüğünde CI-PTMS-b-ATRP kodlu kolon ile en iyi nükleosid ayırma davranışının elde edildiği söylenebilir.

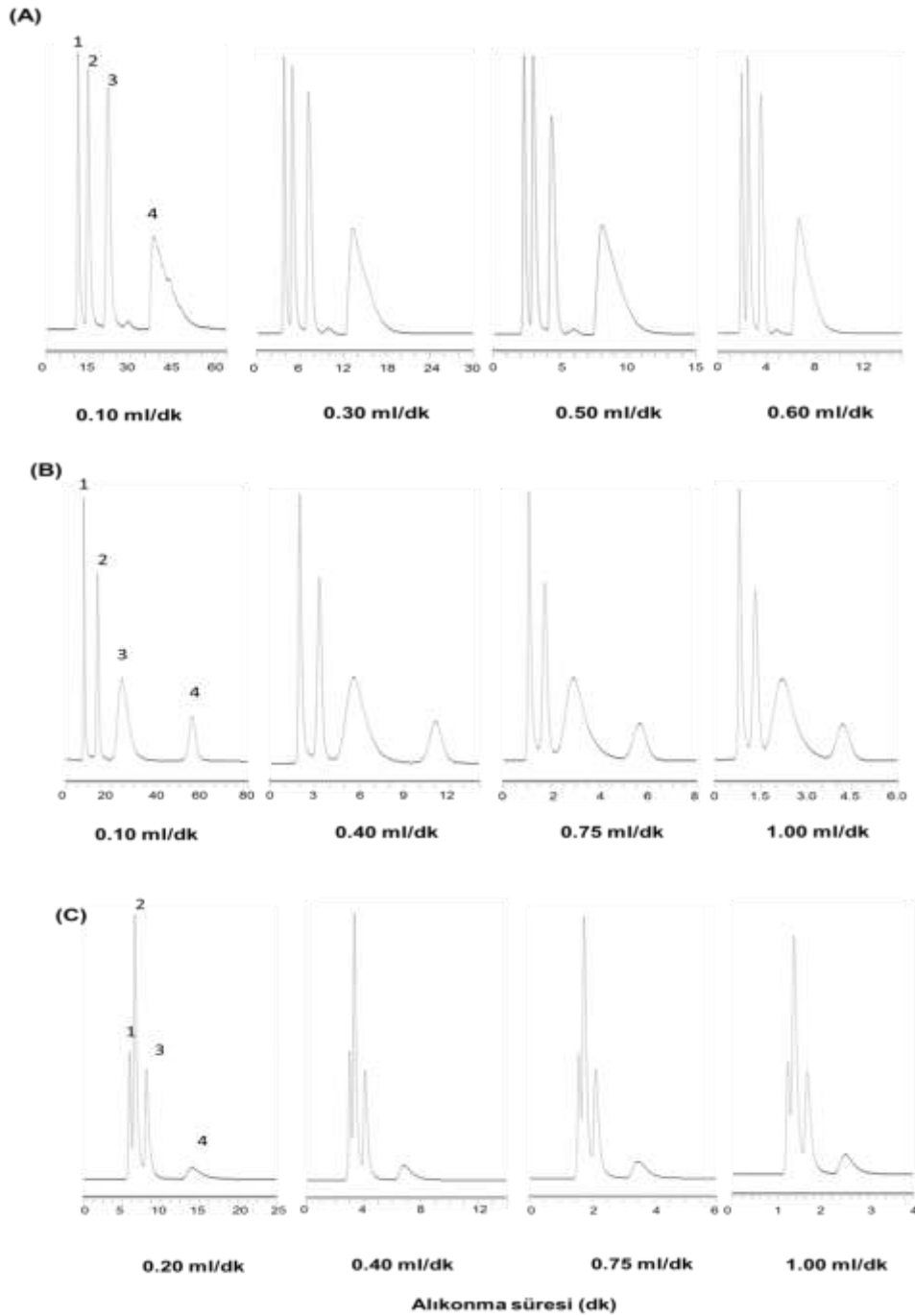


Şekil 4.45. (A) CI-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-CI-b-ATRP kolonlarında nükleosid karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.44'te verilmektedir.



Şekil 4.46. (A) CI-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-CI-b-ATRP kolonlarında nükleosid karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.44'te verilmektedir.

Zwitteriyonik ligand bağı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda ayrıca polar organik moleküllerin ayrımı da çalışılmıştır. Bu amaçla toluen, akrilamid, tiyoüre ve akrilik asit analitlerini içeren karışım seçilmiştir. Özellikle akrilamid ve akrilik asit'in bir arada bulunduğu analit karışımlarının kromatografik ayrımını, uygulama yönünden önemlidir. İlgili karışımın ayrımı için en uygun ACN/su oranı ön deneyler ile Cl-PTMS-b-ATRP, BrIBuBr-b-ATRP, HPMA-Cl-b-ATRP kolonlar için sırasıyla 95.0/5.0, 92.5/7.5, 97.5/2.5 mL/mL olarak saptanmıştır. Şekil 4.47'de belirlenen ACN/su oranı ile farklı akış hızlarında izokratik modda örnek karışımının ayrımının yapıldığı kromatogramlar verilmektedir. Bu kromatogramlar kullanılarak hesaplanan çözünürlük değerleri ise Çizelge 4.17' de verilmiştir. Kromatogramlar ve çözünürlük değerleri incelendiğinde geliştirilen Cl-PTMS-b-ATRP ve BrIBuBr-b-ATRP kolonlar ile bütün akış hızlarında örnek karışımın izokratik ayrımının yapılabilirdiği görülmektedir. Çözünürlük değerlerinin, artan akış hızı ile önemli ölçüde bir farklılık göstermemesi, yüksek akış hızlarında kolon performansının korunarak kısa zamanda kromatografik ayrımın yapılmasına olanak sağlamaktadır. Kromatogramlar ve çözünürlük değerleri incelendiğinde Cl-PTMS-b-ATRP ve BrIBuBr-b-ATRP kolonların, akrilik bileşenlerin ayrımını, yüksek çözünürlük değerlerinde, 8 dakika gibi kısa bir sürede yapabilmektedir.



Şekil 4.47. Farklı ATRP formülasyonlarıyla elde edilen zwitteriyonik ligand bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonda polar organik karışımının izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: (A) 95.0/5.0 (B) 92.5/7.5 (C) 97.5/2.5 mL/mL, (UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.

Çizelge 4.17. Polar organikler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızlarına ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Kolon: Cl-PTMS-b-ATRP

Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 95.0/5.0 mL/mL

Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	2.76	4.00	2.83
0.20	2.25	3.16	2.34
0.50	1.77	2.84	2.12
0.70	1.65	2.40	2.00

Formül: BrIBuBr-b-ATRP

Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL

Pik çözünürlüğü

Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	5.22	2.27	4.90
0.40	3.66	1.60	2.74
0.75	2.64	1.21	2.22
1.00	2.24	1.10	1.90

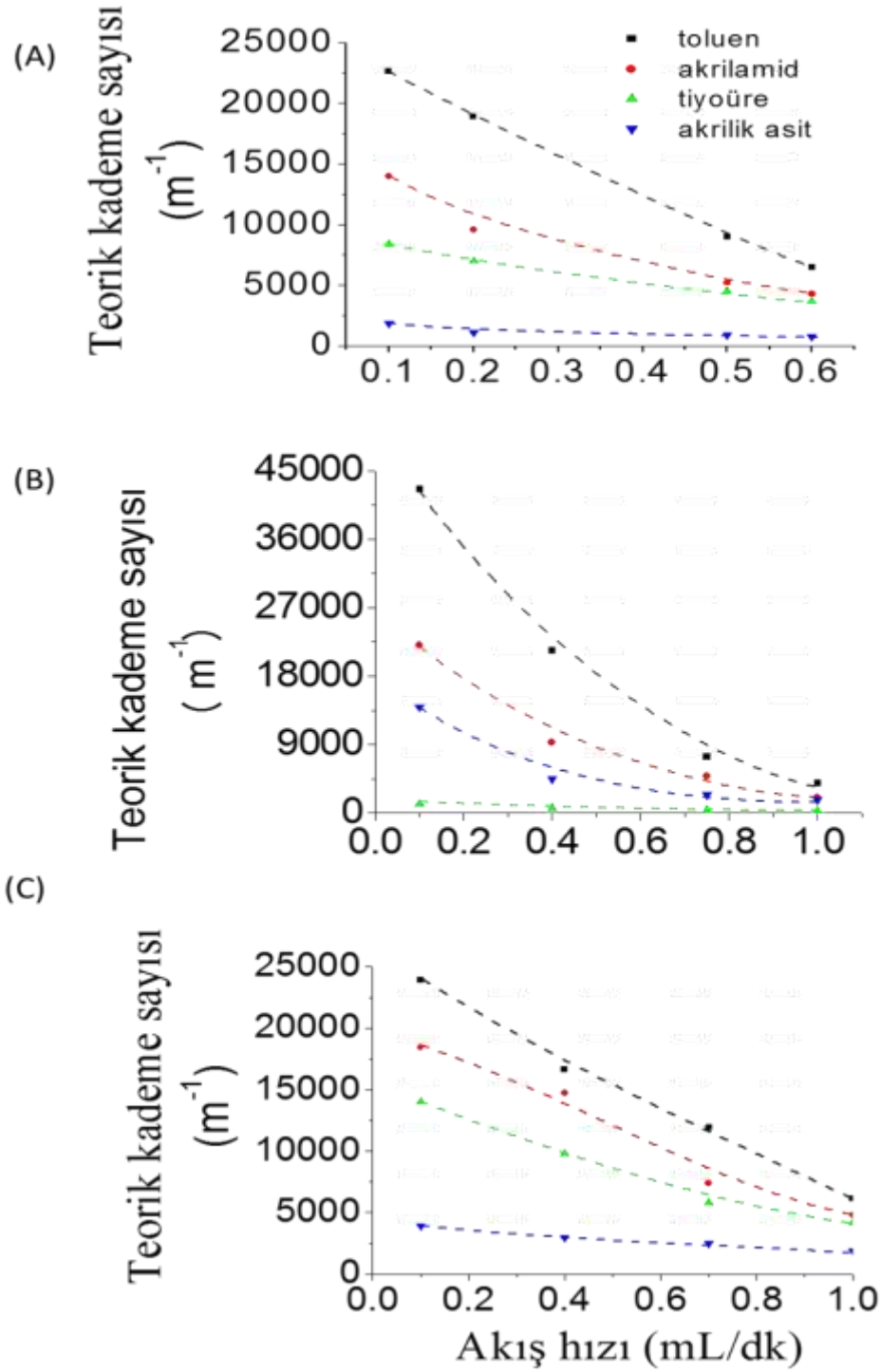
Çizelge 4.17. devam ediyor

Kolon: HPMA-CI-b-ATRP
Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 97.5/2.5 mL/mL
Pik çözünürlüğü

