



T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

[2-(3,4-EPOKSİSİKLOHEKSİL)ETİL]
TRİMETOKSİSİLAN TÜREVİ YENİ BİR SABİT
FAZIN SENTEZİ VE KARMA MOD HPLC
UYGULAMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Yaşar MUMİN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL

HAZİRAN 2022
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Mehmet Yaşar MUMİN tarafından hazırlanan “[2-(3,4-Epoksisikloheksil)Etil] Trimetoksisilan Tabanlı Yeni Bir Sabit Fazın Sentezi ve Karma Mod HPLC Uygulamaları” adlı tez çalışması 27 /06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Başkan Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT
Danışman Dr.Öğr. Üyesi Hayriye ARAL
Üye Doc. Dr. İbrahim Dolak

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Osman PAKMA
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdür V.

Bu tez çalışması Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından BTÜBAP-2018- FED-3 No’lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all materials and results that are not original to this work.

İmza

Mehmet Yaşar MUMİN

Tarih: 27/06/2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

[2-(3,4-EPOKSİSİKLOHEKSİL)ETİL]TRİMETOKSİSİLAN TÜREVİ YENİ BİR SABİT FAZIN SENTEZİ VE KARMA MOD HPLC UYGULAMALARI Mehmet Yaşar MUMİN

BATMAN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL

Yıl, 2022, 50 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Doc. Dr. İbrahim DOLAK

Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL

Bu tez çalışmasında, daha önce BTÜBAP-2018- FED-3 Projesi kapsamında sentezlenip HPLC kolonu haline getirilen Si-Ch-IlePBA sabit fazın HPLC ile hidrofilik etkileşimi incelendi.

Bir kapling reaktifi olan [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilandan yola çıkılarak silika tabanlı yeni bir karma- mod sabit fazı sentezlendi ve hidrofilik etkileşim/ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) etkinliği incelendi. Polar amid, amin ve alkol gruplarının yanı sıra polar olmayan alifatik ve aromatik grupları taşıyan yeni sabit faz, [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan ve izolösin amino asitinden başlayarak sentezlendi ve yapısı elementel analiz, kızılötesi spektroskopisi(FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve katı hal ¹³C nükleer manyetik rezonans (CPMAS NMR) ile karakterize edildi. Farklı polaritelere sahip bazı aromatik bileşiklerin, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ve ters faz (RP) koşullarında ayrımı incelendi ve başarılı bir ayırma sonucu elde edildi. Yeni sabit fazın HILIC modundaki etkinliğini incelemek için suda çözünen vitaminler ve nükleobazlar test edildi. Altı tane suda çözünen vitamin, gradient elüsyonla, beş tane nükleobaz, izokratik elüsyonla başarılı bir şekilde ayrıldı. Sabit fazın süstitüe benzoik asitler, klorlu herbisitler, alkil benzenler gibi bir seri orta ve zayıf polarlıkta ve polar olmayan küçük bileşiklere ve polar/polar olmayan aromatik bileşiklerin bir karışımına karşı ters faz (RP) etkinliği incelendi ve başarılı ayırmalar elde edildi. İzokratik elüsyon ile ayrılan tüm analitler için alıkonma faktörü, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri faktörü hesaplandı. Geleneksel C18 ve ticari HILIC kolonları ile kıyaslandığında, yeni sabit fazın hem HILIC hem de RPLC performansı sergilediği gözlemlendi ve böylece daha geniş perspektifte analit sınıflarının ayrımı incelendi.

Anahtar Kelimeler: HILIC, Mixed-mode kromatografi, Polar sabit fazlar, Ters faz, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi,

ABSTRACT

MS THESIS

MIXED-MODE HPLC APPLICATION OF A NEWLY DEVELOPED STATIONARY PHASE BASED ON [2-(3,4-EPOKSİSİKLOHEKSİL) ETİL]TRİMETOKSİLAN.

Mehmet Yaşar MUMİN

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
OF BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

Asst. Prof. Hayriye ARAL

2022, 50 Pages

Jury

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Dolak

Asst. Prof. Dr. Üyesi Hayriye ARAL

A new silica-based mixed-mode stationary phase derived from [2-(3,4-epoxycyclohexyl)ethyl]trimethoxysilane as a coupling reagent was synthesised and evaluated for hydrophilic interaction/reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The new stationary phase bearing polar amide, amine and alcohol groups as well as nonpolar aliphatic and aromatic groups was synthesised starting from [2-(3,4-epoxycyclohexyl)ethyl]trimethoxysilane and isoleucine amino acid and characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (CPMAS NMR). Several aromatic compounds having different polarities were tested for hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and reversed phase (RP) condition and successful separation could be achieved. Water soluble vitamins and nucleobases were tested to investigate effectiveness of the new column on HILIC mode. The six water soluble vitamins separated successfully by a gradient elution, and five nucleobases were separated by an isocratic elution. A number of moderately and weakly polar and nonpolar small compounds such as substituted benzoic acids, chlorinated herbicides, alkyl benzenes and a mixtures of polar/nonpolar aromatic compounds were tested for the RP condition and separated successfully. The retention factor, theoretical plate number and peak asymmetry factor were calculated for all of the analytes separated by isocratic elution. Compared to traditional C18 and commercial HILIC columns, the new stationary phase exhibited both HILIC and RPLC performance, and the scope of analyte separation was thus enlarged.

Keywords: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), Mixed-mode chromatography, Mixed-mode stationary phase, Reversed phase liquid chromatography

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ihtiyaç duyduğum her konuda benden tecrübelerini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, ihtiyaç duyduğum her konuda bana destek olan ve bu çalışmada şüphesiz en büyük pay sahiplerinden biri olan çok değerli hocam Prof. Dr. Tarık ARAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Güler yüzlü ve samimi tavrı ile yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNGUR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, yürütücülüğünü Prof. Dr. Tarık ARAL'ın yaptığı BTÜBAP-2018-FED-3 No'lu BAP projesinin bir kısmını oluşturmaktadır. Bu vesile ile Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BATÜBAP)'ne ve çalışmalarım sırasında laboratuvar imkânı sunan Kimya bölüm başkanlığına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, bugünlere gelmem de en büyük pay sahibi olan annem Şirin MUMİN ve ablam Zübeyde MUMİN'e, hayatıma girdiği günden beri dünyamı değiştiren, aldığım kararlarda beni cesaretlendiren, destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim Fatma MUMİN'e, çocuklarım Ahmet Tuna ve Yiğit Baran'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Bu tez rahmetli babam İsmail MUMİN'e ithafen yazılmıştır.

Mehmet Yaşar MUMİN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Sıvı Kromatografisinde Bileşiklerin Ayrılma Prensipleri.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Karma Mod Kromatografisi (Mixed Mode Chromatography, MMC).....	6
2.2.Karışık mod kromatografisinin mekanizmaları.....	7
2.2.1.Sabit fazlar ile ilgili mekanizmalar	7
2.2.1.1.Kimya tasarımına göre durağan fazların sınıflandırılması.....	7
2.2.2. MMC'de Ayrırma Modlarının Kombinasyonları.....	8
2.2.2.1. Ters Fazlı İyon Değişimi Sabit Fazlar (RP-İEX).....	8
2.2.2.2. Hidrofilik İyon Değişimi Sabit Fazlar (HILIC-İEX)	10
2.2.2.3. Diğer Kombinasyonlar.....	11
2.3. Mobil fazların bileşimi ve karma mod kromatografi üzerindeki etkileri	13
2.3.1. Polar organik çözücüler.....	13
2.3.2. Tamponlar ve pH	14
2.3.3. Tuzlar	16
2.3.4. Diğer Katkı Maddeleri.....	17
2.4. Karışık Modlu Sabit Fazların Farmasötik Analiz Uygulaması	17
2.4.1. İlaçlar ve ilaçlardaki Safsızlıklar	17
2.5. Metabolomik Uygulamalar	20
2.6. Doğal Ürünlerde Biyofarmasötikler ve Polar Bileşikler.....	21
2.7. HPLC Sisteminde Kullanılan Sabit Faz Maddeleri.....	22
2.7.1. Kaplı Reaktifleri	22
2.7.2. Silan Kaplı Reaktifleri.....	22
2.7.3. Silika Yüzey Modifikasyonu için Silan Kaplı Reaktifleri.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31

3.1. Reaktifler ve malzemeler	31
3.2. HPLC koşulları	31
3.3. Kromatografik Sabit Fazın paketlenmesi ve Stabilite Testleri	34
3.4. Yeni durağan fazın sentezi	34
3.5. Sentezler	35
3.6. Sabit Faz Materyallerinin karakterizasyonu	37
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
4.1. HILIC koşulları altında nükleotidlerin/nükleositlerin ayrılması	42
4.2. HILIC koşulları altında suda çözünen vitaminlerin ayrılması	43
4.3.RP Koşullarında Sudan Boyalarının Ayrılması	44
4.4. RP koşulları altında benzoik asitlerin ayrılması	45
4.5. RP Koşullarında Alkilbenzenlerin Ayrılması	47
4.6. Polar/nonpolar bileşiklerin bir karışımının ayrılması	47
4.7. RP koşulları altında klorlu herbisitlerin ayrılması	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
6. KAYNAKÇA	51
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 Kolon ve hedef moleküller arasındaki (A) afinitesine dayalı fiziksel etkileşimlerin şeması,(B) elektrostatik kuvvetler ve (C) sıvı kromatografi sistemlerinde boyut farkı.	1
Şekil 2. 1 Kimya tasarımlarına göre sınıflandırılan karma modlu durağan fazlar türleri (Liu, 2010).	7
Şekil 2. 2 Bazı RP-IEX karma modlu durağan fazların yapıları: (a) RP-WCX, (b) RP-SCX, (c) RP-SAX ve (d) RP-WAX (Eric ve ark. 2011).	9
Şekil 2. 3 (a) diol, (b) amid ve (c) amin polar grupları ile bazı RP-HILIC karışık mod durağan fazların yapıları (Eric ve ark. 2017)	11
Şekil 2. 4 Silan kapling ajanlarının genel formülü	23
Şekil 2. 5 Bazı silan kaplin reaktiflerinin yapısı	23
Şekil 2. 6 Silan kaplin reaktifinin silika jel vb. inorganik malzemeye bağlanması için genel bir şema	24
Şekil 2. 7 Silika yüzeyindeki farklı silanol gruplarının yapıları	25
Şekil 2. 8 Çeşitli Schiff bazı modifiyeli silika jel materyallerinin sentezi için 1. Yol	26
Şekil 2. 9 Çeşitli Schiff bazı modifiyeli silika jel materyallerinin sentezi için 2. Yol	27
Şekil 2. 10 Kapling reaktifi olarak 3-merkaptopiltrimetoksisilan türevi silika jel materyallerinin sentezi	27
Şekil 2. 11 Beta-diketon modifiyeli silika jel sentezi	28
Şekil 2. 12 2,4-diklorofeboksiasetik asit modifiyeli silika jel.....	28
Şekil 2. 13 Formilsalisilik asit modifiyeli silika jel materyalleri.....	29
Şekil 2. 14 Kapling Reaktifi olarak 3-kloropropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri.	29
Şekil 2. 15 Kapling Reaktifi olarak 3-aminopropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri.	30
Şekil 2. 16 Kapling Reaktifi olarak 3-glisidiloksiropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri.....	30
Şekil 3. 1 Nükleotit ve Nükleozitler	32
Şekil 3. 2 Suda çözünen vitaminler.....	32
Şekil 3. 3 Sudan boyaları	33
Şekil 3. 4 Benzoik asit türevleri.....	33
Şekil 3. 5 Alkil benzenler	33
Şekil 3. 6 Polar/Apolar test bileşikleri	34
Şekil 3. 7 Herbisitler	34
Şekil 3. 8 Karışık mod sabit fazın sentezleri, Si-Ch-IlePBA.	36
Şekil 3. 9 Boş silika jelin SEM görüntüleri	38
Şekil 3. 10 Yeni durağan faz Si-Ch-IlePBA'nın SEM görüntüleri	38
Şekil 3. 11 Blanc silika (A) ve Si-Ch-IlePBA (B) FTIR spektrumları.	40
Şekil 3. 12 SP-Ch-IlePBA (8 saatlik tarama)'nın ¹³ C CPMAS NMR Spektrumu.	41
Şekil 4. 1 Nükleotidler ve nükleosit karışımının ayrılması: Mobil faz; Su/MeCN: 30/70. Akış Hızı: 0,5 mL/dak., UV: 265 nm. Analitler: 1; Timidin, 2; sitidin, 3; Sitozin, 4; Guanozin, 5; adenin.....	42