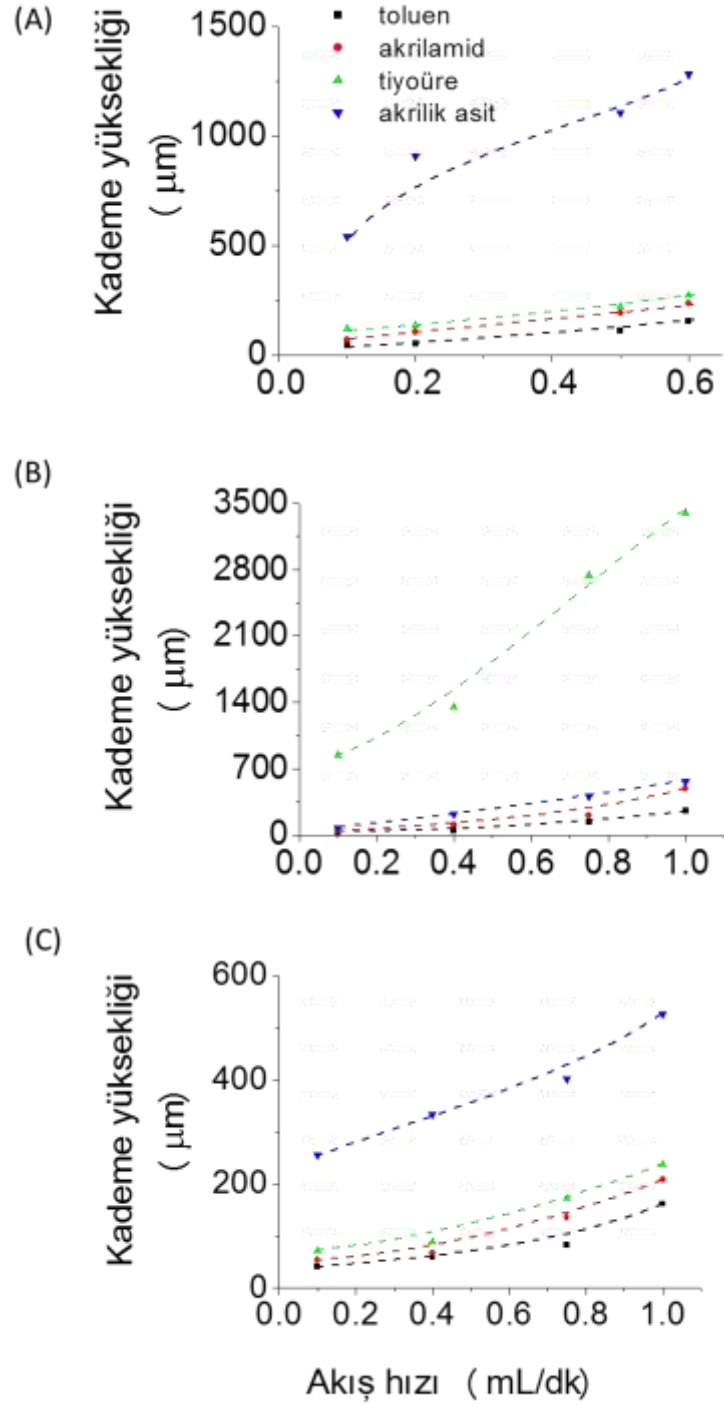
Akış hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	1.33	2.63	3.76
0.40	1.11	2.08	2.94
0.75	0.88	1.59	2.54
1.00	0.77	1.48	2.09

a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 254 nm, Pik sırası: 1. toluen, 2. akrilamid, 3. tiyoüre, 4. akrilik asit.

Polar organikler analit olarak kullanıldığında, teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimini gösteren grafikler Şekil 4.48 ve Şekil 4.49'da verilmektedir.



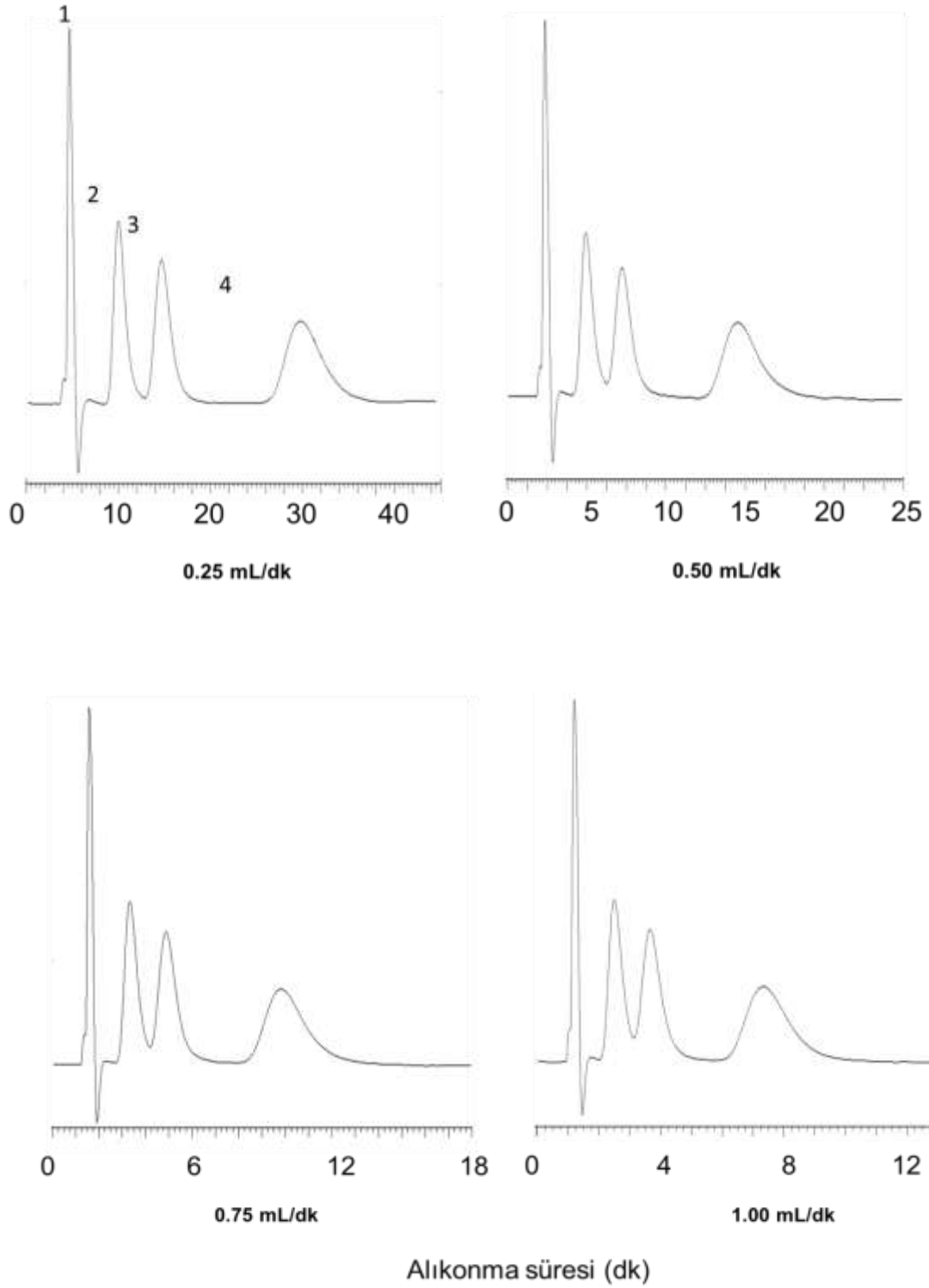
Şekil 4.48. (A) CI-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-CI-b-ATRP kolonlarında polar organik karışımının izokratik ayırımında teorik kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.47’de verilmektedir



Şekil 4.49. (A) Cl-PTMS-b-ATRP (B) BrIBuBr-b-ATRP (C) HPMA-Cl-b-ATRP kolonlarında polar organik karışımının izokratik ayırımında kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.47’de verilmektedir.

Şekil 4.49'a bakıldığında BrIBuBr-b-ATRP kolonda alıkonmayan analit, toluen ile 45000 kademe/m teorik kademe sayısı değerine ulaşıldığı görülmektedir. Polar organikler için en yüksek teorik kademe sayısı değeri ise yine aynı kolonda 22000 kademe/m ile akrilamid için elde edilmiştir. Artan polariteye bağlı olarak organik analitlerin teorik kademe sayısı değerinin azaldığı görülmektedir. Nükleotid ve nükleosidlere kıyasla daha apolar (hidrofobik) formda olan polar organik analit kullanımı ile gözlenen bu davranış, BrIBuBr-b-ATRP kolonunun sentezlenen üç kolon arasında hidrofilitate yönünden ortada yer aldığını göstermektedir.

Tez kapsamında Cl-PTMS-b-ATRP kolonunda organik asitlerin ayrımı da gerçekleştirilmiştir. Organik asit karışımı referans analit olarak toluen, dekanolik asit, asetik asit, p-toluik asit, benzoik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır. 92.5/7.5 mL/mL ACN/su oranı kullanılarak yapılan kromatografik analizler sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.50'de verilmektedir. Yüksek akış hızı değerlerinde analiz süresi belirgin bir şekilde düşmektedir. Akış hızı değeri 1.00 mL/dk 'ya çıkartıldığında ayrımın 8 dk gibi kısa bir sürede başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Organik asitlere ait farklı akış hızı değerlerinde alınan kromatogramlardan hesaplanan pik çözünürlük değerleri Çizelge 4.18'de verilmektedir. Çözünürlüklerin çoğunlukla 1.5 değerinin üzerinde olduğu ve özellikle düşük akış hızlarında başarılı bir ayrımın gerçekleştiği söylenebilir.



Şekil 4.50. CI-PTMS-b-ATRP kolonda organik asitlerin izokratik ayrımı üzerine hareketli faz akış hızının etkisi. Kolon: 300x2 mm iç çap. Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, UV dedektör, 214 nm, Kolondan çıkış sırası: 1. dekanıik asit, 2. asetik asit 3. p-toluik asit, 4. benzoik asit.