Şekil 4. 2 Suda çözünen vitaminlerin ayrılması: Gradyan: B'de % A iken A = Amonyum asetat (pH 4.50, 20 mM) ve B = MeCN. 0-5 dakika, %10 A, 5-20 dakika; %10-40 A. Akış: 1 mL/dak. UV: 280 nm. Analitler: 1, Nikotin amid; 2, B3; 3, B6; 4, C; 5, B2; 6, B1; 7, B12.	44
Şekil 4. 3 Sudan Boyalarının Ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 55/45. Akış: 1 mL/dak. Sıcaklık: 30 °C UV: 506 nm. Analitler: 1, Sudan I; 2, Sudan II; 3, Sudan III; 4, Sudan IV	45
Şekil 4. 4 Benzoik asit türevlerinin ayrılması: Mobil faz; MeCN/tampon (amonyum asetat pH 5.23, 20 mM): 13/87. Akış: 1 mL/dak. UV: 230 nm. Analitler: 1, Sülfanilik asit; 2, Benzoik asit; 3, 3,5-Dintrobenzoik asit; 4, 4-Aminobenzoik asit; 5, 4-Metilbenzoik asit; 6, Salisilik asit.	46
Şekil 4. 5 Alkil benzenlerin ayrılması: Mobil faz; 5'li karışım: MeCN/su: 35/65. Akış: 1,2 ml/dak. Sıcaklık: 35 0C. UV: 250 nm. Analitler: 1, Benzen; 2, Toluen; 3, Ksilen; 4, Naftalin; 5, Fenantren.....	47
Şekil 4. 6 Polar/polar olmayan karışımın ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 18/82. Akış: 1 mL/dak. Sıcaklık: 30 0C. UV: 230 nm. Analitler: 1, Ftaldialdehit; 2, Benzoik asit; 3, Timin; 4, 4-hidroksibenzaldehit; 5, 2-Aminofenol; 6, Metoksifenol; 7, Asetofenon	48
Şekil 4. 7 Klorlu herbisitlerin ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 10/90. Akış: 0,8 ml/dak. Sıcaklık: 30 0C. UV: 230 nm. Analitler: 1, 2,4-D; 2, 2,4-DP; 3, 2,4,5-T; 4, 2,4-DB.	49

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1 Sıvı kromatografisi türleri, ayırma ilkeleri ve sıvı kromatografisi alanındaki yeni gelişmeler. (Handajaya ve ark 2022)	4
Tablo 2. 1 Karışık mod kromatografi işleminde yaygın olarak kullanılan katkı maddeleri	18
Tablo 2. 2 İlaç ve safsızlıkta karışık mod sabit fazların uygulanması.....	19
Tablo 2. 3 Karışık mod durağan fazların metabolik uygulaması	20
Tablo 2. 4 Biyofarmasötiklerde karma mod sabit fazların ve doğal ürünlerde polar bileşiklerin uygulanması.	21
Tablo 3. 1 Hazırlanan sabit fazların Element Analizi sonuçları.....	37

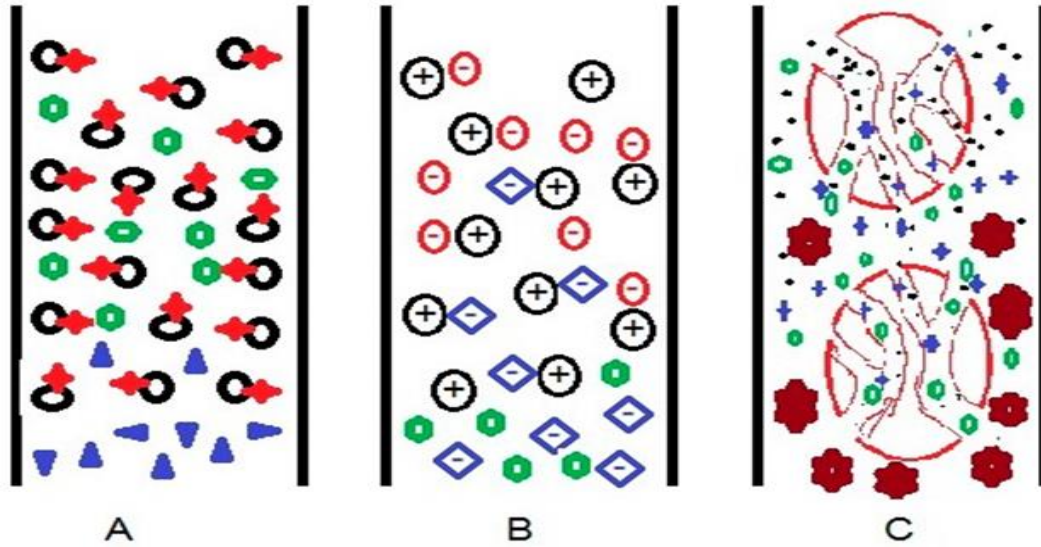
SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM	: Atomik forse microscopy (atomik kuvvet mikroskobu)
BEH	: Ethylene-bridged Hybrid (etilen köprülü hibrit)
BICINE	: N, N-dihydroxyethylglycine (N,N-dihidroksietilglisin)
BMAA	: Beta-methylamino-L-alanine (beta-metilamino-L-alanin)
CAD	: Charged aerosol detection (yükü aerosol algılama dedektörü)
C-CP	: Capillary-channeled Polymer (Kılcal kanallı polimer)
DAB	: 2,4-diaminobutyric acid (2,4-diaminobütirik asit)
DAD	: Diode-Array Detector (diyot dizi dedektörü)
DMF	: N,N-Dimetilformamid
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
EC	: Electrochromatography (Elektrokromatografi)
ELSD	: Evaporative Light-scattering Detection (buharlaşmalı ışık saçılımı Saptama Dedektörleri)
EtOH	: Ethanol (eilalkol)
FTIR	: Fourier transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
GPC	: Gel Permeation Chromatography (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2'-2-ethanesulfonic acid (N-2-hidroksietilpiperazin-N-2'-2-etansülfonik asit)
HILIC	: Hydrophilic Interaction Chromatography (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi)
HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IEC	: Ion Exchange Chromatography (İyon Değişim Kromatografisi)
IC	: Ion Chromatography (İyon Kromatografisi)
IgG	: İmmunoglobulins (immünoglobulinler)
MCC	: Multi-column Chromatography (Çok Sütunlu Kromatografi)
MeCN	: Acetonitrile (asetonitril)
MeOH	: Methanol (metil alkol)
MMC	: Mixed-mode Chromatography (Karma Mod Kromatografisi)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PAHs	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (polisiklik aromatik hidrokarbon)
RI	: Refractive Index (kırılma indeksi)
RPC	: Reversed Phase Chromatograph (Ters Faz Kromatografisi)
SAX	: Sulfonic Anionexchange (sülfonik asitler güçlü anyon değişimi B)
SCX	: Strong Cation-exchange Groups (güçlü kation değişim grupları)
SEC	: Size Exclusion Chromatography (Boyut Dışlama Kromatografisi)
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
TLC	: Thin layer chromatography (tabaka kromatografisi)
WAX	: Weak Anion-exchange Groups (zayıf anyon değişim grupları)
WCX	: Weak Cation-exchange Groups (zayıf kation değişim grupları)
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-Diklorofenoksiasetik asit)
2,4-DB	: 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid
2,4-DP	: 2,4-Dichloroprop
2,4,5-T	: 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic

1. GİRİŞ

1.1. Sıvı Kromatografisinde Bileşiklerin Ayrılma Prensipleri

Sıvı kromatografisi sistemindeki sabit ve hareketli fazlar ile numunede bulunan bileşikler arasındaki farklı etkileşimler sayesinde ayrılma gerçekleşir (Şekil 1.1). Hedef bileşikleri ayırmak için (A) bileşiklere olan afinitedeki farklılıklar, (B) hedef bileşiklerle elektrostatik kuvvetlerin gücündeki farklılıklar ve (C) boyut farklılıkları gibi çeşitli modlara dayalı olarak bileşik ayırmayı mümkün kılmak için sabit fazlar geliştirilebilir. Bu etkileşim modlarından biri veya daha fazlası, sıvı kromatografi kullanılarak bileşik ayrımı ile sonuçlanacaktır. İster ticari ister geliştirme aşamasında olsun uygun sabit fazları seçmek bir kullanıcı için biraz kafa karıştırıcı olabilir. Etkileşim modlarını anlamak, kullanıcılara belirli bir analit türü için uygun sabit fazları seçmede yardımcı olacaktır. Afiniteye dayalı ayırmada (Şekil 1.1. A), belirli fonksiyonel gruplara (kırmızı) sahip sabit parçacıklar (siyah), bir etkileşim ağı yoluyla spesifik bağlanma ile uygun bileşiklerle (yeşil) etkileşime girerek kolonda tutulmaya neden olur. Durağan faz, etkileşmeyen bileşikleri (mor) askıya almaz ve bileşikler, tutulmadan akar. Bu ayırma modundaki ortak etkileşimler hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimi, London kuvveti ve kompleks oluşumdur. Hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşiminin kombinasyonu hidrofilik bir etkileşimken London kuvveti hidrofobik bir etkileşimdir.



Şekil 1. 1 Kolon ve hedef moleküller arasındaki (A) afinitesine dayalı fiziksel etkileşimlerin şeması,(B) elektrostatik kuvvetler ve (C) sıvı kromatografi sistemlerinde boyut farkı.

Kompleks oluşumu genellikle analitlerin proteinler (Zeng ve ark. 2019, Riguero ve ark. 2020), DNA (Huberman ve ark. 2021) ve RNA (Hovhanasiyan ve ark. 2021, Busby ve ark. 2020) olduğu kromatografide meydana gelir. Sabit faz, makromoleküllerden ligandları kabul edebilen bir metal-kompleks bağlanma bölgesine sahip olacak şekilde modifiye edilmiştir. Bileşikler ve durağan faz arasındaki daha güçlü bir etkileşim alıkonma süresini arttırırken, daha zayıf bir etkileşim alıkonma süresini azaltır. Hiç afinite etkileşimi olmayan bileşikler bulmak neredeyse imkansızdır. Sabit fazdaki fonksiyonel gruplar ve ayrılan bileşikler çok farklı polaritelere sahip olsalar ve hiçbir fonksiyonel grup etkileşimi olmasa da, London kuvvetleri her zaman vardır. Her molekül, farklı fonksiyonel grupları, atom numaraları ve 3D yapıları nedeniyle farklı şekilde etkileşime girer. Bu fark, analog (Moravca ve ark. 2018) ve homolog bileşiklerin (Wang ve ark. 2015, Cong ve ark. 2020) ayrılmasını sağlar. Afinite kromatografisi, biyomakro moleküllerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, ters faz kromatografisi (RPC) ve hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC), afiniteye dayalı ayırmanın hidrofobiklik ve hidrofiliğe dayalı etkileşimlerin bir sonucu olarak meydana geldiği daha küçük organik bileşiklerin ayrılması için yaygındır. Yalnızca elektrostatik ayırmaya dayanan ayırma modu, katyonik türler ve anyonik türler arasında kulobik kuvvetlerin oluşmasını gerektirir. Durağan parçacıklar, fonksiyonel grupların tipine ve deneysel koşullara bağlı olarak katyon veya anyon olarak işlev görebilir. Şekil 1.1B'de örneklendiği gibi, elektrostatik kuvvetler yoluyla durağan katyona (siyah) bağlanan mavi renkli anyon, daha güçlü bir etkileşim nedeniyle analitler (kırmızı) ile değiştirilir (Rusli ve ark. 2022). Bu süreç bir iyon değiştirme mekanizmasıdır. Ne yüklü ne de negatif yüklü olan yeşil renkli bileşik, yeşil renkli bileşik ile durağan katyon arasında hiçbir kulombik etkileşim meydana gelmediğinden, kolondan tutulmadan ayrılır. Aynı ilke, anyonik durağan fazlar kullanılarak katyonik bileşiklerin ayrılması için de geçerlidir. Moleküllerin daha büyük bir yük yoğunluğu, daha uzun bir tutunma süresi ile sonuçlanan daha güçlü bir elektrostatik kuvvet üretecektir. Bu tür elektrostatik kuvvetler, iyon değişim kromatografisi (IEC) veya iyon kromatografisi (IC) sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sabit fazın ve analitin yükü, ayırmanın gerçekleştirilebilmesi için mobil faz sisteminin pH'ı veya bileşimi ayarlanarak değiştirilebilir. pH değeri, zayıf asit veya zayıf baz olan molekülleri etkiler. Yeni geçici moleküller veya 3D konformasyondaki değişiklikler, mobil fazın değişikliklerinden kaynaklanabilir. Bir mobil faz sisteminde değişebilen değişkenler tampon konsantrasyonu, tampon tipi ve kompleks oluşturan ligandır. Örnek numune

türleri, küçük iyonlar (Guo ve ark. 2016, Amran ve ark. 2020) ve makromoleküllerdir (Zhang ve ark. 2014)

Boyut farkına dayalı ayırma, daha çok boyut dışlama kromatografisi (SEC) veya jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) olarak bilinir. Bu tip kromatografide, analitin sabit partikül gözeneklerinde hapsolme olasılığına göre bileşikler ayrılır. Genellikle, daha küçük boyutlu analit, sabit gözeneklerde daha uzun süre tutulur, böylece Şekil 1C'de gösterildiği gibi, daha büyük bileşiklere kıyasla tutma süresi artar. Genellikle bu sistem, proteinler (Bouvier ve ark. 2014, Sathitnaitham ve ark. 2021), karbonhidratlar (Perez ve ark 2018) yüzey aktif maddeler (Kothencz ve ark. 2018) ve polimerler (Janco ve ark. 2018) gibi molekül kütlesi 2000 ile 20.000.000 amu arasında olan büyük bileşikleri ayırmak için kullanılır. Yukarıdaki ayırma modlarından iki veya üçünün birleştirilmesi, yalnızca bir ayırma modunun uygulanmasına kıyasla daha etkili bileşik ayırma ile sonuçlanabilir. Örneğin, kiral kromatografi, boyut dışlama ve afiniteye dayalı ayırma ilkelerini birleştirir. Proteinleri ve DNA'yı ayırmak için yaygın olarak kullanılan elektrokromatografi (EC) (Huang ve ark. 2021, Ji ve ark. 2021), boyut ve elektrostatik ayırma ilkelerini birleştirir. EC'de ayırma, bileşiklerin yük yoğunluğunun oranına dayanır. Daha büyük yük yoğunluklu bileşikler, düşük olanlardan daha hızlı ayrılır. Karma mod kromatografisi (MMC) (Wang ark. 2021, Qiao ve ark. 2014, Aral ve ark.2015) özellikle mobil fazda ölçüm koşullarına bağlı olarak en az iki tip kromatografi için kullanılabilen bir sistemdir. Çok sütunlu kromatografi (MCC), yukarıdaki üç ayırma ilkesinin bir kombinasyonunu kullanarak bileşikleri karmaşık matrislerden ayırmak için kullanılır.

Tablo 1.1'de, son 10 yılda geliştirilen kromatografi türlerinin birkaç örneğini özetlemektedir. Geliştirilen durağan fazların çoğu silika ve organik polimerlere dayanmaktadır. Analiz edilen numuneler ayrıca basit iyonlardan yüksüz makromoleküllere, polardan polar olmayan moleküllere ve su bazlıdan organik bazlı solventlere kadar geniş bir yelpazededir. Çeşitli izomerler (fonksiyonel grup, optik ve yapısal izomerler) veya molekül türevleri, uygun bir sıvı kromatografik sistem kullanılarak ayrılabilir (Rusli ve ark. 2022)

Tablo ayrıca çoğu mobil faz türünün su, asetonitril ve metanol olduğunu göstermektedir.

Tablo 1. 1 Sıvı kromatografisi türleri, ayırma ilkeleri ve sıvı kromatografisi alanındaki yeni gelişmeler. (Handajaya ve ark 2022)

Sıvı Kromatografi Modu	Ayırma İlkesi	Sabit faz	Analit	Hareketli faz
Ters fazlı Kromatografi	Afinite	Oktadesil akrilat ve 2-vinil-4,6-diamino-1,3,5-triazin ile modifiye edilmiş silika (Mallik ve ark. 2018).	PAHs	metanol
		Oktadesil akrilat ve N-metilmaleimid ile modifiye edilmiş silika (Mallik ve ark.2013)	PAH'lar ve tokoferoller	Metanol ve su karışımı
	İyonik	N-Boc-fenilalanin ve sikloheksilamin ile modifiye edilmiş silika (Aral ve ark. 2013)	fitohormonlar	Fosfat karışımı tampon ve asetonitril
		Zr ₆ O ₄ (OH) ₄ MOF ile modifiye edilmiş Afinite 2-amino-tereftalik asit veya 4,4-bifenil-dikarboksilik asit (Zhao ve ark.2018)	PAH'lar ve aromatikler bileşikler	Metanol ve su karışımı
Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi	İyonik	Silika ile modifiye edilmiş (2-(metakriloloksi)-etil)dimetil-(3-sülfopropil)amonyum hidroksit veya 2-metakriloloksietil Fosforilkolin (Li ve ark.2020)	Toluen karışımı, formamid, dimetilformamid, ve tiyoüre	su ve asetonitril karışımı
	Afinite	çokyüzlü oligomerik silseskioksan ve akrilamid türevleri ile modifiye edilmiş amino silika (Bo ve ark. 2020)	nükleositler, organik asitler ve -agonistler	asetonitril ve amonyum format çözeltisi karışımı
	Afinite	EGDMA ve maltoz ile modifiye edilmiş silika (Chu ve ark. 2018)	nükleobazlar ve nükleotidler	su ve asetonitril karışımı
	Afinite	Vinil silseskioksan ve ditiyotritol ile modifiye edilmiş silika (Lin ve ark. 2020)		
	iyonik ve afinite	Silika ile modifiye edilmiş pirazindikarboksilik anhidrat (Jin ve ark. 2021)	Oligosakkaritler, alkaloid ve organik asit grupları	asetonitril ve amonyum format çözeltisi karışımı
Karışık mod kromatografi	iyonik ve afinite	2-metakriloloksietil Fosforilkolin ile modifiye edilmiş Silika (Xiong ve ark. 2018)	Protein ve lizozim	Asetonitril karışımı, amonyum format çözüm, KH ₂ PO ₄ çözelti, NaCl çözeltisi
	iyonik ve afinite	Oktadesil ile modifiye edilmiş silika ve diol grupları (Wang ve ark. 2015)	aristoloşik asit ve türevler	Formik asit ve asetonitril karışımı

Karışık mod kromatografi	iyonik ve afinite	Glutasyon ile modifiye edilmiş silika (Shen ve ark. 2013)	protein	formik asit, asetonitril, Su karışımı
	iyonik ve afinite	poli(12-metakriloil dodesilfosfatidik asit-koletilen glikol dimetakrilat) (Peng ve ark. 2016)	Aromatik keton, fenol ve türevleri, küçük organik bileşikler	asetonitril ve amonyum format çözeltisi karışımı
	afinite	Oktadesil ve karbon noktaları ile modifiye edilmiş amino silika (Wu ve ark. 2021)	PAH'lar, nükleositler ve nükleobazlar	metanol, asetonitril, amonyum asetat çözeltisi ve su karışımı
Afinite kromatografisi	iyonik ve afinit	2-Merkapto-1-metilimidazol ile modifiye edilmiş agaroz (Lu ve ark. 2017)	Protein	NaOH çözeltisi
	iyonik ve afinit	Ligand kompleksi ile modifiye edilmiş sefaroze (Riguero ve ark. 2020)	Histidin içeren protein	Tris tamponu, sodyum klorür ve imidazol karışımı
	iyonik ve afinit	N-metilimidazolyum iyonik sıvı ile modifiye edilmiş silika (Bai ve ark. 2018)	Protein	Asetonitril, trifloroasetik asit karışımı, NaClO ₄ çözeltisi, KH ₂ PO ₄ çözeltisi ve NaCl çözeltisi
iyonik kromatografi	iyonik ve afinit	Glutaraldehit ile modifiye edilmiş amino silika (Hou ve ark. 2021)	Protein	Fosfat tamponu
	İyonik	Kitosan ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ile modifiye edilmiş bentonit (Amran ve ark. 2020)	Cr(III) ve Cr(VI) çözeltisi	Cr(III) için nitrik asit çözeltisi ve Cr(VI) için amonyak çözeltisi
	İyonik	Poli(amidoamin) ile modifiye edilmiş polistiren-metakrilat türevleri (Guo ve ark. 2017)	Nitrat, sülfatlar, bromür vb. gibi küçük anyonlar.	NaOH çözeltisi
kiral kromatografi	Boyut ve afinite	3-kloro-4-metilfenilkarbamit ile modifiye edilmiş polisakkarit (Qiu ve ark. 2021)	Paroksetin hidroklorür grupları	Süper kritik CO ₂ , metanol ve amonyum asetat çözeltisinden oluşan karışım
	Afinite	İzopropilkarbamit siklofruktan 6 grupları (Hroboňová ve ark. 2015)	metiyonin grupları	Metanol, asetonitril, asetik asit ve trietilamin karışımı
	Boyut	3,30-fenil-1,10-binaftil-18-taç-6-eter ile modifiye edilmiş silika (Kawamura ve ar. 2020)	Amino asitler ve peptitler	Perklorik asit çözeltisi, asetonitril ve metanol karışımı
	Afinite	Kitosan ile kaplanmış poli(stiren-divinilbenzen) (Cong ve ark. 2020)	benzoin	Mixed of water and acetonitrile