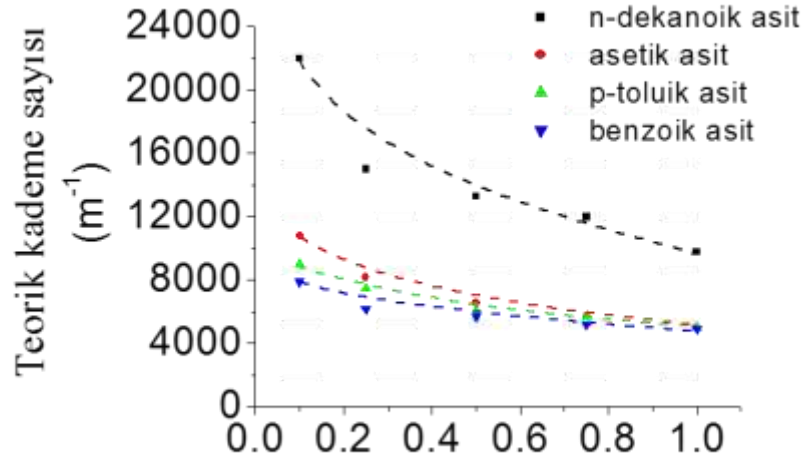
Çizelge 4.18. Organik asitler kullanılarak farklı hareketli faz akış hızları ile alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan çözünürlük değerleri

Pik çözünürlüğü			
Akış Hızı (mL/dk)	R(2/1)	R(3/2)	R(4/3)
0.10	5.80	2.72	4.54
0.25	4.17	1.97	3.35
0.50	3.02	1.44	2.49
0.75	2.95	1.38	2.44
1.00	2.48	1.29	2.12

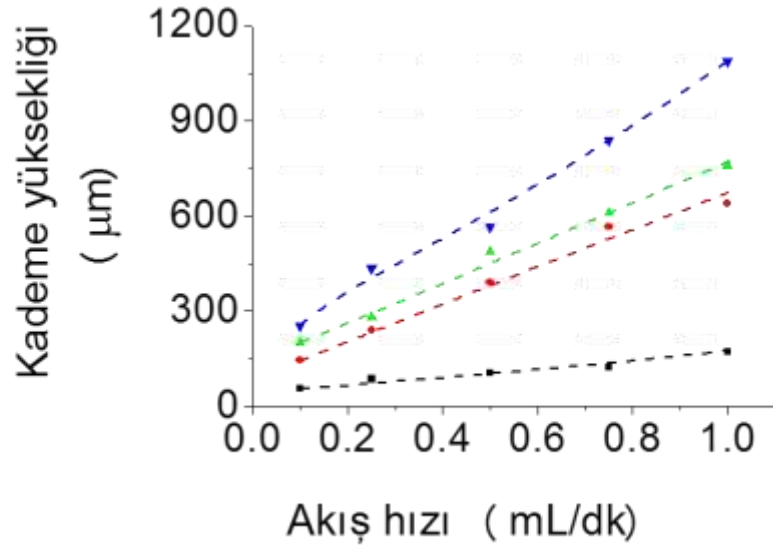
a: Kromatografik koşullar: Hareketli faz: ACN+ su + 0.05 % (v/v) AAc, Hareketli fazda ACN/su hacimsel oranı: 92.5/7.5 mL/mL, Kolon: 300x 2 mm iç çap, UV dedektör, 214 nm, Pik sırası: 1. dekanolik asit, 2. asetik asit 3. p-toluik asit, 4. benzoik asit.

Organik asitler kullanıldığında, farklı akış hızlarında alınan kromatogramlar yardımıyla hesaplanan teorik kademe sayısı ve kademe yüksekliğinin hareketli faz akış hızı ile değişimi ise Şekil 4.51'de verilmektedir.

(A)



(B)



Şekil 4.51. CI-PTMS-b-ATRP kolonunda organik asitlerin izokratik ayırımında (A) teorik kademe yüksekliğinin (B) kademe sayısının hareketli faz akış hızı ile değişimi. Kromatografik koşullar Şekil 4.50'de verilmektedir

Referans analit ile analiz koşullarında elde edilen maksimum kolon verimi 22000 kademe/m olarak belirlenmiştir. Organik asitler ile elde edilen teorik kademe sayısı değerleri ise 20000 kademe/m değerinin atındadır. Organik asitlere ait kolon verimi değerlerinin Çizelge 2.6'da verilen polimer bazlı HILIC kolonları ile kıyaslanabilir büyüklükte olduğu görülmektedir.

4.3. Kolon Verimliliği ve Kararlılık Çalışmaları

Kromatografik çalışmaların son bölümünde, geliştirilen kolonların kararlılığını test etmek amacıyla analizden analize ve günden güne tekrarlanabilirlik testleri yapılmıştır. Analizden analize tekrarlanabilirlik testleri için analitler günde dört kez kolona enjekte edilmiş ve analitlerin alıkonma süreleri kaydedilmiştir. Ayrıca günden güne tekrarlanabilirlik için arka arkaya 5 gün boyunca günde bir kez kromatografik analiz yapılmıştır.

TEA-OH bağlı poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon ile test karışımının ayırımında analizden analize ve günden güne hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.19'da verilmektedir. Çizelge 4.19'da görüldüğü üzere alıkonma süresi temel alınarak hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS); analizden analize % 0.50-0.85 aralığında, günden güne ise % 1.40-3.45 aralığında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kolon verimliliğinin iyi olduğu söylenebilir.

PT-4 kodlu triazol halkası içeren kolon ile nükleosid karışımının ayırımında analizden analize ve günden güne hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.20'de verilmektedir. Buradan görüldüğü üzere hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS); analizden analize % 0.55-0.90 aralığında, günden güne ise % 1.64-3.70 aralığında değişmektedir.

Çizelge 4.19. TEA-OH bağlı-poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kolon için test karışımı ile analizden analize ve günden güne bağlı standart sapma değerleri

Analitler	Analizden analize tekrarlanabilirlik BSS (%)	Günden güne tekrarlanabilirlik BSS (%)
Toluen	0.70	2.58
Urasil	0.45	1.57
İnosin	0.62	2.25
Adenin	0.84	3.50
Sitozin	0.65	2.40
Guanin	0.50	1.44

Çizelge 4.20. PT-4 kodlu polar formda hidroksil gruplu HILIC kolon için nükleosid karışımı ile analizden analize ve günden güne bağlı standart sapma değerleri

Analitler	Analizden analize tekrarlanabilirlik BSS (%)	Günden güne tekrarlanabilirlik BSS (%)
Toluen	0.90	3.70
Timidin	0.75	2.98
Sitidin	0.66	2.85
Adenozin	0.55	1.64
Guanozin	0.70	2.78

Zwitteriyonik ligand bağılı Cl-PTMS-b-ATRP kodlu kolonda ile nükleosid karışımının ayırımında analizden analize ve günden güne hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.21’de verilmektedir. Çizelge 4.21’de görüldüğü üzere alıkonma süresi temel alınarak hesaplanan bağıl standart sapma değerleri (BSS); analizden analize % 0.75-0.95 aralığında, günden güne ise % 2.54-3.87 aralığında değişmektedir. Bu sonuçlar ile sentezlenen tüm kolonlarda HILIC modunda tekrarlanabilir formda kromatografik analiz yapılabileceği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.21. Zwitteriyonik ligand bağılı Cl-PTMS-b-ATRP kodlu HILIC kolon için nükleosid karışımı ile analizden analize ve günden güne bağıl standart sapma değerleri

Analitler	Analizden analize tekrarlanabilirlik BSS (%)	Günden güne tekrarlanabilirlik BSS (%)
Toluen	0.75	2.54
Urasil	0.90	3.67
Adenin	0.85	3.54
Guanin	0.95	3.87

5. SONUÇLAR

Tez kapsamında, eşboyutlu-gözenekli partikül formda kromatografik sabit fazlar geliştirilmiş ve mikro/ nano-sıvı kromatografisi sisteminde, hidrofilik etkileşim kromatografisi modunda başarıyla kullanılmıştır. Elde edilen önemli sonuçlar aşağıda listelenmektedir.

- Eşboyutlu-gözenekli formda, reaktif poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller 4-7 μm boy değerine sahip olacak şekilde geliştirilen çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Partiküllerin boy ve gözeneklilik özellikleri, monomer faz bileşimi değiştirilerek kontrol edilmiştir.
- Sentezlenen partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özellikleri taramalı electron mikroskopu (SEM) ile belirlenmiştir. Yüzeyin süngerimsi gözenekli bir yapıya sahip olduğu SEM fotoğraflarından gözlemlenmiştir. SEM fotoğrafları kullanılarak yapılan hesaplar sonucu monomer fazındaki çapraz bağlayıcı derişiminin değişmesinin, ortalama partikül boyu ve boy dağılımı değişim katsayısı değerinde önemli değişime neden olmadığı görülmektedir. Değişim katsayısı (CV) değerleri hesaplandığında ise, farklı monomer faz bileşimleri ile hazırlanan partiküllerde bu değerlerin % 3.30 ile % 4.92 aralığında olduğu görülmüştür.
- Partikül yüzey özelliklerinin belirlenmesinde BET ve SEC yöntemleri kullanılmıştır. Yüzey alanı değerleri incelendiğinde artan çapraz bağlayıcı derişimi ile partikül özgül yüzey alanı değerinin belirgin şekilde artış gösterdiği gözlenmektedir. SEC yöntemi ile de makrogözenek formundaki yapının ortalama gözenek boyutu ve gözenek oranı belirlenmiştir. % 50'den büyük çapraz bağlayıcı (EDMA) derişimlerinde gözeneklilik oranı değerlerinin de yüksek olduğu görülmektedir.
- Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller, seçilen hidrofilik formdaki kromatografik ligandlar ile türevlendirilerek, mikrosıvı kromatografisi sisteminde kullanıma uygun yeni HILIC sabit fazları elde edilmiştir. Bu yolla,

üzerinde kovalent bağlı formda trietanolamin, triazol halkası ve zwitteriyonik polimetakrilat zincirleri içeren eşboyutlu-gözenekli formda polimetakrilat partiküller elde edilmiştir.

- Yüzeylerinde reaktif fonksiyonel grup içeren hidrofilik özelliğe sahip partiküller, , 2 mm çapına sahip paslanmaz çelik kolonlara HPLC pompa kullanılarak doldurulmuştur.
- Kromatografik testler HILIC modunda yapılmıştır. İzokratik koşullarda, model analit karışımlarının kromatografik ayrımı incelenmiştir. HILIC çalışmalarında hareketli faz olarak, çoğunlukla % 0.05 oranında AAc içeren asetonitril-su karışımı kullanılmıştır. Geliştirilen sabit fazlar ile HILIC modunda polar analit gruplarının ayırımına yönelik olarak yapılan kromatografik çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
- TEA-OH bağlı polimetakrilat partikül bazlı sabit faz, nükleotid, nükleosid ve organik asit karışımlarının HILIC modunda kromatografik ayrımında başarıyla kullanılmıştır. En yüksek kolon verimi (en düşük kademe yüksekliği) nükleotid bazlı analit (urasil) ile 20 µm olarak elde edilmiştir.
- Triazol halkası içeren polimetakrilat partikül bazlı sabit faz nükleosid ve katekolamin karışımlarının HILIC modunda kromatografik ayrımında başarıyla kullanılmıştır. En yüksek kolon verimi (en düşük kademe yüksekliği) nükleosid bazlı analit (timidin) ile 200 µm olarak elde edilmiştir.
- Zwitteriyonik polimetakrilat moleküler zincirleri içeren polimetakrilat partikül bazlı sabit faz, nükleotid, nükleosid ve polar organik karışımların HILIC modunda kromatografik ayrımında başarıyla kullanılmıştır. En yüksek kolon verimi (en düşük kademe yüksekliği) CIPrTMS-b-ATRP yöntemi ile türevlendirilmiş poli(HPMA-Cl-co-EDMA) partiküller ile dolgulanmış kolonda nükleosid bazlı analit (timidin) ile 100 µm olarak elde edilmiştir.
- Geliştirilen mikrokonlar için seçilecek analit piklerinin alıkonma süreleri için “analizden analize standart sapma” ve “günden güne standart sapma”

çalışılarak kolonların kararlılık davranışı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sentezlenen polimerik partikül bazlı kolonlar ile HILIC modunda tekrarlanabilir kromatografik analiz yapılabileceğini göstermiştir.

- Sonuçlar seçilen polimetakrilat bazlı reaktif yapının partikül bazlı HILIC kolonlarının sentezi için uygun olduğunu göstermiştir. Poli(HPMA-Cl-co-EDMA) kopolimerinin destek materyali olarak kullanıldığı partikül bazlı sabit fazların tamamında kromatografik ayırma sağlanabilmiştir. Ayrıca Bölüm 2.6.5'teki Çizelge 2.6'da silika ve polimer bazlı HILIC kolonlar için farklı analitler ile saptanmış kademe yüksekliği değerlerine bakıldığında, tez kapsamında geliştirilen tüm HILIC kolonlarının benzerleri ile kıyaslanabilir ayırma performanslarına sahip olduğu görülmektedir.
- Bu çalışma ile literatürde poliakrilat formunda, hidrofilik özelliğe sahip, reaktif kloropropil grubu içeren yeni bir partikül türü geliştirilmiştir. Çıkış materyali literatürdeki yaygın olarak kullanılan silika ve polimer bazlı HILIC kolonlarına alternatif yeni bir sabit faz ailesinin sentezinde başarıyla kullanılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Ayano E., Suzuki Y., Kanezawa M., Analysis of melatonin using a pH- and temperature-responsive aqueous chromatography system, *Journal of Chromatography A*, 1156, 213-219, **2007**.
- [2] Kreuss M., Krause I., Kulozik U., Separation of a glycosylated and non-glycosylated fraction of caseinomacropeptide using different anion-exchange stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1208, 126-132, **2008**.
- [3] Wen J., Legendre L.A., Bienvenue J.M., Purification of nucleic acids in microfluidic devices, *Analytical Chemistry*, 80, 6472-6479, **2008**.
- [4] Lin C.X., Zhan H.Y., Liu M.H., Novel Preparation and Characterization of Cellulose Microparticles Functionalized in Ionic Liquids, *Langmuir*, 25, 10116-10120, **2009**.
- [5] Xu Y., Mehl J.T., Bakhtiar R., Immunoaffinity Purification Using Anti-PEG Antibody Followed by Two-Dimensional Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Quantification of a PEGylated Therapeutic Peptide in Human Plasma, *Analytical Chemistry*, 82, 6877-6886, **2010**.
- [6] Skerikova V., Jandera P., Effects of the operation parameters on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7981-7989, **2010**.
- [7] Luis T. J., Grotti M., Fast determination of arsenosugars in algal extracts by narrow bore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7428-7433, **2010**.
- [8] Rainville P.D., Smith N.W., Wilson I.D., Addressing the challenge of limited sample volumes in in vitro studies with capillary-scale microfluidic LC-MS/MS, *Bioanalysis*, 2, 873-882, **2011**.
- [9] Hojo K., Hakamata H., Kusu F., Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B*, 879, 751-755, **2011**.
- [10] Morton J., Leese E., Arsenic speciation in clinical samples: urine analysis using fast micro-liquid chromatography ICP-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 339, 1781-1788, **2011**.
- [11] Schubert B., Oberacher H., Impact of solvent conditions on separation and detection of basic drugs by micro liquid chromatography-mass spectrometry under overloading conditions, *Journal of Chromatography A*, 1218, 3413-

3422, **2011**.

- [12] Nemati H., Bahrami G., Rahimi Z., Rapid separation of human globin chains in normal and thalassemia patients by RP-HPLC, *Molecular Biology Reports*, 38, 3213-3218, **2011**.
- [13] Mohr J., Swart R., Samonig M., High-efficiency nano- and micro-HPLC - High-resolution Orbitrap-MS platform for top-down proteomics, *Proteomics*, 10, 3598-3609, **2010**.
- [14] Armenta S., Lendl B., Capillary liquid chromatography with off-line mid-IR and Raman micro-spectroscopic detection: analysis of chlorinated pesticides at ppb levels, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 297-308, **2010**.
- [15] Zhang X. M., Liu B.H., Zhang L.H., Recent advances in proteolysis and peptide/protein separation by chromatographic strategies, *Science China Chemistry*, 53, 685-694, **2010**.
- [16] Nusai Y., Koizumi H., Tachibana M., Retention Behavior of Aromatic Amines with Some Ionic Liquids Mobile Phase in Semi-micro HPLC, *Journal of the Science Faculty of Chiang Mai University*, 37, 384-396, **2010**.
- [17] Hamase K., Miyoshi Y., Ueno K., Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept, *Journal of Chromatography A*, 1217, 1056-1062, **2010**.
- [18] Zhang S., Jia L., Wang S., Determination of beta-Carotene in Corn by In-Tube SPME Coupled to Micro-LC, *Chromatographia*, 72, 1231-1233, **2010**.
- [19] Slater M., Snauko M., Svec F., "Click chemistry" in the preparation of porous polymer-based particulate stationary phases for mu-HPLC separation of peptides and proteins, *Analytical Chemistry*, 78, 4969-4975, **2006**.
- [20] Gaspar A., Piyasena M.E., Gomez F.A., Fabrication of fritless chromatographic microchips packed with conventional reversed-phase silica particles, *Analytical Chemistry*, 79, 7906-7909, **2007**.
- [21] Perrier R.C., Heroguez V., Thienpont A., Functional crosslinked polymer particles synthesized by precipitation polymerization for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1179, 2-8, **2008**.
- [22] Mizutani A., Nagese K., Kikuchi A., Preparation of thermo-responsive polymer brushes on hydrophilic polymeric beads by surface-initiated atom transfer radical polymerization for a highly resolutive separation of peptides, *Journal of Chromatography A*, 1217, 5978-5985, **2010**.

- [23] Lu Q., Collins G.E., Lab on a chip packing of submicron particles for high performance EOF pumping, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7153-7157, **2010**.
- [24] Baggiani C., Baravelle P., Giovannoli C., Binding behaviour of molecularly imprinted polymers prepared by a hierarchical approach in mesoporous silica beads of varying porosity, *Journal of Chromatography A*, 1218, 1828-1834, **2011**.
- [25] Du K.F., Yan M., Wang Q.Y., Preparation and characterization of novel macroporous cellulose beads regenerated from ionic liquid for fast chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 1298-1304, **2010**.
- [26] Mizutani A., Nagese K., Kikuchi A., Thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads for all-aqueous chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 522-529, **2010**.
- [27] Zhang Y.P., Chen N., Zhang Y.J., Microwave Irradiation Used to Immobilize the Stationary Phase in Sol-Gel and Organic Polymer Matrix for Micro-HPLC and Capillary Electrochromatography, *Asian Journal of Chemistry*, 23, 733-739, **2009**.
- [28] Zhang R., Yang G., Xin P., Preparation of poly(N-isopropylacrylamide)-grafted polymer monolith for hydrophobic interaction chromatography of proteins, *Journal of Chromatography A*, 1216, 2404-2411, **2009**.
- [29] Nischang I., Teasdale I., Bruggemann O., Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7514-7522, **2010**.
- [30] Wu M., Wu R., Zhang Z., Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns, *Electrophoresis*, 32, 105-115, **2011**.
- [31] Kositarat S., Smith N.W., Nacapricha D., Repeatability in column preparation of a reversed-phase C18 monolith and its application to separation of tocopherol homologues, *Talanta*, 84, 1374-1378, **2011**.
- [32] Walsh Z., Levkin P.A., Abele S., Polymerisation and surface modification of methacrylate monoliths in polyimide channels and polyimide coated capillaries using 660 nm light emitting diodes, *Journal of Chromatography A*, 1218, 2954-2962, **2011**.
- [33] Barrow D.A., Castell O.K., Sykes N., A microfabricated graphitic carbon column for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 1983-1987, **2011**.
- [34] Tao D., Zhang L., Shan Y., Recent advances in micro-scale and nano-scale high-performance liquid-phase chromatography for proteome research, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 229-241, **2011**.

- [35] Svec, F., The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Monolithic Materials, Promises, Challenges, Achievements, *Analytical Chemistry*, 78, 2101-2107, **2006**.
- [36] Unsal E., Camli S.T., Tuncel M., Tuncel A., Monodisperse-porous particles with different polarities by "modified seeded polymerization" and their use as chromatographic packing in HPLC, *Reactive and Functional Polymers*, 61, 353-368, **2004**.
- [37] Unsal E., Camli S.T., Irmak T., Tuncel A., Monodisperse poly (Styrene-co-Divinylbenzene) particles (3.2 μm) with relatively small pore size as HPLC packing material, *Chromatographia*, 60, 553-560, **2004**.
- [38] Unsal E., Elmas B., Camli S.T., Tuncel A., Uniform particles for the reversed-phase separation of proteins with high-resolution and high-column efficiency, *Separation Science and Technology*, 40, 1425-1438, **2005**.
- [39] Unsal E., Elmas B., Caglayan B., Tuncel M., Patir S., Tuncel A., Preparation of an ion-exchange chromatographic support by a "grafting from" strategy based on atom transfer radical polymerization, *Analytical Chemistry*, 78, 5868-5875, **2006**.
- [40] Olsen B.A., Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities, *Journal of Chromatography A*, 913, 113-122, **2001**.
- [41] McCalley D.V., Evaluation of the Properties of a Superficially Porous Silica Stationary Phase in Hydrophilic Interaction Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1193, 85-91, **2008**.
- [42] Tuncel A., Kahraman R., Pişkin E., Monosize Polystyrene Microbeads by Dispersion Polymerization, *Journal of Applied Polymer Science*, 50, 303-319, **1993**.
- [43] Hosoya K., Teremachi M., Tanaka N., Kobayashi A., Kanda T., Ohtsu Y., Preparation Strategy for Uniformly Sized Polymer-Based HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency. 1. Copolymerization Technique, *Journal of Analytical Chemistry*, 73, 5852-5855, **2001**.
- [44] Galia M., Svec F., Frechet J.M.J., Monodisperse Polymer Beads As Packing Material For High Performance Chromatography: Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in the Presence of Linear Polystyrene as a Porogen, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 32, 2169-2175, **1994**.
- [45] Yang G., Sheetal G., "Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Chromatography A*,

1218, 5920-5938, **2011**.