Mobil faz seçimi uygulanacak sıvı kromatografisinin tipine bağlıdır. Teorik olarak kullanılabilir mobil fazların kombinasyonu sınırsızdır. Sabit ve mobil faz arasındaki uyumluluk aşaması dikkatlice düşünülmelidir. Mobil faz karışımı birbiriyle tamamen karışabilir olmalıdır. Hareketli faz, durağan faza zarar vermemeli veya çözmemelidir.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Karma Mod Kromatografisi (Mixed Mode Chromatography, MMC)

Sıvı kromatografisi, analiz, tıbbi kimya, tarım, gıda kimyası ve biyoanaliz gibi çeşitli ayırma biliminde ki uygulamalarla dünyanın en çok gelişen alanlarından biridir. Bu araştırma kimyasal bileşiklerin etkili ve iyi bir ayırımı için gereken uygun koşulları belirlemeyi amaçlamaktadır. Ayırma sürecinde optimum kromatografik koşulların şartların seçilmesinde, uygun sıvı kromatografi modu ve mobil faz özelliklerinin araştırılması (pH, organik değiştiricinin türü, mobil faz katkısı vb.) birincil öneme sahiptir (Taraji ve ark. 2018)

Kromatografik alıkonma süreçleri: normal faz, ters faz, iyon değişimi, hidrofobik etkileşim, hidrofilik etkileşim ve metal koordinasyon kromatografisi gibi birçok türe ayrılabilir. Bu kromatografik yöntemler tek modlu kromatografi olarak bilinir, çünkü ayrılan maddeler tek bir tutma mekanizmasına bağlı olarak ayrılır. Örneğin ters faz kromatografik analiz sırasında polaritesi yüksek (veya yüklü) bileşiklerin analizinde sorunlarla karşılaşılabilir. Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) polar bileşiklerin analizi için tasarlanmıştır; fakat yüksek miktarda kullanılan organik çözücü, düşük çözünürlük, alıkonmayı etkileyen numune matrisi ve kontrol edilebilen hidrofobik analitlerin miktarı gibi bir dizi zorlukla karşılaşılır. İyon değişim kromatografisi yüklü moleküller için kullanılabilir, ancak nötr analitler için kullanılamaz. Bu nedenle bazı sorunları çözmek için diğer mekanizmaların her biri ile ilişkili olan karma mod kromatografisi (MMC) kullanılabilir (Taylor ve ark. 2014).

Karma mod kromatografisi (MMC), çözünen madde ile sabit faz arasında bir veya daha fazla etkileşim türü ile kromatografik ayırımın gerçekleşmesini içeren bir kromatografi türüdür. Karma mod kromatografisi tek modlu kromatografiye nazaran aynı anda sabit faz üzerinde hidrofobik ve iyonik gruplar gibi farklı fonksiyonel gruplara sahip maddelerin hareketine olanak tanır (Zhang, 2016). Karma mod kromatografisi yeni bir teknik değildir. Birçok kromatografik matrisler, selüloz, agaroz, poliakrilamid veya silika jel yüzeylerinde belirli etkileşimler sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir. Çözünen örneklerde biyolojik olarak yaygın bulunan nükleik asitler, peptitler, proteinler ve amino asit gibi çok sayıda farklı fonksiyonel gruba sahip maddeler ise karma mod kromatografisinde tek modlu kromatografiye göre farklı bir davranış sergileyecektir (Wan, 2021).

Son zamanlarda, farmasötik ve biyofarmasötik uygulamalarda verimi, seçiciliği ve çeşitli bileşiklerin yeterli tutulması -özellikle polar ve yüklü moleküller- sebebiyle MMC'e olan ilgi geleneksel kromatografiye alternatif veya tamamlayıcı bir teknik (ters faz, iyon değişim ve normal faz) olarak artış göstermektedir. Seçicilik, daha iyi tutma ve ayırma özelliklerini artırmak için çeşitli karma modlu sabit fazlar tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Buna ek olarak, karma modlu sabit fazın çeşitliliği analit yapısının çeşitliliğine ve özelliklerine bağlıdır. Biyolojik aktif maddelerin daha iyi ayrılması ve saflaştırılması için gelecekte karma mod uygulamalarının artması beklenen bir durumdur.

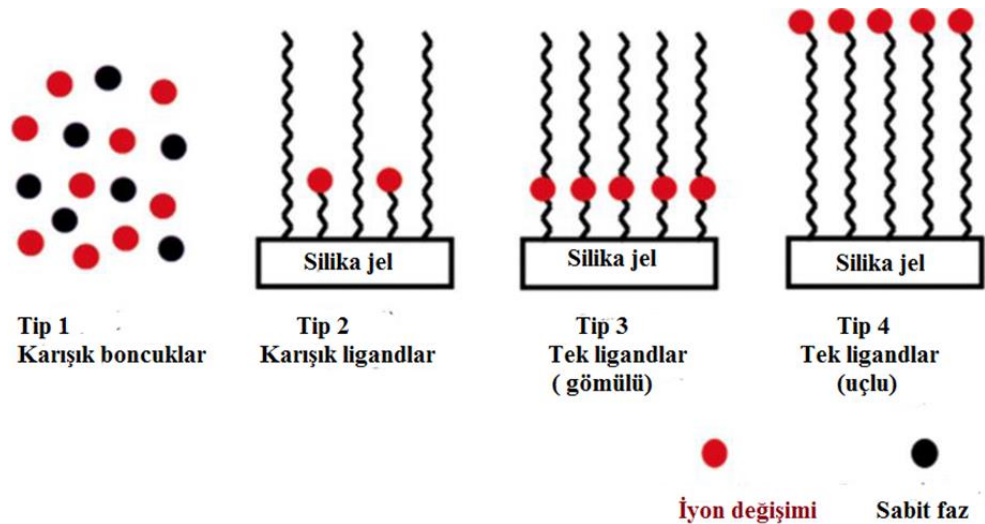
2.2.Karışık mod kromatografisinin mekanizmaları

2.2.1.Sabit fazlar ile ilgili mekanizmalar

2.2.1.1.Kimya tasarımına göre durağan fazların sınıflandırılması

MMC'lerde, çeşitli sabit türler kullanılarak farklı mekanizmalar içeren aşamalarla sabit fazlar hazırlanmıştır. Çalışma tasarımına göre, karma mod durağan fazlar dört kategoriye ayrılabilir (Taylor ve ark. 2014, Zhang, 2016).

Tip 1: Sabit faz ve parçacıkları (her biri tek bir kimyaya sahip) tek bir sütun içerisinde iki tip fazı birleştirerek karma modlu sabit faz oluşturulur (Şekil 2.1). Ancak, bu yaklaşımın en büyük dezavantajları, durağan fazların homojen olmaması ve tekrar edilebilirliğinin düşük olması.



Şekil 2. 1 Kimya tasarımlarına göre sınıflandırılan karma modlu durağan fazlar türleri (Liu, 2010).

Tip 2: Sabit fazın yüzeyi, farklı bir kimyasal ligand karışımı ile değiştirilir. Bu ikinci nesil bir yaklaşımdır, ancak dezavantajları Tip 1'e benzer. Bu nedenle, Tip 1 ve 2 yaygın olarak kullanılmaz, çünkü performansları sınırlıdır

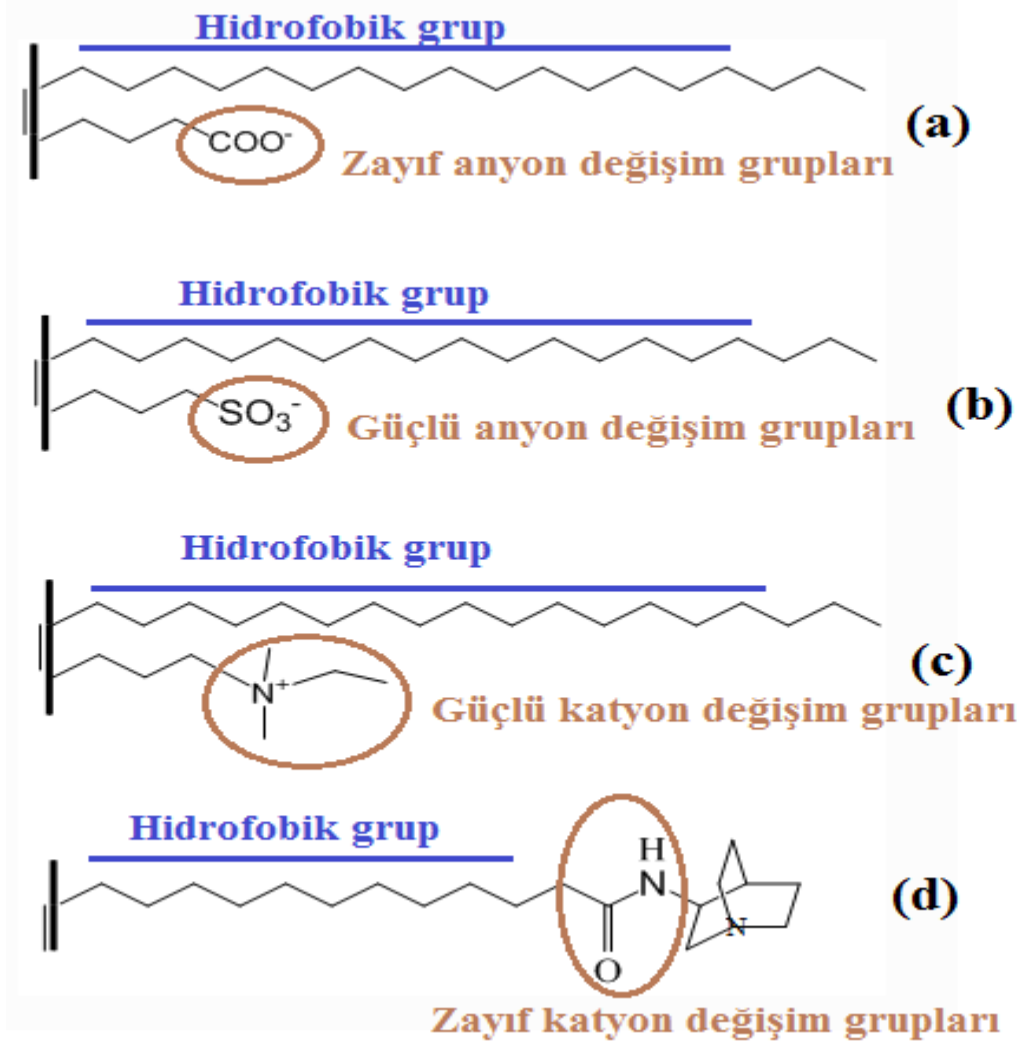
Tip 3 ve 4: Gömülü (Tip 3) ve serbest ligandlar (Tip 4) üçüncü nesil karma modlu sabit fazlardır ve bunların tekrarlanabilirliği ve homojenliği fazladır. Ligandın gömülü olduğu sabit fazlarda fonksiyonel gruplar (polar veya iyonik gruplar) gözenek yüzeyine yakındır ve ligandların hidrofobik kısımları mobil faza uzanır. Buna karşılık, uçta serbest ligandların olduğu sabit fazlarda zincir uçlarında fonksiyonel gruplar bulunur (Ngoc-Van, 2022).