- [46] Reuters T., www.isiknowledge.com (*Aralık, 2014*)
- [47] Bui N.T.H., Verhage J.M.J., Irgum K., "Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Separation Science*, 33, 2965-2976, **2010**.
- [48] Hemstrom P., Szumski M., Irgum K., Atom-transfer radical graft polymerization initiated directly from silica applied to functionalization of stationary phases for high-performance liquid chromatography in the hydrophilic interaction chromatography mode, *Analytical Chemistry*, 78, 7098-7103, **2006**.
- [49] Huang H., Guo H., Xue M., Liu Y., Yang J., Liang X., Chu C., Click novel glycosyl amino acid hydrophilic interaction chromatography stationary phase and its application in enrichment of glycopeptides, *Talanta*, 85, 1642-1647, **2011**.
- [50] Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K., Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode, *Journal of Chromatography A*, 1127, 82-91, **2006**.
- [51] Persson J., Hemstrom P., Irgum K., "Preparation of a sorbitol methacrylate grafted silica as stationary phase for hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Separation Science*, 31, 1504-1510, **2008**.
- [52] Wikberg E., Verhage J.J., Viklund C., Irgum K., "Grafting of silica with sulfobetaine polymers via aqueous reversible addition fragmentation chain transfer polymerization and its use as a stationary phase in HILIC", *Journal of Separation Science*, 32, 2008-2016, **2009**.
- [53] Horak D., Svec F., Tennikova T.B., Nahunek M., "Chromatographic properties of macroporous beads from poly(GMA-co-EDMA)", *Angewandte Makromolekulare Chemie.*, 195, 139-150, **1992**.
- [54] Smigol V., Svec F., "Synthesis and properties of uniform beads based on macroporous copolymer glycidyl methacrylate ethylene dimethacrylate- A way to improve separation media for HPLC", *Journal of Applied Polymer Science*, 46, 1439-1448, **1993**.
- [55] Smigol V., Svec F., Frechet J.M.J., "Use of polymeric catalysts in the pore-size-specific functionalization of porous polymers", *Macromolecules*, 26, 5615-5620, **1993**.
- [56] Smigol V., Svec F., Frechet J.M.J., "High-performance liquid-chromatography of complex-mixtures using monodisperse dual-chemistry polymer beads prepared by a pore-size-specific functionalization process- A single-column combination of hydrophobic interaction and reversed-phase

- chromatography”, *Analytical Chemistry*, 66, 2129-2138, **1994**.
- [57] Gong B.L., Li L., Zhu J.X., “Synthesis of monodisperse poly(chloromethylstyrene-co-divinylbenzene) beads and their application in separation of biopolymers”, *Journal of Separation Science*, 28, 2546-2550, **2005**.
- [58] Kedem M., Margel S., “Synthesis and characterization of micrometer-sized particles of narrow size distribution with chloromethyl functionality on the basis of single-step swelling of uniform polystyrene template microspheres“, *Journal of Polymer Science Polymer Chemistry*, 40, 1342-1352, **2002**.
- [59] Petro M., Svec F., Frechet J.M.J., Monodisperse hydrolyzed poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads as a stationary phase for normal phase HPLC, *Analytical Chemistry*, 69, 3131-3139, **1997**.
- [60] Dai X., He Y., Wei Y., Gong B., “Preparation of hydrophilic polymer-grafted polystyrene beads for hydrophilic interaction chromatography via surface-initiated atom transfer radical polymerization”, *Journal of Separation Science*, 34, 3115-3122, **2011**.
- [61] Hao J., Wang F., Dai X., Gong B., Wei Y., “Preparation of poly (vinyltetrazole) chain-grafted poly (glycidymethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads by surface-initiated atom transfer radical polymerization for the use in weak cation exchange and hydrophilic interaction chromatography”, *Talanta*, 85, 482-487, **2011**.
- [62] Engelhardt H., One century of liquid chromatography from Tswett’s columns to modern high speed and high performance separations, *Journal of Chromatography B*, 800, 3-6, **2004**.
- [63] Ettre L.S., Chromatography: The separation technique of the 20th century, *Chromatographia*, 51, 7-17, **2000**.
- [64] Fairchild J.N., *Multidimensional Liquid Chromatography Separations*, Dكتورا Tezi, University of Tennessee, Knoxville, **2010**.
- [65] Zotou A., An overview of recent advances in HPLC instrumentation, *Central European Journal of Chemistry*, 10, 554-569, **2012**.
- [66] Corradini D., *Handbook of HPLC*, 2. Baskı, CRC Press, 2011.
- [67] Snyder L.R., Dolan J.W., *Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation*, Chapter 1: Milestones in the Development of Liquid Chromatography, (eds: Fanali, S., Haddad, P.R., Poole C., Schoenmakers, P., Lloyd, D.), **MA, USA, 1-17, 2013**.
- [68] Lesney, M.S., A Brief History of Color Writing, *Today’s Chemist at Work*, 7, 67-68, **1998**.
- [69] Shackman J.G., General Instrumentation, *Liquid Chromatography*

Fundamentals and Instrumentation, Chapter 13: General Instrumentation, (eds: Fanali, S., Haddad, P.R., Poole C., Schoenmakers, P., Lloyd, D.), MA, USA, 283-306, 2013.

- [70] Gençer N., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, w3.balikesir.edu.tr/~ngencer/HPLC.ppt (Aralık, 2014)
- [71] Zimina T.M., Smith R.M., Myers P., King B.W., Effects of kinematic viscosity of the slurry on the packing efficiency of PEEK microbore columns for liquid chromatography, *Chromatographia*, 40, 662-668, **1995**.
- [72] Bottegal M. N., *The Development of High Performance Liquid Chromatography Systems for the Analysis of Improvised Explosives*, Doktora Tezi, Florida Uluslararası Üniversitesi, A.B.D., **2010**.
- [73] Nhat B.T.H., *Polyhydroxyl and Polyphosphorylcholine Functionalized Silica for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, Doktora Tezi, Umea Üniversitesi, Kimya Bölümü, Almanya, **2012**.
- [74] Cubbon S., Antonio C., Wilson J., Thomas-Oates J., Metabolomic applications of HILIC–LC–MS, *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 671-684, **2010**.
- [75] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W., *Introduction to modern liquid chromatography*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, **2010**.
- [76] Yurtsever, A., Saraçoğlu, B., Tuncel, A., CEC with new monolithic stationary phase based on a fluorinated monomer, trifluoroethyl methacrylate, *Electrophoresis*, 30, 1-10, **2009**.
- [77] Grafnetter, J., Coufal, P., Tesarova, E., Suchankova, J., Bosakova, Z., Sevcik, J., Optimization of binary porogen solvent composition for preparation of butyl methacrylate monoliths in capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1049, 43-49, **2004**.
- [78] Hosoya K., Teramachi M., Tanaka N., Kobayashi A., Kanda T., Ohtsu Y., Preparation Strategy for Uniformly Sized, Polymer-Based HPLC Packing Materials Having Practically Acceptable Column Efficiency. 1. Copolymerization Technique, *Analytical Chemistry*, 73, 5852-5857, **2001**.
- [79] Stanley B.J., Foster C.R., Guiochon G., On the Reproducibility of Column Performance in Liquid Chromatography and the Role of the Packing Density, *Journal of Chromatography A*, 761, 41-51, **1997**.
- [80] Lime F., *Synthesis and Modification of Monodispers Polymer Particles for Chromatography*, Doktora Tezi, Umea Üniversitesi, Kimya Bölümü, Almanya, **2008**.
- [81] Cramers C.A., Rijks J.A., Schutjes C.P.M., Factors determining flow rate in chromatographic columns, *Chromatographia*, 14, 439-444, **1981**.

- [82] van der Wal S., Low viscosity organic modifiers in reversed-phase HPLC, *Chromatographia*, 20, 274-278, **1985**.
- [83] Kelea M., Guiochona G., Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatographic columns: II. Results obtained with Symmetry C18 columns, *Journal of Chromatography A*, 830, 55-79, **1999**.
- [84] Saito Y., Jinno K., Greibrokk T., Capillary columns in liquid chromatography: Between conventional and microchips, *Journal of Separation Science*, 27, 1379-1390, **2004**.
- [85] Boring C.B., *Capillary-Based Microanalytical Systems*, Doktora Tezi, Texas Tech Universitesi, Texas, A.B.D., **1998**.
- [86] Horvath C., Lipsky S.R., Rapid analysis of ribonucleosides and bases at picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns, *Analytical Chemistry*, 41, 1227-1234, **1969**.
- [87] Horvath C., Melander W., Molnar I., Molnar P., Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid-chromatography with nonpolar stationary phases, *Analytical Chemistry*, 49, 2295-2305, **1977**.
- [88] Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R., Fast liquid chromatography-An investigation of operating parameters and separation of nucleotides on pellicular ion exchangers, *Analytical Chemistry*, 39, 1422-1428, **1967**.
- [89] Vissers J.P.C., Claessens H.A., Cramers C.A., Microcolumn liquid chromatography: Instrumentation, detection and applications, *Journal of Chromatography A*, 779, 1-28, **1997**.
- [90] Poole C.F., Poole S.K., *Chromatography Today*, Elsevier, New York, 63, 1995.
- [91] Barry E.F., Grob R.L., *Columns for Gas Chromatography: Performance and Selection*, Hoboken: Wiley Interscience, **2007**.
- [92] McNair H.M., Miller J.M., *Basic Gas Chromatography*, New York: Wiley-Interscience, **2007**.
- [93] Syed A.A., *Semi-Packed Micro Gas Chromatography Columns*, Yüksek Lisans Tezi, Virginia Politeknik Enstitüsü ve Devlet Üniversitesi, Blacksburg, A.B.D, 2008.
- [94] Popovici S.T., *Towards small and fast size-exclusion chromatography*, Doktora Tezi, Amsterdam Universitesi, Hollanda, **2004**.
- [95] Tsuda, T., Novotny M., Packed microcapillary columns in high-performance liquid-chromatography, *Analytical Chemistry*, 50, 271-275, **1978**.
- [96] Tsuda T., Tanaka I., Nakagawa G., Packed microcapillary liquid-

- chromatography with reduced I_d columns, *Journal of Chromatography A*, 239, 507-513, **1982**.
- [97] Kennedy R.T., Jorgenson J.W., Preparation and evaluation of packed capillary liquid chromatography columns with inner diameters from 20- μ m to 50- μ m, *Analytical Chemistry*, 61, 1128-1135, **1989**.
- [98] McGuffin, V.L., Novotny M., Optimization and evaluation of packed capillary columns for high-performance liquid-chromatography, *Journal of Chromatography A*, 255, 381-393, **1983**.
- [99] Eeltink S., Decrop W.M.C., Rozing G.P., Schoenmakers P.J., Kok W.T., Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns, *Journal of Separation Science*, 27, 1431-1440, **2004**.
- [100] Hsieh S.C., Jorgenson J.W., Preparation and evaluation of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with inner diameters from 12 to 33 μ m, *Analytical Chemistry*, 68, 1212-1217, **1996**.
- [101] Scott R.P.W., Kucera P., Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 169, 51-72, **1979**.
- [102] Schwartz H., Karger B., Kucera, P., Gradient elution chromatography with microbore columns, *Analytical Chemistry*, 55, 1752-1760, **1983**.
- [103] Kucera P., Design and use of short microbore columns in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 198, 93-109, **1980**.
- [104] Kucera P., "Microcolumn High-Performance liquid Chromatography", *Journal of Chromatography Library*, 28, Elsevier Scientific Publishing Co., New York, 1-300, **1984**.
- [105] Usher K.M., *Formation of a Particle-Fixed Monolith for Capillary Electrochromatography and an Investigation of Intracolumn Broadening in Liquid Chromatography*, Doktora Tezi, Florida State University, A.B.D., **2005**.
- [106] Unger K.K., Lamotte S., Machtejevas E., General Instrumentation, Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation, Chapter 3: Column Technology in Liquid Chromatography (eds: Fanali, S., Haddad, P.R., Poole C., Schoenmakers, P., Lloyd, D.), MA, USA, Column Technology in Liquid Chromatography, 41-86, **2013**.
- [107] Rouquerol F.F.J., Rouquerol J., Sing K.S.W., Adsorption by powders and porous solids, New York, Academic Press, 1-467, **1999**.
- [108] MacNair J.E., Lewis K.C., Jorgenson J.W., Ultra High Pressure Reversed Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns, *Analytical Chemistry*, 69, 983-989, **1997**.
- [109] Lloyd L.L., Rigid macroporous copolymers as stationary phases in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 544,

201-217, **1991**.

- [110] Lee D.P., Chromatographic evaluation of large-pore and non-porous polymeric reversed phases , *Journal of Chromatography A*, 443, 143-153, **1988**.
- [111] Zhu Y., Yongxin C., Mingli Y., Fritz J.S., Preparation and applications of weak acid cation exchanger based on monodisperse poly(ethylvinylbenzene-co-divinylbenzene) beads, *Journal of Chromatography A*, 1085, 18-22, **2005**.
- [112] Penner N.A., Nesterenko P.N., Ilyin M.M., Tsyurupa M.P., Davankov V.A., Investigation of the properties of hypercrosslinked polystyrene as a stationary phase for high-performance liquid chromatography, *Chromatographia*, 50, 611-620, **1999**.
- [113] Cao M.L., Tong B., Shen J.B., Dong Y.P., Zhi J.G., Preparation of highly crosslinked monodisperse poly(styrene-co-divinylbenzene) microspheres by two-stage dispersion polymerization, *Journal of Applied and Polymer Science*, 109, 1189-1196, **2008**.
- [114] Poole C.F., *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1-901, **2003**.
- [115] Wang O.C., Hosoya K., Svec F., Frechet J.M.J., Polymeric porogens used in the preparation of novel monodispersed macroporous polymeric separation media for high-performance liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 64, 1232-1238, **1992**.
- [116] Ugelstad J., Berge A., Ellingsen T., Schmid R., Nilsen T.N., Mork P.C., Stenstad P., Hornes E., Olsvik Q., Preparation and Application of New Monosized Polymer Particles, *Progress in Polymer Science*, 17,87-161, **1992**.
- [117] Ugelstad J., Mork P.C., Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation, *Advances in Colloid and Interface Science*, 13, 101-140,**1980**.
- [118] Svec F., Frechet J.M.J., New Designs of Macroporous Polymers and Supports: From Separation To Biocatalysis, *Science*, 273, 205-211, **1996**.
- [119] Smigol V., Svec F., Synthesis and properties of uniform beads based on macroporous copolymer glycidyl methacrylate–ethylene dimethacrylate: A way to improve separation media for HPLC, *Journal of Applied Polymer Science*, 46, 1439-1448, **1992**.
- [120] Benes M.J., Horak D., Svec F., Methacrylate-based chromatographic media, *Journal of Separation Science*, 28, 1855-1875, **2005**.
- [121] Özlü, V., Emülsiyon Polimerizasyon Yöntemini Kullanarak Sıcaklığa Duyarlı DEG Bazlı Polimerik Partiküllerinin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu, (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**.

- [122] Almog Y., Reich S., Levy M., *Polymer International*, Monodisperse polymeric spheres in the micron size range by a single step process, 14, 131-136, **1982**.
- [123] Ober C.K., Hair M.L., Monodispersed, Micron-Sized Polystyrene Particles By Dispersion Polymerization, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 23, 103-108, **1985**.
- [124] Paine A. J., Luymes W., Mc Nulty J., Dispersion Polymerization of Styrene In Polar Solvents: Influence of Reaction Parameters On Particle Size and Molecular Weight in Poly(N-Vinylpyrrolidone) Stabilized Reactions, *Macromolecules*, 23, 3104-3108, **1990**.
- [125] Cawse J. L., Lovell P. A., El-Aasser M. S., Dispersion Polymerization, Emulsion Polymerization & Emulsion Polymers, Chichester, Wiley, 743-761, **1997**.
- [126] Ober C.K., Hair M.L., The Effect Of Temperature And Initiator Levels On The Dispersion Polymerization Of Polystyrene, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 25, 1395-1398, **1987**.
- [127] Tuncel, A., Kahraman, R., Pişkin, E., Monosize Polystyrene Microbeads by Dispersion Polymerization, *Journal of Applied Polymer Science*, 50, 303-319, **1993**.
- [128] Tseng C. M., Lu Y.Y., El Aasser M.S., Vanderhoff J.W., Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerization in Alcohol, *Polymeric Materials Science and Engineering*, 54, 362-366, **1986**.
- [129] Çamlı T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., Functional, Uniform and Macroporous Latex Particles: Preparation, Electron Microscopic Characterization and Nonspecific Protein Adsorption Properties, *Journal of Applied Polymer Science*, 84, 414, **2002**.
- [130] Tuzar Z., Polymer Colloids, Iranian Journal of Polymer Science and Technology, 4, 34-40, **1995**.
- [131] Ellingsten, T., Aune, O., Ugelstad, J., Hagen, S., Monosized Stationary Phases For Chromatography, *Journal of Chromatography*, 535, 147-161, **1990**.
- [132] Wang, Q. C., Svec, F., Frechet, J.M.J., Fine Control of the Porous Structure and Chromatographic Properties of Monodispers Macroporous Poly(styreneco-divinylbenzene) Beads Prepared Using Polymer Porogens, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 32, 2577-2588, **1994**.
- [133] Galia, M., Svec, F., Frechet, J.M.J., Monodispers Polymer Beads As Packing Material For High Performance Liquid Chromatography: Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in the Presence of Linear Polystyrene as a Porogen, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 32, 2169-2175, **1994**.

- [134] Cheng C. M., Micale J., Vanderhoff W., El-Aasser M.S., Monodisperse Porous Particles: Formation of the Porous Structure, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed.*, 30, 235-244, **1992**.
- [135] Cheng C. M., Vanderhoff W., El-Aasser M.S., Synthesis and Characterization of Monodisperse Porous Polymer Particles, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chem. Ed.*, 30, 245-256, **1992**.
- [136] Okuba, M., Nakagawa, T., Preparation of Micron Size Monodispers Polymer Particles Having Highly Crosslinked Structures and Vinyl Groups By Seeded Polymerization of Divinylbenzene Using the Dynamic Swelling Method, *Colloids and Polymer Science*, 270, 853-858, **1992**.
- [137] Hemström P., Irgum K., Hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science*, 29, 1784-1821, **2006**.
- [138] Hsieh Y., Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites, *Journal of Separation Science*, 31, 1481-1491, **2008**.
- [139] Jian W., Edom R.W., Xu Y., Weng N., Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis, *Journal of Separation Science*, 33, 681-697, **2010**.
- [140] Dejaegher B., Heyden Y.V., HILIC methods in pharmaceutical analysis, *Journal of Separation Science*, 33, 698-715, **2010**.
- [141] McCalley D.V., Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns available alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?, *Journal of Chromatography A*, 1171, 46-55, **2007**.
- [142] Jandera P., Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A Review, *Analytica Chimica Acta*, 692, 1-25, **2011**.
- [143] Guo Y., Gaiki S., Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5920-5938, **2011**.
- [144] Buszewski B., Noga S., Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)-A Powerful Separation Technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 231-247, **2012**.
- [145] Heaton J., Gray N., Cowan D.A., Plumb R.S., Legido-Quigley C., Smith N.W., Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine, *Journal of Chromatography A*, 1228, 329-337, **2012**.
- [146] McCalley D.V., Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 3408-3417, **2010**.
- [147] Lammerhofer M., HILIC and mixed-mode chromatography the rising stars in separation science, *Journal of*

- Separation Science*, 33, 679-680, **2010**.
- [148] Guo Y., Gaiki S., Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1074, 71-80, **2005**.
- [149] Treadway J.W., Philibert G.S., Olesik S.V., Enhanced fluidity liquid chromatography for hydrophilic separation of nucleosides, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5897-5902, **2011**.
- [150] Linden J.C., Lawhead C.L., Liquid chromatography of saccharides, *Journal of Chromatography*, 105, 125-133, **1975**.
- [151] Churms S.C., Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction, *Journal of Chromatography A*, 720, 75-91, **1996**.
- [152] Tetaz T., Detzner S., Friedlein A., Molitor B., Mary J.L, Hydrophilic interaction chromatography of intact, soluble proteins, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5892-5896, **2011**.
- [153] Dejaegher B., Heyden Y.V., HILIC methods in pharmaceutical analysis, *Journal of Separation Science*, 33, 698-715, **2010**.
- [154] Onorato J.M., Langish T., Bellamine A., Shipkova P., Applications of HILIC for targeted and non-targeted LC/MS analyses in drug discovery, *Journal of Separation Science*, 33, 923-929, **2010**.
- [155] van Nuijs A.L.N., Tarcomnicu I., Covaci A., Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5964-5974, **2011**.
- [156] Spagou K., Tsoukali H., Raikos N., Gika H., Wilson I.D., Theodoridis G., Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomics studies, *Journal of Separation Science*, 33, 716-727, **2010**.
- [157] Ruhaa L.R., Huhn C., Waterreus W.J., de Boer A.R., Neusüss C., Hokke C.H., Hydrophilic interaction chromatography based high-throughput sample preparation method for n-glycan analysis from total human plasma glycoproteins, *Analytical Chemistry*, 80, 6119-6126, **2008**.
- [158] Alpert, A. J., Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A*, 499, 177-196, **1990**.
- [159] Palmer, J.K., Versatile system for sugar analysis via liquid chromatography, *Analytical Letters*, 8, 215-224, **1975**.
- [160] Samuelson O., Sjöström E., *Sven Kem Tidskr*, 64, 305-314, 1952
- [161] Gregor H.P., Collins F.C., Pope M., Studies on ion-exchange resins. III. Diffusion of neutral molecules in a sulfonic acid cation-exchange resin,

Journal of Colloid Science, 6, 304-322, **1951**.