2.2.2. MMC'de Ayırma Modlarının Kombinasyonları

2.2.2.1. Ters Fazlı İyon Değişimi Sabit Sazlar (RP-IEEX)

Biyolojik olarak aktif moleküller, doğal ürünler ve ilaç gibi polar bileşikler birden fazla fonksiyonel grup içeren metabolitler, vücutta zayıf bir şekilde tutulma eğilimindedir. Bunların ters faz ayırımı iyi değildir. Hidrofobik kombinasyonu ile karışık modlu sabit fazlar iyon değişim mekanizmalarını, hem hidrofobik hem de polar bileşiklerin tutulmasını ve seçiciliğini iyileştirilir (Wan, 2021). Buna ek olarak, MMC'de sabit fazlar esas olarak peptitler, nükleotitler, temel ilaçlar ve bunların metabolitlerini ayırmada kullanılır. Sabit fazın üzerindeki ligandlar şu kısımlardan oluşur: hidrofobik kısım (alkil zincirleri veya aromatik hidrokarbonlar) ve hidrofobik kısmın sonunda, ortasında veya yakınında bulunan gömülü iyonik kısım. İyonik kısmın yapısına bağlı olarak dört iyon değişim modu sınıflandırılabilir : kuaterner aminler güçlü katyon değişim grupları (SCX) olarak kullanılır; birincil, ikincil veya üçüncül aminler zayıf katyon değişim grupları (WCX) olarak kullanılır; sülfonik asitler güçlü anyon değişimi gruplar olarak kullanılır (SAX); ve karboksil grupları, zayıf anyon değişim grupları olarak kullanılır (WAX) (Şekil 2.1) (Eric ve ark. 2011). Karma mod sabit fazın analitleri tutma mekanizması, hidrofobik ve zıt yüklü iki değerlikli bir kompleksin oluşumu üzerinden ilerler. Ayrıca, aynı yüklü fonksiyonel gruplar ile birbirini itme sonucu oluşan iyonik etkileşimler karma mod sabit fazlarda analitin tutunmasını da etkiler. Böylece ayırma gücü pH, iyonik güç, (tamponların ve değiştiricilerin konsantrasyonu dahil) ve çözücü gücü gibi mobil faz parametreleri ayarlanarak optimize edilebilir (Wan, 2021). Örneğin, belirli koşullar altında C18/SAX sütunu, asidik bileşiklerin elektrostatik çekimi nedeniyle güçlü bir şekilde tutunmasına neden olur. Ayrıca, tutunma oranı analitlerin alkil zincir uzunluğunun artmasıyla artar.

Asidik bileşikler yüksek oranda organik çözücü içeren ve/veya yüksek iyon kuvvetine sahip mobil faz ile asidik koşullar kullanılarak nötr hale getirilip hidrofobik etkileşimler zayıflatılarak elüe edilebilir. Nötr bir pH ve düşük iyon kuvvetine sahip mobil fazlar kullanıldığında ise peptitler ve alkaloidler gibi bileşiklerin sabit fazda tutunmasını hidrofobik etkileşimler daha baskın bir şekilde etkiler (Lemasson ve ark. 2018).



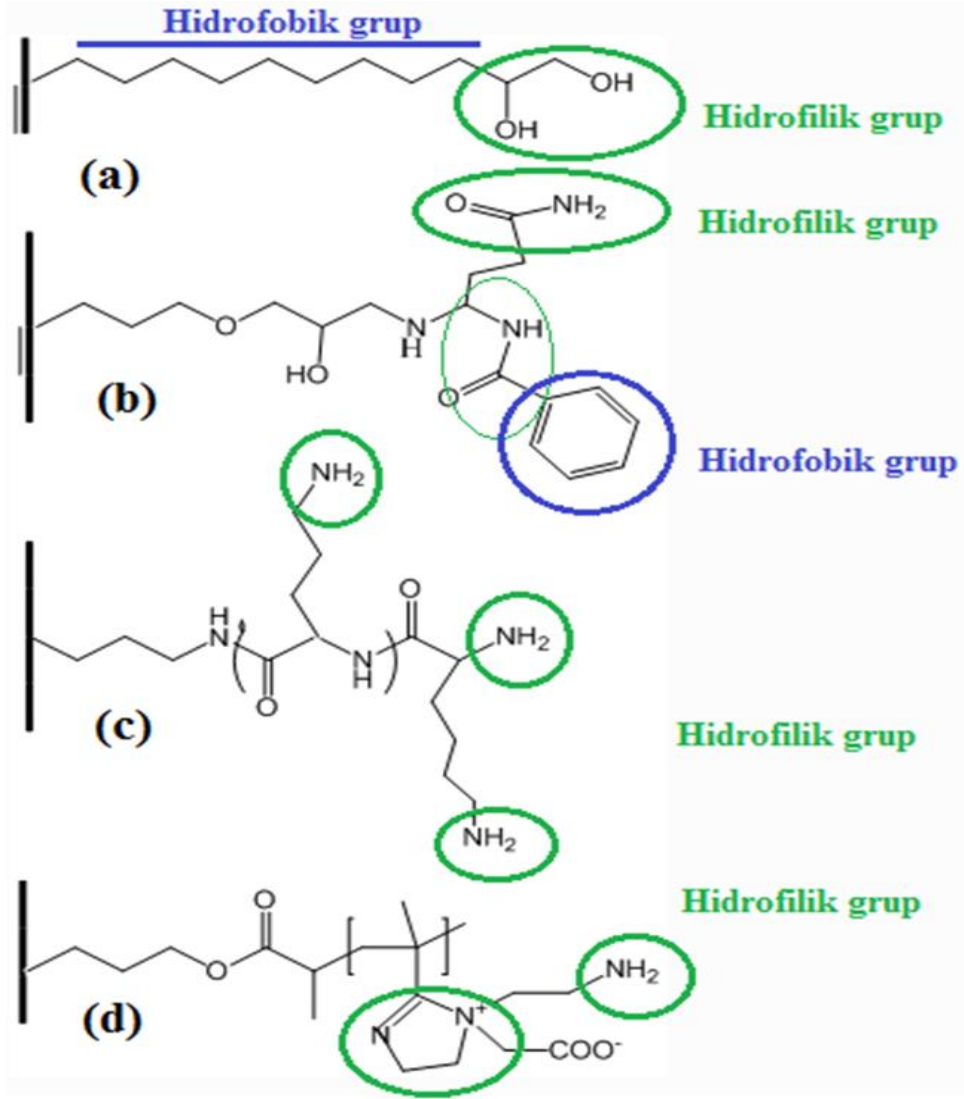
Şekil 2. 2 Bazı RP-IEX karma modlu durağan fazların yapıları: (a) RP-WCX, (b) RP-SCX, (c) RP-SAX ve (d) RP-WAX (Eric ve ark. 2011).

Karma mod ters faz/iyon değişimi sabit faz alanında RP/AX karma modlu, etilen köprülü hibrit (BEH) organik/inorganik bazlı Atlantis BEH C18 AX isimli sabit faz yakın zamanda geliştirildi. C18 ara yüzeyine sahip (üçüncül alkilamin gruplarıyla birlikte $1,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) BEH C18 AX, yüksek oranda sulu mobil fazlar ile uyumludur. BEH parçacıkları BEH C18 AX sabit faz için kullanılır, ortalama 95 \AA gözenek çapına sahiptir ve %46 daha yüksek yüzey alanına sahip olduğundan tutunmayı artırır. Üstelik, hidrofilik anyon değişim grubu, pozitif yüzey yükü oluşturur, bu da pH 3,0-6,9

tamponlarla kullanıldığında, daha geniş bir pH aralığında negatif yüklü bileşiklerin daha güçlü tutulmasını sağlar. BEH C18 AX' in üst pH limiti daha geniş bir pH aralığına sahip hareketli fazın kullanılmasına izin verir. İyonize olabilen analitlerin RP ayırımlarını yapabilmeye hareketli fazın pH'ının kilit nokta olduğu kanıtlanmıştır (Walther ve ark.2021, Kadlecová ve ark. 2021).

2.2.2.2. Hidrofilik iyon değişimi sabit fazlar (HILIC-IEX)

Hidrofilik ve iyon değişim gruplarının kombinasyonu yüklü polar bileşiklerini analiz etmek için güçlü avantajlar sağladı. Karma fazlı modun bu çok yönlü ayırma etkisi peptit analizi için benzersiz seçicilik ve daha yüksek tutunma oranı ile herhangi bir tek modlu fazdan daha geniş bir uygulama aralığı sağlar (Mant ve ark. 2008). Bu kombinasyonun ana uygulaması, proteinlerin ve peptitlerin ayrılmasıdır. Bu modda, polar bileşiklerin tutma mekanizması, mobil fazdaki asetonitril (ACN) gibi bir organik çözücünün yüzdesine bağlıdır. Bir hareketli fazın düşük bir organik çözücü yüzdesi varsa, analit tutulmasına iyon değiştirme mekanizmaları hakimdir. Asetonitril yüzdesindeki bir artış, iyonik olanlardan daha fazla hidrofilik etkileşimi teşvik ettiği görülür. Yüksek asetonitril konsantrasyonunda, elektrostatik etkileşimler önemli ölçüde azalırken, analitin sabit faz üzerinde tutunmasında hidrofilik etkileşimler baskın olmuştur . Bo ve çalışma arkadaşları, nükleositleri ve β -agonistleri ayırmak için iki fonksiyonel monomerin karışım oranı kontrol edilerek sentezlenen ayarlanabilir seçiciliğe sahip bir HILIC-IEX fazı hazırladı (Bo ve ark.2017). HILIC-IEX durağan fazlar geliştirmek için iyonik sıvıların kullanılması, elektrostatik, dipol-dipol ve π - π etkileşimleri ve hidrojen bağı gibi çoklu etkileşimler için bir ortam sağlayabilir. Quiao ve çalışma arkadaşları nükleositleri ayırmak için glukaminyum bazlı iyonik sıvılar kullanarak yeni bir HILIC-SAX fazı geliştirdi [18]. Mant ve ark (Mant ve ark. 2008), hidrofilik katyon değişim kolonunun(HILIC-CEX) peptit analizi için RP-LC'den daha yüksek bir ayırma verimine sahip olduğunu ve yüksek yüklü peptitlerin en iyi bu kolon tarafından tutulduğunu kanıtladı (Mant ve ark. 2008). Hartmann ve ark. (Hartmann ve ark. 2003) Bir HILIC-CEX kolonu ve bir RP-LC kolonu kullanarak amfipatik α -sarmal peptitleri ayırdı. Her iki sabit faz da yeterli bir verimlilik sundu ancak farklı seçicilikler sergiledi. HILIC-CEX kolonu ile, sıcaklığın peptit kolonlarının ayrılması üzerinde RP-LC kolonuna göre daha güçlü bir etkisi oldu. Bu sonuçlar, HILIC-CEX fazında peptitlerin hem çözünürlüğünün hem de tutulmasının sıcaklığın artmasıyla önemli ölçüde iyileştiğini gösterdi (Hartmann ve ark. 2003).