- [162] Hao Z., Xiao B., Weng N., Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Journal of Separation Science*, 31, 1449-1464, **2008**.
- [163] dos Santos Pereira A., David F., Vanhoenacker G., Sandra P., The acetonitrile shortage: is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes, *Journal of Separation Science*, 32, 2001-2007, **2009**.
- [164] Li R.P., Huang J.H., Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1041, 163-169, **2004**.
- [165] Hemström P., Nygren Y., Björn E., Irgum K., Alternative organic solvents for HILIC separation of cisplatin species with on-line ICP-MS detection, *Journal of Separation Science*, 31, 599-603, **2008**.
- [166] Inoue K., Obara R., Hino T., Oka H., Development and Application of an HILIC-MS/MS for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9918-9924, **2010**.
- [167] Di Palma S., Boersema P.J., Heck, A.J.R., Mohammed S., Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis, *Analytical Chemistry*, 83, 3440-3447, **2011**.
- [168] van Nuijs A.L.N., Tarcomnicu I., Covaci A., Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5964-5974, **2011**.
- [169] Gama M.R., da Costa Silva R.G., Collins C.H., Bottoli C.B.G., Hydrophilic Interaction Chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 48-60, **2012**.
- [170] Mallik A.K., Cheah W.K., Shingo K., Ejzaki A., Takafuji M., Ihara H., Highly hydrophilic and nonionic poly(2-vinylazoline)-grafted silica: a novel organic phase for high-selectivity hydrophilic interaction chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 206, 4585-4593, **2014**.
- [171] Ikegami T., Tomomatsu K., Takuba H., Horie K., Tanaka N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184, 474-503, **2008**.
- [172] Jandera P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *Journal of Separation Science*, 31, 1421-1437, **2008**.
- [173] Boguslaw B., Sylwia N., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry., 402, 231–247, **2012**.

- [174] Guo H., Liu R., Yang J., Yang B., Liang X., Chu C., A novel click lysine zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1223, 47-52, **2012**.
- [175] Shen A., Guo Z., Cai X., Xue X., Liang X., Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1228, 175-182, **2012**.
- [176] Qiao L., Dou A., Shi X., Li H., Shan Y., Lu X., Xu G., Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1286, 137-145, **2013**.
- [177] Ohyama K., Inoue Y., Kishikawa N., Kuroda N., Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1286, 137-145, **2013**.
- [178] Çelebi B., Gökaltun A., Arman E., Evirgen O., Tuncel A., Polyethylenimine attached - poly (3-chloro-2-hydroxypropylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monosized-porous microspheres as a new separation medium for polar compounds, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, 629-637, **2014**.
- [179] Çelebi B., Özen B., Kip Ç., Tuncel A., A New Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Chromatography: Polyacrylate-Based Hydrophilic, Monosized-Porous Beads with Zwitterionic Molecular Brushes, *Chromatographia* , 77, 1511-1520, **2014**.
- [180] Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N., Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1164, 198-205, **2007**.
- [181] Lue Z., Zhang P., Jia L., Preparation of chitosan functionalized monolithic silica column for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217, 4958-4964, **2010**.
- [182] Zhang P., Chen J., Jia L., N-Methylimidazolium-functionalized monolithic silica column for mixed-mode chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 3459-3465, **2011**.
- [183] Randon J., Huguet S., Demesmay C., Berthod A., Zirconia based monoliths used in hydrophilic-interaction chromatography for original selectivity of xanthines , *Journal of Chromatography A*, 1217, 1496-1500, **2010**.
- [184] İbrahim M. E. A., Zhou T., Lucy C.A., Agglomerated silica monolithic column for hydrophilic interaction LC, *Journal of Separation Science*, 33, 773-778, **2010**.

- [185] Li Y., Xie X., Lee M.L., Chen J., Preparation and evaluation of hydrophilic C18 monolithic sorbents for enhanced polar compound retention in liquid chromatography and solid phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 1218, 8608-8616, **2011**.
- [186] Jiang Z., Smith N. W., Ferguson P. D., Taylor M., Hydrophilic interaction chromatography using methacrylate-based monolithic capillary column for the separation of polar analytes, *Analytical Chemistry*, 79, 1243-1250, **2007**.
- [187] 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**.
- [188] Jiang Z., Reilly J., Everatt B., Smith W., Novel zwitterionic polyphosphorylcholine monolithic column for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216, 2439-2448, **2009**.
- [189] Urban J., Skerikova V., Jandera P., Kubickova R., Pospisilova M., Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds, *Journal of Separation Science*, 32, 2530-2543, **2009**.
- [190] 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**.
- [191] Jiang Z., Smith N. W., Liu Z., Preparation and application of hydrophilic monolithic columns, *Journal of Chromatography A*, 1218, 2350-2361, **2011**.
- [192] Urban J., Jandera P., Recent advances in the design of organic polymer monoliths for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography separations of small molecules, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 2123-2131, **2013**.
- [193] Yuan G., Peng Y., Liu Z., Hong J., Xiao Y., Guo J., Smith N.W., Crommen J., Jiang Z., A facile and efficient strategy to enhance hydrophilicity of zwitterionic sulfoalkylbetaine type monoliths, *Journal of Chromatography A*, 1301, 88-97, **2013**.
- [194] Skerikova V., Urban J., Highly stable surface modification of hypercrosslinked monolithic capillary columns and their application in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science*, 36, 2806-2812, **2013**.
- [195] Huang H., Lin Z.A., Lin Y., Sun X.B., Xie Y.Y., Zhang L., Chen G.N., Preparation and evaluation of poly(4-vinylphenylboronic acid-co-pentaerythritol triacrylate) monolithic column for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins, *Journal of Chromatography A*, 1251, 82-90, **2012**.

- [196] Chen M.L., Li L.M., Yuan B.F., Ma Q., Feng Y.Q., Preparation and characterization of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1230, 54–60, **2012**.
- [197] Chen M.L. Wei S.S., Yuan B.F., Feng Y.Q., Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine, *Journal of Chromatography A*, 1228, 183–192, **2012**.
- [198] Guo J., Zhang Q., Peng Y., Liu Z., Rao L., He T., Crommen J, Sun P., Jiang Z., A facile and efficient one-step strategy for the preparation of beta-cyclodextrin monoliths, *Journal of Separation Science*, 36, 2441-2449, 2013.
- [199] Vickova H., Jezkova K., Stetkova K., Tomsikova H., Solich P., Novakova L., Study of the retention behavior of small polar molecules on different types of stationary phases used in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 37, 1297-1307, **2014**.
- [200] Cavazzini A., Felinger A., General Instrumentation, Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation, Chapter 5: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (eds: Fanali, S., Haddad, P.R., Poole C., Schoenmakers, P., Lloyd, D.), MA, USA, Column Technology in Liquid Chromatography, 105-116, 2013.
- [201] Oyler A.R., Armstrong B.L., Cha J.Y., Zhou M.X., Yang Q., Robinson R.I., Dunphy R., Burinsky D.J., Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis, *Journal of Chromatography A*, 724, 378-383, **1996**.
- [202] de Person M., Hazotte A., Elfakir C., Lafosse M., Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates, *Journal of Chromatography A*, 1081, 174-181, **2005**.
- [203] SeQuant, http://www.sequant.de/products/products_sequant.shtml.
- [204] HPLC Chromatogram index Cosmosil HILIC, Nacalai Tesque, Kyoto, 2007, http://www.nacalai.co.jp/cosmosil/img-HILIC/HILIC%20Index_JP20070321-Link.pdf.
- [205] Goutier W., Spaans P.A., van der Neut A.C., McCreary A.C., Reinders J.H., Development and application of an LC–MS/MS method for measuring the effect of (partial) agonists on cAMP accumulation in vitro, *Journal of Neuroscience Methods*, 188, 24-31, **2010**.
- [206] Johnsen E., Wilson S.R., Odsbu I., Krapp A., Malerod H., Skarstad K., Lundanes E., Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5981-5986, **2011**.

- [207] Garcia-Gomez D., Rodriguez-Gonzalo E., Carabias-Martinez R., Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 111-128, **2013**.
- [208] Studzinska S., Buszewski B., A new way to fast and high resolution determination of modified nucleosides, *Journal of Chromatography B*, 93, 887-888, **2012**.
- [209] Tuytten R., Lemiere F., Van Dongen W., Witters E., Esmans E.L., Newton R.P., Dudley E., Development of an On-Line SPE-LC–ESI-MS Method for Urinary Nucleosides: Hyphenation of Aprotic Boronic Acid Chromatography with Hydrophilic Interaction LC–ESI-MS, *Analytical Chemistry*, 80, 1263-1271, **2008**.
- [210] Rodriguez-Gonzalo E., Garcia-Gomez D., Carabias-Martinez R., Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis, *Journal of Chromatography A*, 1218, 9055-9063, 2011.
- [211] Chen Y., Bicker W., Wu J., Xie M., Lindner W., Simultaneous determination of 16 nucleosides and nucleobases by hydrophilic interaction chromatography and its application to the quality evaluation of Ganoderma, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4243-4252, **2012**.
- [212] Jacobsen J.H., Schmiegelow K., Nersting J., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of 6-thioguanine in DNA using endogenous guanine as internal standard, *Journal of Chromatography B*, 115, 881-882, **2012**.
- [213] Inoue K., Obara R., Hino T., Oka H., Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9918-9924, **2010**.
- [214] Zhu J., Zhou X., Chen G., Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization of Glycidyl Methacrylate With 2-Cyanopropyl 1-Dithionaphthalate As a Chain Transfer Agent, *Journal of polymer science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 2558-2565, **2004**.
- [215] Lansalot M., Davis T., Heuts J., RAFT miniemulsion polymerization: influence of the structure of the RAFT agent, *Macromolecules*, 35, 7582-7591, **2002**.
- [216] Vasilieva Y., Scales C., Thomas D., Ezel R., Lowe A., Ayres N., McCormick C., Controlled/Living polymerization methacrylamide in aqueous media via the RAFT process, *Journal of polymer science Part A: polymer Chemistry*, 43, 3141-3152, **2005**.
- [217] Convertine A., Lokitz B., Lowe A., Scales C., Myric L., McCormick C., Aqueous RAFT polymerization of acrylamide and n,n-dimethylacrylamide at room temperature, *Macromolecular Rapid. Communications*, 26, 791-795,

2005.