Şekil 2. 3 (a) diol, (b) amid ve (c) amin polar grupları ile bazı RP-HILIC karışık mod durağan fazların yapıları (Eric ve ark. 2017)

2.2.2.3. Diğer Kombinasyonlar

İnklüzyon hidrofobik karışık mod: Ligandlar, analitler ile bir inklüzyon kompleksi oluşturan hidrofobik kısımlardan ve boşluklardan, kafeslerden veya kriptatlardan oluşur. Bu nedenle, bu modun çok yönlü etkileri hem inklüzyon kompleksleşmesini hem de hidrofobik etkileşimleri sağlamasıdır. Bu kombinasyonun temsili bir örneği katı bir matris üzerinde tutturulmuş taç eter. Taç eterin altı oksijen atomu ile protonlanmış birincil aminin üç hidrojen atomu arasında üçlü bir hidrojen bağı oluşabilir. Bu nedenle, bu ligandları tutmak ve ayırmak için birincil aminler veya diğer protonlanmış moleküller kullanılabilir. İlaveten, taç eter üzerindeki metilen ile analitlerin alkil zinciri arasında hidrofobik etkileşimler oluşabilir, bu da analit retansiyonunun iyileşmesine neden olur (Wan, 2021).

Dahil etme hidrofilik karışık mod: Bu modda ligandlar bir boşluk, kafes veya kriptat ve bir polar gruptan oluşur. Bu kromatografi işleminin bir örneği taç eterlerin birincil aminlerle bağlanmasıdır. Birincil aminler ve taç eter arasındaki hidrojen bağı, polar bir organik çözücü içeren hareketli faz ile güçlendirilebilir, bu da artan inklüzyon etkilerine yol açar.

π - π hidrofilik karışık mod: Ligandlar iki grubun birleştirilmesiyle tasarlanır: bir π -elektron verici veya π -elektron alıcı grup ve bir polar grup. π - π etkileşimlerinde, elektronca zengin π sistemi (π -elektron donörü), elektron eksikliği olan π sistemi veya diğer π -elektron alıcı grupları ile elektrostatik etkileşimler yoluyla etkileşime girebilir. Bu kromatografi işleminde, π elektronlarına sahip ligand grupları, π elektronlarına sahip analit grupları ile π - π etkileşimi yapabilir ve ligandların polar kısımları, dipol-dipol etkileşimleri ve/veya hidrojen bağı yoluyla analitlerin polar kısımlarıyla etkileşime girebilir. Bu kombinasyonun ana uygulaması, kiral bileşiklerin ayrılmasıdır. Bu modun bir örneği Pirkle tipi kromatografi ligandlarıdır (Pirkle ve ark 1989).

π - π iyon değişimi karma modu: Bu modda, durağan faz π - π etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimleri, van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimler yoluyla analitlerle etkileşime girebilir. Bu kombinasyonun temsili bir örneği, Lämmerhofer M ve Lindner W tarafından geliştirilen kınakına alkaloid türevi sabit fazıdır. Türevlerin yapısına bağlı olarak, bu sabit faz, anyon değişimi, katyon değişimi ve amfoterik kiral kromatografi iyon değişimi gibi birçok ayırma türü sergileyebilir. Bu nedenle, bu fazın ana uygulaması, kiral asitlerin, çok çeşitli polaritelere sahip iyonik kiral bileşiklerin ve amino asitler ve küçük peptitler gibi amfoterik bileşiklerin ayrılmasıdır. Özellikle, amfoterik iyon değişimi aynı zamanda çok işlevli sabit bir fazın bir örneği olarak da düşünülebilir çünkü bu ligand bir polar organik mobil fazın koşulları altında kiral ayırma için üç iyon değişim modu sunabilir. Bu nedenle, kiral asit ayırımı için anyon değiştirme modu, kiral amin ayırma için katyon değiştirme modu ve amfoterik bileşik ayırma için zwitter iyonik modu kullanılır (Lämmerhofer ve ark. 1996).

Polimerik karışık mod: Birkaç yeni polimerik MMC sorbenti, özellikle serum albüminleri ve immünoglobulinler (IgG'ler) olmak üzere proteinlerin ayrılması için özel olarak tasarlanmıştır. Heterosiklik bileşikler; bazı proteinler, albüminler, ayrıca antikolarlar ve monoklonal antikolarla nispeten seçici olarak etkileşime girme kabiliyetine sahip olmaları ve alifatik ve aromatik bileşiklerle karşılaştırıldığında

spesifik aromatik/hidrofobik etkileşimleri sayesinde iyi bir ayırma özelliğine sahip MMC ligandları olarak eşsiz davranış gösterirler(Sýkora ve ark. 2009).

Kılcal kanallı polimer (C-CP) fiber sabit fazlar: C-CP'nin benzersiz şekli onlara yüksek yüzey alanı verir ve kolonlar halinde paklendiğinde, lifler kendiliğinden hizalanarak 1-5 µm boyutunda paralel kanallara sahip monolit benzeri bir yapı sağlar. Proteinlerin boyutuyla ilgili olarak, C-CP liflerinin yüzeyi gözeneksizdir ve bu da kütle transfer direncini önemli ölçüde azaltır. Böylece ayırma, ayırma verimliliği üzerinde olumsuz bir etki olmaksızın yüksek doğrusal hızlarda ve düşük basınçlarda gerçekleştirilebilir. Çalışılan tüm C-CP sabit fazlarının, bir BSA/hemoglobin/lizozim karışımını yüksek akış hızında ve kabul edilebilir elüsyon özellikleriyle ayırabildiği görüldü (Sýkora ve ark. 2009).

2.3. Mobil fazların bileşimi ve karma mod kromatografi üzerindeki etkileri

2.3.1. Polar organik çözücüler

Karışık mod kromatografisinde kullanılan mobil faz genellikle bir polar organik çözücü, su veya bir tampon içerir. Çözücünün aşağıdaki dört özelliğinin analitlerin tutulması ve ayrılması üzerinde önemli etkileri vardır: çözücü viskozitesi, dielektrik sabiti, dipol momenti ve yüzey gerilimi. Çözücü viskozitesi, özellikle gradyan koşulları kullanıldığında kromatografi sürecini çeşitli şekillerde etkiler. İlk olarak, hareketli fazın viskozitesindeki bir artış, basıncın artmasının başlıca nedenidir. Ayrıca, kolon verimliliği, mobil fazın viskozitesinden etkilenir. Örneğin, karışık bir metanol ve su çözeltisi, saf metanolden daha yüksek bir viskoziteye sahiptir. Sonuç olarak, çözünen maddelerin difüzyon katsayısını azaltır ve yavaş bir kütle transferi sergileyerek kolon veriminde bir azalmaya yol açar (Snyder ve ark. 1997). Dielektrik sabiti (ϵ) ve dipol momenti (μ) çözücünün polar doğası karakterize eder. Daha yüksek ϵ değerine sahip bir çözücü genellikle ters fazlı kromatografide daha zayıf bir eluent olarak kabul edilirken dipol momenti çözücü polaritesi ile ilgilidir ve hidrofilik kromatografide analitler ve ligandlar arasındaki etkileşimler üzerinde önemli etkilere sahiptir. Son olarak, bir çözücünün yüzey gerilimi analit ayrılmasını etkileyebilir. Daha yüksek yüzey gerilimine sahip bir mobil faz daha güçlü analit tutulmasına yol açabilir. Ek olarak, analitlerin konsantrasyonunu ölçmek için bir UV-Vis dedektörü kullanıldığında çözücünün UV dalga boyu kesme değeri de dikkate alınmalıdır (Lee, 2011).

RP-IEX karışık mod kromatografisinde, güçlü eluotropik bileşenler olarak polar organik çözücüler (metanol, asetonitril, etanol ve tetrahidrofuran gibi) kullanıldı.

Ayrıca, organik çözücüler, kromatografi işleminde analitlerin tutulmasını ve elüsyonunu kontrol edebilir, böylece analitlerin mobil fazdaki çözünürlüğünün artırmasını sağlar. Organik çözücü konsantrasyonundaki bir artış, mobil fazın polaritesinin azalmasına neden olur ve analitler ile ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimler azalır, bu da alıkonmada bir azalmaya neden olur. Eluotropik kuvvete göre çözücülerin sırası su < metanol < asetonitril < propanol < izopropanol < tetrahidrofurandır (Snyder ve ark. 1997). En yaygın olarak kullanılan polar organik çözücüler metanol ve asetonitrildir (ACN). Peptidleri ve proteinleri analiz etmek için, metanol yerine asetonitril tercih edilir, çünkü asetonitril ve sudan oluşan karışık çözelti, mükemmel kütle transferine yol açan düşük bir viskoziteye sahiptir.

HILIC-IEX kromatografisinde yaygın olarak organik çözücüler ve tamponlardan oluşan ikili bir karışım kullanılır. Organik çözücü konsantrasyonunda ki bir artış, mobil fazın polaritesini azaltabilir, bu da analitler ve ligandlar arasındaki hidrofilik etkileşimin güçlenmesine yol açar. Buna karşılık, organik çözücü konsantrasyonunun azaltılması hidrofilik etkileşimleri zayıflatabilir, iyonik etkileşimleri kolaylaştırabilir ve bileşik elüsyonuna yol açabilir. Böylece, organik çözücü bir polarite değiştiricisi olarak hareket eder. En yaygın olarak kullanılan çözücülerden biri asetonitrildir (Wan, 2021). Asetonitril, hidrojen bağı donör kapasitesine sahip olmayan aprotik bir çözücü olduğundan, ligandlar için analitlerle rekabet edemez. Hareketli faz yüksek seviyede asetonitril içeriyorsa, analitler polar etkileşimler yoluyla sabit fazlara adsorbe edilebilir ve asetonitril içeriği azaltılarak emilebilirler. Bu nedenle, HILIC-IEX karma modunda asetonitril, analitlerin tutulması ve ayrılması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek asetonitril seviyelerinde (%90'a kadar, v/v), hidrofilik etkileşimler elektrostatik etkileşimlere hakim olabilir ve bu, analit tutulmasını etkileyen ana faktör haline gelebilir. Ayrıca, karışık mod durağan faza güçlü bir şekilde bağlanan ve hidrofobik etkileşimlerden önemli ölçüde etkilenen proteinleri ayırtmak için, organik çözücü içeriğini artırarak hareketli fazın polaritesini azaltmak, tuz konsantrasyonunu azaltmak yerine şiddetli bir elüsyon yöntemi olarak kullanılabilir.

2.3.2. Tamponlar ve pH

Karışık mod kromatografisinde, pH'ı hemen hemen sabit bir değerde tutmak veya pH değerini ayarlamak için genellikle mobil faza tamponlar eklenir. İstenilen pH

aralığına bağılı olarak tampon sistemleri seçilebilir. Tampon sistemler bileşenlerine göre iki kategoriye ayrılır.

Tip 1: Bir tampon sistemi, zayıf bir asit ve onun eşlenik bazından veya zayıf bir baz ve asit asetik/sodyum asetat ya da amonyum klorür gibi onun eşlenik asidinden oluşur. Örneğin, anyon değişimli karışık mod kromatografisinde asetat tamponları kullanıldığında, CH_3COO^- pozitif yüklü ligandlara bağlanarak iyon değişim sürecine katılabilir. Bu nedenle, ligandlarla aynı yüke sahip tampon iyonlarına sahip bir tampon sistemi, iyon değiştirme mekanizmalarını içeren karışık mod kromatografisi için idealdir. Bir anyon değiştirme mekanizması (pozitif yüklü ligandlara sahip) kullanılırken pozitif yüklü iyonlar içeren tamponların ve katyon değiştirme mekanizması için negatif yüklü iyonlar içeren tamponların tercih edilmesi önerilir.

Tip 2: Bu tampon sistemi, hem anyon değiştirme hem de katyon değiştirme kromatografisinde kullanılabilen bir organik amin veya amfoterik bileşik içerir. Böyle bir tampon sisteminin örnekleri, N-2-hidroksietilpiperazin-N-2'-2-etansülfonik asit (HEPES) ve N,N-dihidroksietilglisindir (BICINE).

Mobil faz pH'ı, analitlerin yüklü özelliklerini ve ligandların doğasını etkileyebilir; bu nedenle, hedef bileşiklerin adsorpsiyonunu ve elüsyonunu teşvik etmek için kullanılabilir (Lee, 2011). Mobil faz için uygun bir pH değeri seçmek için belirli kurallar geçerlidir. Öncelikle ideal pH, analitlerin pKa'sına ve ligandların iyonik gruplarına göre seçilmelidir. Örneğin, amin gruplarına sahip bir hedef bileşik, pH değeri pKa'sından daha düşük olduğunda pozitif olarak yüklenecek ve böylece katyon değişim ligandları tarafından adsorpsiyona neden olacaktır. Genel olarak, adsorpsiyon işlemi için, pH analitleri şarj edecek ve analitler ile zıt yüklü ligandlar arasındaki elektrostatik etkileşimleri kolaylaştıracak şekilde seçilmelidir. Bu nedenle, adsorpsiyon bir katyon değişim ligandında gerçekleştirildiğinde pH, analitlerin pKa değerinden yaklaşık 1-2 pH birimi daha düşük olmalı, anyon değişim ligandında gerçekleştiğinde ise pH, ligandların üzerindeki birimlerin pKa'sından yaklaşık 1-2 pH daha yüksek olmalıdır. Buna karşılık, elüsyon işlemi için pH, hedef bileşikler ve ligandlar arasındaki etkileşimi yük itme yoluyla zayıflatacak veya bozacak şekilde ayarlanmalıdır. İkinci olarak, hareketli fazın pH'ı, sabit fazın kararlılık aralığı içinde olmalıdır. Son olarak, protein analizi için proteinlerin stabil olduğu ve biyolojik aktivitelerini koruduğu bir pH değeri seçmek gereklidir (Wan, 2021).

İyon değiştirme mekanizmalarını içeren karma modlu kromatografide, zayıf asidik ve bazik ligandların yüklü özellikleri pH değerinden önemli ölçüde etkilenebilir. Örneğin, hareketli fazın pH'ı ligandın pKa'sından daha yüksek olduğunda karma mod durağan faz zayıf bazik gruplar içeriyorsa, ligand nötr olarak yüklenir ve hidrofobikliği artar. Buna zıt olarak, ligand pozitif yüklü ve pH ligandın pKa'sından düşük olduğunda yüksek bir hidrofilikliğe sahiptir. Elüsyon aşamasında, üzücü polaritesindeki değişiklik ve iyonik kuvvetteki değişiklik, ayırma verimliliğinde hiçbir gelişme sağlamadığında, daha yüksek bir ayırma seçiciliği elde etmek için pH gradyan değişiklikleri kullanılabilir. pH değiştirilerek analitler ve ligandlar aynı yüke sahip olabilir; bu nedenle, analitler yk itme ile ayrıştırılabilir. Örneğin, Hostein ve ark. (Holstein ve ark. 2012), pI'leri (proteinin izoelektrik noktası) sırasıyla 4.5, 5.1 ve 4.5 olan α -Laktalbmin, β -laktoglobulin A ve tripsin inhibitörü, pH 3.8 ila 8.0 doğrusal bir pH gradyanı kullandılar.

Örneğin, Hostein ve ark.(Holstein ve ark. 2012), pI'leri (proteinin izoelektrik noktası) sırasıyla 4.5, 5.1 ve 4.5 olan α -Laktalbmin, β -laktoglobulin A ve tripsin inhibitörü, pH 3.8 ila 8.0 (0.05 pH birim/dakika) doğrusal bir pH gradyanı kullanılarak çok modlu katyon değiştirici Capto MMC'de ayrıldı. Mobil fazın pH değeri pI'lerinden daha yüksek olduğunda, bu proteinler ligandlarda olduğu gibi negatif olarak yüklendi ve elektrostatik itme ile ayrıştırıldı. pH değeri pI'lerden ne kadar uzaksa, bu proteinler o kadar negatif yüklüdür ve bu da daha güçlü hidrofilikliklerine yol açar. Daha sığ bir gradyanın (0,05 pH birim/dk ila 0,01 pH birim/dk) tepe noktalarının keskinliğini azalttığı ancak protein znrlğn iyileştirdiği gözlemlendi.

2.3.3. Tuzlar

MMC'lerde, iyonik güçlerini ayarlamak için genellikle mobil faza tuzlar eklenir. Sodyum klorür genellikle iyon değiştirme modunda kullanılırken, hidrofilik modda organik zclerde (sodyum perklorat ve amonyum perklorat gibi) daha yüksek znrlğe sahip tuzlar tercih edilir. Hidrofobik modda, tuzlar tuzlama ve tuzlamama gibi iki kategoriye ayrılır: Sodyum sülfat, amonyum sülfat ve potasyum sülfat gibi tuzlama tuzları, proteinleri stabilize etmek ve proteinler ile ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimleri desteklemek için kullanılabilir. Buna karşılık, kalsiyum klorür, magnezyum klorür ve çinko nitrat gibi tuzlama tuzları, proteinlerin sudaki

çözünürlüğünü artırabilir ve protein denatürasyonunu ve açılmasını teşvik edebilir (Kang ve ark.2020).

Mobil fazın iyonik kuvveti, hem iyon değişimi hem de hidrofobik modlarda analitlerin tutulması ve elüsyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İyon değiştirme mekanizmalarını içeren karma mod kromatografisinde, iyon kuvvetindeki artış, analitler ve ligandın yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşimi baskılayabildiğinden, ligandlar üzerindeki analitin bağlanmasının zayıflamasına ve dolayısıyla analit retansiyonunda veya elüsyonunda bir azalmaya neden olur (Lee, 2011). Ayrıca, hidrofobik modda, mobil fazın iyon kuvvetindeki artış, ligandların hidrofobik bağlanma becerisinin güçlenmesine neden olarak, analitlerin daha güçlü tutunmasına yol açabilir. Hidrofobik-karma modlu durağan fazlar tipik olarak protein ayrımı için kullanılır. Bu modda, proteinler yüksek tuz konsantrasyonlarında adsorbe edilir ve düşük tuz konsantrasyonlarında ayrılırlar. Bu nedenle, proteinlerin ayrılmasında mobil fazdaki tuz konsantrasyonunun azaltılması uygun elüsyon koşullarını sağlamada kullanılabilir (Wan, 2021).

2.3.4. Diğer Katkı Maddeleri

Protein ayrımı için, proteinler pH değiştirilerek veya mobil fazın polaritesi veya iyon kuvveti azaltılarak kolaylıkla ayrılabilirler. Bununla birlikte, proteinler liganda sıkıca bağlandığında, elüsyon adımı sırasında proteinin geri kazanımı ve biyolojik aktivitesi düşebilir. Bu nedenle, polaritesini azaltmak için genellikle mobil faza katkı maddeleri eklenir, bu da ligandların hidrofobik kısımlarına protein bağlanmasının zayıflamasına neden olur ve gelişmiş bir protein geri kazanımına yol açar. Yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinden bazıları ve işlevleri Tablo 2.1'de listelenmiştir.

2.4. Karışık Modlu Sabit Fazların Farmasötik Analiz Uygulaması

2.4.1. İlaçlar ve ilaçlardaki Safsızlıklar

%50 hidrofobik C18 fazı ve %50 güçlü katyon değiştiriciden oluşan sabit bir faza sahip karma modlu bir kolon, iyonik ve hidrofobik analitlerin aynı anda analizine izin verir (Bergqvistve ark. 200). İlaç incelenmesi için hareketli faz pH'ına bağlı olarak iyonlaşan asetaminofen ve ilgili safsızlıkları, genellikle organik yüklü bileşikler için bir teknik olan iyon çifti kromatografisi kullanılarak ayrılır. Sayısız avantajlarına rağmen, çok sayıda karşı iyonun kolonun durağan fazı üzerindeki aşındırıcı etkisi, iyon çifti kromatografisinin pratik bir dezavantajıdır.

Tablo 2. 1 Karışık mod kromatografi işleminde yaygın olarak kullanılan katkı maddeleri.