- [218] Perruchot C., Khan M.A., Kamitsi A., Armes S.P., Von Werne T., Patten T.E., Synthesis of Well-Defined, Polymer-Grafted Silica Particles by Aqueous ATRP, *Langmuir*, 17 , 4479-4481, **2001**.
- [219] Wang J., Matyjaszewski K., Living/Controlled Radical Polymerization. Transition-Metal-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of a Conventional Radical Initiator, *Macromolecules*, 28, 7572-7573, **1995**.
- [220] Zheng, G., Stöver, H., Grafting of poly(alkylmethacrylates from swellable poly(DVB80-co-HEMA) microspheres by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules*, 35,7612-7619, **2002**.
- [221] Parvole J., Laruelle G., Guimon C., Francois J., Billon L., Initiator-Grafted Silica Particles for Controlled Free Radical Polymerization: Influence of the Initiator Structure on the Grafting Density, *Macromolecular Rapid Communications*, 24, 1074-1078, **2003**.
- [222] Swarc M, Living Polymers, *Nature*, 176, 1168, **1956**.
- [223] Yurteri Seda, *Macromolecular Architectures based on polyphenylation process*, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, **2005**.
- [224] Hawker C.J., Bosman A.W., Harth E., Approaches to Nanostructures for Advanced Microelectronics Using Well-defined Polymeric Materials, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 222, 52- Part 2, **2001**.
- [225] Mayadunne R.T.A., Rizzardo E., Chiefari J., Chong Y.K., Moad G., Thang S.H., Living Radical Polymerization with Reversible Addition-fragmentation Chain Transfer (Raft Polymerization) Using Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents, *Macromolecules*, 32, 6977-6980, **1999**.
- [226] Matyjaszewski K., Xia J., Atom transfer Radical Polymerization, *Chemical Reviews*, 101, 2921-2990, **2001**.
- [227] Veregin R.P.N., Georges M.K., Hamer G.K., Kzamaier P.M., Mechanism of Living Free Radical Polymerizations with Narrow Polydispersity: Electron Spin Resonance and Kinetic Studies, *Macromolecules*, 28, 4391-4398, **1995**.
- [228] Matsuyama M., Kamigaito M., Sawamoto M., Sulfonyl chlorides as initiators for the ruthenium-mediated living radical polymerization of methyl methacrylate, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 34, 3585-3589, **1996**.
- [229] Matyjaszewski K., <http://www.cmu.edu/maty/about-atrp.html> (Aralık,2014)

- [230] Seçkin T., İşlevsel Biyolojik Malzemelerin Hazırlanmasında Atom Transfer Radikal Polimerleşmesinin (ATRP) Kullanımı, *Fen Bilimleri Dergisi, Adıyaman Üniversitesi*, 1, 1-8, 2011.
- [231] Ryan A.J., Crook C.J., Howse J.R., Topham P., Jones R.A.L., Geoghegan M., Parnell A.J., Ruiz-Perez L., Martin S.J., Cadby A., Menelle A., Webster J.R.P., Gleeson A.J., Bras W., Responsive brushes and gels as components of soft nanotechnology, *Faraday Discussion*, 128, 55-74, **2005**.
- [232] Couet J., Jeyaprakash J.D., Samuel S. Kopyshv A., Santer S., Biesalski M., Peptide-polymer hybrid nanotubes, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44, 3297-3301, **2005**.
- [233] Kolb H., Finn M., Sharpless K., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004-2021, **2001**.
- [234] Flack M.A., *Novel Approaches To The Synthesis of Clicked Block Copolymers*, Yüksek Lisans Tezi, Virginia Politeknik Enstitüsü ve Devlet Üniversitesi, A.B.D., **2010**.
- [235] Kukut S.M., *Thermally Curable Polybutadienes by Click Reaction*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, **2008**.
- [236] Binder W.H., Sachsenhofer R., Click Chemistry in Polymer and Materials Science, *Macromolecular Rapid Communication*, 28, 15-54, **2007**.
- [237] Fleischmann S., Komber H., Appelhans D., Voit I.B., Synthesis of Functionalized NMP Initiators for Click Chemistry: A Versatile Method for the Preparation of Functionalized Polymers and Block Copolymers, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208, 1050-1060, **2007**.
- [238] Lewis W., Magallon F.G., Fokin V.V., Finn M.G., Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 9152-9153, **2004**.
- [239] Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V., Noodleman L., Sharpless K.B., Fokin V.V., Copper (I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 210-216, **2005**.
- [240] Himo F., Demko Z.P., Noodleman L., Sharpless K.B., Mechanisms of Tetrazole Formation by Addition of Azide to Nitriles, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 12210-12216, **2002**.
- [241] Zhang F., Shen G., Ji S., Yang B., Recent Advances of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Ion Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 349-352,

2015.

- [242] Zhang F. F., Liu Y. J., Wei J., Guo Z. M., Yang B.C., Liang X.M., Separation of Inorganic Anions on a Triazole Functionalized Ion Exchanger in Ion Chromatography, *Journal of Separation Science*, 34, 796–799, **2011**.
- [243] Marechal A., El-Debs R., Dugas V., Demesmay C., Is click chemistry attractive for separation sciences?, *Journal of Separation Science*, 36, 2049–2062, **2013**.
- [244] Shen G., Zhang F., Yang B., Chu C., Liang X., A novel amide stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and ion chromatography, *Talanta*, 115, 129-132, **2013**.
- [245] Liu Y. J., Du Q., Yang B.C., Zhang F.F., Chu C.H., Liang X. M., Silica Based Click Amino Stationary Phase for Ion Chromatography and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, *Analyst*, 137, 1624–1628, **2012**.
- [246] <http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>
- [247] Bilici Z., Camli S.T., Unsal E., Tuncel A., Activity behavior of a HPLC column including alpha-chymotrypsin immobilized monosized-porous particles, *Analytica Chimica Acta*, 516, 125-133, **2004**.
- [248] Unsal E., Uguzdogan E., Patir S., Tuncel A., Ion-exchanger synthesis using reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, *Journal of Separation Science*, 32, 1791-1800, **2009**.
- [249] Kip, Ç., Maraş, B., Evirgen, O., Tuncel, A., A new type of monodisperse porous, hydrophilic microspheres with reactive chloroalkyl functionality: synthesis and derivatization properties, *Colloid and Polymer Science*, 292, 219-228, **2014**.
- [250] http://unam.bilkent.edu.tr/?al_product=environmental-scanning-electron-microscope-esem
- [251] Dong, X., Dong, J., Ou, J., Zhu, Y., Zou, H., Capillary electrochromatography with zwitterionic stationary phase on the lysine-bonded poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary column, *Electrophoresis*, 27, 2518-2525, **2006**.
- [252] Golgelioglu, C., Bayraktar, A., Celebi, B., Uguzdogan, E., Tuncel, A., Aqueous size exclusion chromatography in semimicro and micro-columns by newly synthesized monodisperse macroporous hydrophilic beads as a stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1224, 43-50, **2012**.
- [253] Peng, X. T., Liu, T., Ji, S. X., Feng, Y.Q., Preparation of a novel carboxyl stationary phase by “thiol-ene” click chemistry for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Separation Science*, 36, 2571-2577, **2013**.

- [254] http://www.onu.edu/academics/getty_college_arts_sciences/areas_study/chemistry/instrumentation/liquid_chromatography_hp
- [255] <http://www3.nd.edu/~jhicks3/Instruments.html>
- [256] http://unam.bilkent.edu.tr/?al_product=chnso-elemental-analyzer
- [257] Kurinovich M.A., Lee J.K., The Acidity of Uracil from the Gas Phase to Solution: The Coalescence of the N1 and N3 Sites and Implications for Biological Glycosylation, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 6258-6262, **2000**.
- [258] The Merck Index, 9th Edn., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA 1976.
- [259] Luo H., Zheng C., Cheng Y.K., The retention properties of nucleobases in alkyl C8-/C18- and IAM-chromatographic systems in relation to log, *Journal of Chromatography B*, 847, 245-261, **2007**.
- [260] Saurina J., Hernandez-Cassou S., Tauler R., Izquierdo-Ridorsa A., Spectrophotometric determination of pKa values based on a pH gradient flow injection system, *Analytica Chimica Acta*, 408, 135-143, **2000**.
- [261] Ahmed I.T., Soliman E.S., Boraie A.A., The Acidity Constants of Some Pyrimidine Bases in Various Water–Organic Solvent Media, *Annales De Chimie*, 94, 847-856, **2004**.
- [262] Sigel H., Lippert B., The Effects of N7-Coordinated cis-Diammine-Platinum (II) on the Acid-Base Properties of Guanine Derivatives, *Pure and Applied Chemistry*, 70, 845-854, **1998**.
- [263] <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/functional%20Monomer/ACRYLIC%20ACID.htm>
- [264] <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/ACRYLAMIDE.htm>
- [265] <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/THIOUREA.htm>
- [266] <http://www.chemicaland21.com/petrochemical/ACETIC%20ACID.htm>
- [267] <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/pTOLUIC%20ACID.htm>
- [268] <http://chemicaland21.com/industrialchem/organic/benzoic%20acid.htm>
- [269] <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/4-CHLOROBENZOIC%20ACID.htm>
- [270] www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/CAPRIC%20ACID.htm
- [271] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2879?lang=en®ion=TR>

[272] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h8502?lang=en®ion=TR>

[273] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00368>

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Fatoş Çiğdem KİP
Doğum Yeri: Ankara
Medeni Hali: Evli
E-posta: cigdemg@hacettepe.edu.tr
Adres: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,
BEYTEPE/ ANKARA

Eğitim

Lise: Gazi Anadolu Lisesi, Ankara
Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,
Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
Doktora: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: İleri düzey
Almanca: Başlangıç

İş Deneyimi

22/11/2007 - Devam ediyor Araştırma Görevlisi,
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
BEYTEPE/ANKARA

07/2005 - 08/2005 Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Ankara (staj)

Deneyim Alanları

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
- Nano-Sıvı Kromatografisi (Nano-LC)
- Mikro-Sıvı Kromatografisi (Micro-LC)

- Kapiler Elektrokromatografi (CEC)
- Brunauer-Emmet-Teller (BET) Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçer
- Zeta Sizer Boyut ve Molekül Ağırlığı Dağılımı Ölçer
- Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) spektrofotometre
- Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hidrofilik etkileşim kromatografisi için monolitik ve partikül bazlı yeni mikrokolonların geliştirilmesi, TÜBİTAK (112T461), Proje Dönemi: 01/11/2012 - 01/11/2014, Bütçe: 150647 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. **Kip, Çiğdem;** Maraş, Bilginur; Evirgen, Oğulcan; Tuncel, Ali; A new type of monodisperse porous, hydrophilic microspheres with reactive chloroalkyl functionality: synthesis and derivatization properties, *Colloid and Polymer Science*, 292, 219-228, **2014**.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. **Kip, Çiğdem;** Gökaltun, Aslıhan, Hamaloğlu, K. Özlem; Çelebi, Bekir; Tuncel, Ali; A new HILIC stationary phase: Triazole functionalized-monodisperse-porous polyacrylate beads via click-chemistry, *HPLC 2014, 41st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, New Orleans, USA, 11-15 Mayıs, **2014**.
2. **Kip, Çiğdem;** Kibar, Güneş; Gökaltun, Aslıhan, Hamaloğlu, K. Özlem; Çelebi, Bekir; Tuncel, Ali; A HILIC stationary phase based on monodisperse-macroporous polyacrylate beads functionalized with zwitterionic molecular brushes, *HPLC 2014, 41st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, New Orleans, USA, 11-15 Mayıs, **2014**.

3. **Kip, Çiğdem;** Kibar, Güneş; Çelebi, Bekir; Tuncel, Ali; Monosized porous beads functionalized with zwitterionic molecular brushes via surface initiated living polymerization, *The 1st International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition (PPM2013)*, İzmir, Türkiye, 3-6 Eylül, **2013**.