Katkı maddesi	Fonksiyonu	Mekanizma	Referans
Magnezyum klorür	Proteinlerin geri kazanımının iyileştirilmesi ve biyolojik aktivitesinin sürdürülmesi	Protein çözünmesini teşvik etmek	(Durkee ve ark. 1993)
Etilen glikol	Hidrofobik etkileşimlerin azaltılması	Elektrostatik etkileşimlerde hafif bir artışa neden olur	(Hou ve ark. 2011)
Gliserol	Stabilize edici proteinler	Protein açılmasını inhibe etme	(Vagenende ve ark. 2009)
Üre	Hidrofobik ve hidrojen bağı etkileşimlerini etkiler	Proteinlerin polar yan zinciri ve omurgası ile etkileşime girme	(Zheng ve ark. 2016)
Arginin	Elektrostatik etkileşimleri ve hidrojen bağı azaltmak	Proteinlerin polar yan zinciri ve aromatik kısımları ile etkileşim	(Hirano ve ark. 2019)
Kaprilik asit	Proteinlerin tutulmasında büyük bir düşüşe neden olur	Aynı zamanda proteinlerin karışık mod ligandlarına bağlanma bölgesi olan bölgeye bağlanma	(Holstein ve ark. 2012)

Sonuç olarak, karışık modlu durağan fazlar, iyon çifti kromatografisinin sınırlamalarının üstesinden gelebilir ve pratik kısıtlamalar olmaksızın iyonik ve nötr organik moleküllerin aynı anda ayrılmasına izin verebilir (Calinescu ve ark.2012).

Tablo 2. 2 İlaç ve safsızlıkta karışık mod sabit fazların uygulanması.

İlaçlar			
Bileşikler	Mekanizmalar	Referans	
Atovaquone, proguanil ve iki ana metaboliti	%50 C18 fazı ve %50 güçlü katyon değiştirici	(Bergqvist ve ark.200)	
Naproxen sodyum ve adenin hidroklorür Hemifumarat tuzu formunda açıklanmayan bir ilaç	CAD dedektörlü Trinity P1 sabit fazı	(Zhang ve ark. 2010)	
İmidazol, pirazol, piridin, piridazin, piperidin	Ters faz ve iyon değişim özellikleri	(Abdighahroudi ve ark.2020)	
Etidronat disodyum [(1-hidroksietiliden) bifosfonat]	CAD dedektörlü Primesep SB kolonu (anyon değişim ters faz kolonu)	(Liu ve ark. 2008)	
Flurbiprofen, flufenamik asit, mefenamik asit, ibuprofen, loxoprofen, ketoprofen, carprofen, indoprofen sulindac	C18-DTT sabit faz (dithiothreitol silika (SiO ₂))	(Wang ve ark. 2016)	
metoprolol, salisilik asit, asetilsalisilik asit, propranolol, betametazon, imipramin, klotrimazol, tioridazin, indometasin flurbiprofen	Ters fazlı sıvı kromatografisi/hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi C18 veya Fenil grubu tarafından modifiye edilmiş iki UHPLC karışık mod hibrit CSH (yükü yüzey hibrit) sabit fazı	(Nováková ve ark.2012)	

Tablo 2.2' nin devamı**Kirlilikler**

Bileşikler	Safsızlık analizi	Mekanizmalar	Referanslar
Parasetamol :asetaminofen	4-Nitrofenol, 4'-kloroasetanilid 4-Aminofenol P-Benzokinon Hidrokinon	Oktadesilsilan/güçlü katyon değiştirici (C18/SCX)	(Calinescu ve ark. 2012)
L-Metionin	N-Asetil-dl-metionin N-Asetil-l-metionil-metionin N-Asetil-l-metionil-dmetionin ve enantiyomerleri L-Metionin-sülfoksit	Ters faz/katyon değişimi	(Kühnreich ve ark. 2016)
Bispesifik IgG	Homodimer safsızlıkları	Karışık mod boyut dışlama kromatografisi (mmSEC)	(Yan ve ark. 2019)

Ayrıca, çoğu ilaçta UV kromoforlarının bulunmaması nedeniyle, kırılma indeksi (RI) ve buharlaşmalı ışık saçılımı saptama (ELSD) dedektörleri kullanılmıştır. Ancak,

bu yaklaşımlar duyarsızdır veya gradyan elüsyonuyla uyumluluk sorunları vardır. Son zamanlarda, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamaları için yeni bir dedektör türü olarak yüklü aerosol algılama (CAD) geliştirilmiştir. CAD, diğer dedektör türlerinden daha yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik ile uçucu olmayan ve yarı uçucu maddeler için evrensel bir analiz tekniğidir. Parametre optimizasyonu gerekliliğini ortadan kaldırdığı için kullanımı oldukça uygundur (Zhang ve ark. 2010). Tablo 2.2, MMC ve CAD dedektörlerinin kombinasyonlarını ve ayrıca ilaçlar ve safsızlıklar için çeşitli MMC tiplerinin uygulamalarını göstermektedir. Bu nedenle, aynı zamanda, belirli bir prosedürde çok çeşitli ilaçları, farmasötikleri ve bunlarla ilgili bileşikleri eşzamanlı olarak belirlemek için uygun bir analitik araçtır (Bergqvist ve ark. 200).

2.5. Metabolomik Uygulamalar

Farmakokinetik çalışmaların ortak bir hedefi, biyolojik bir matriste çok çeşitli ilaçların eşzamanlı olarak gözlemlenmesi için bir biyolojik analiz yönteminin geliştirilmesidir. MMC'lerde ters faz ve iyon değişim kromatografisinin birlikte kullanımı, tek bir çalışmada polar ve polar olmayan küçük moleküllerin tutulması konusunda olumlu sonuçlar göstermiştir (Hsieh ve ark. 2007). Ek olarak, yukarıdaki bileşiklerin etkili tutunması ve ayrılması, yaygın ve MS/RP koşulları altında elde edildi ve yüksek bir seçicilik ve hassasiyet noktasına ulaşılmıştır.

Tablo 2.3 Karışık mod durağan fazların metabolik uygulaması

Metabolitler	Matrisler	Mekanizmalar	Referanslar
Sitarabin (ara-C)	fare plazması	Ters faz/iyon değişimi	(Hsieh ve ark. 2007)
Trimetilamin N-oksit (TMAO) Beta-metilamino-Lalanin (BMAA) 2,4-Diaminobütirik asit (DAB)	Plazma ve idrar	Ters faz/kasyon değişimi	(Roverso ve ark. 2020)
S-Propargil-sistein (SPRC)	sıçan plazması	Ters faz/kasyon değişimi	(Zheng ve ark. 2011)
fosforile karbonhidratlar	--	Ters faz/zayıf anyon değişimi, şarjlı bir aerosol dedektörü ile birlikte	(Hinterwirth ve ark. 2010)

Bu nedenle, MMC/kütle spektrometrisi, metabolik analizde yaygın olarak uygulanmaktadır. Örneğin, Roverso ve ark. (Roverso ve ark. 2020) 2,4-diaminobütirik asit (DAB) ve izobarik beta-metilamino-L-alanin (BMAA) analizini karma bir kasyonik iyon çifti-RP kolonu kullanarak aynı zamanda gerçekleştirdiler. Metabolomik uygulamalar Tablo 2.3'te özetlenmiştir (Ngoc-Van, 2022). Ek olarak, MMC'nin

moleküler baskılama teknolojisi ile kombinasyonu, diğer kromatografi modları ve moleküler baskılama teknolojisinin potansiyel bir kombinasyonunu kanıtlayan protein BSA için tanıma seçiciliğini de geliştirmektedir (Sýkora ve ark. 2019).

2.6. Doğal Ürünlerde Biyofarmasötikler ve Polar Bileşikler

Biyofarmasötik analiz için, multimodal işlevselliğe sahip Capto ve HEA HyperCel MMC ligandları geliştirilmiştir. Capto, hidrofobik etkileşimlerde yer alan bir fenil grubunun özelliklerini sergileyen bir karboksil grubu ve zayıf bir katyon değiştirici içerir.

Tablo 2. 4 Biyofarmasötiklerde karma mod sabit fazların ve doğal ürünlerde polar bileşiklerin uygulanması.

Bileşikler	Mekanizma	Referans
Biyofarmasötikler		
Rekombinant monoklonal antikorlar (mAb'ler)	Capto MMC reçinesi	(Maria ve ark. 2015)
Model ilaç ürünü, bir IgG1 mAb'nin (MW 145 kDa, pI 8.4) farklı özellik kategorilerinden yedi ekspiyanla karıştırılmasıyla yapılmıştır: sodyum ve potasyum (katyon), klorür ve süksinat (anyon), histidin (zwitteryonlar), trehaloz (hidrofilik nötr şeker) ve PS80 (hidrofobik noniyonik yüzey aktif madde).	Dört farklı ayırma kombinasyonu mekanizmaları (boyut dışlama, anyon değişimi, katyon değişimi ve ters faz)	(He ve ark. 2019)
Pembrolizumab (Anti-PD1 IgG4 vahşi tip ve S228P mutanti)	Zayıf hidrofobik etkileşimler ve boyut dışlama	(Yang ve ark. 2015)
Doğal ürünlerdeki polar bileşikler		
Teofilin, gastrodin, tetrahidropalmatin, likorin, berberin, sinomenin ve tetrandrin	C18-DTT sabit faz [A ters faz sıvı kromatografisi (RPLC)/hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC)]	(Hsieh ve ark. 2007)
H. diffusa ve S. barbata sulu özü	Güçlü anyon değişimi ve ters faz	(Li ve ark. 2014)
Amino asitler (L-piroglutamik Asit, L-valin, L-tirozin, L-prolin) Karbonhidratlar (D-glukoz, D-sükroz, α -Dglukopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β D-fruktofuranosil-(1 \rightarrow 1)- α -Dgalaktopiranoz ve D-stachyose) Süksinik asit (Radix Salvia miltiorrhiza ve Radix Panax notoginseng'den yapılan Dan-Qi çifti)	Doğrudan bağlı ters fazlı ve hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi – kütle spektrometrisi	(Sun ve ark. 2017)

Tablo 2.4'te ayrıca doğal ürünlerdeki polar bileşiklerin belirlenmesini de göstermektedir. Güçlü anyon değişimi ve ters faz mekanizmaları, hem polar hem de daha apolar iyonik ve iyonik olmayan bileşiklerde analiz edilmiş ve ayırma için iyi

tutma sağlayan Çin bitkisel ilaçlarını belirlemek için kullanılmıştır (Li ve ark. 2014). Bu nedenle, ters faz ve hidrofilik etkileşimlerin kombinasyonu, polar bileşiklerin, özellikle de doğal polar bileşiklerin analizi için uygun özellik göstermesinden dolayı bu alanda tercih edilen yaygın bir MMC sabit fazıdır (Ngoc-Van, 2022)

2.7. HPLC Sisteminde Kullanılan Sabit Faz Maddeleri

2.7.1. Kapling Reaktifleri

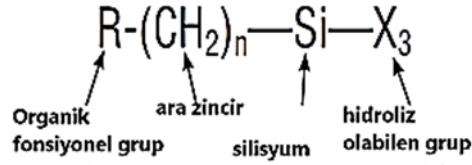
Birbirinden farklı maddelerin ara bir madde ile birbirlerine bağlanabileceği fikri Platon'un "evren dört elementten nasıl oluşmuştur?" (Platon 1888) sorusuna cevap aramada kullanılmıştır. Farklı iki materyalin birbirleriyle daha uyumlu olmasını ve daha güçlü bağlanmasını sağlamak amacıyla polimer kimyasında uzun zamandır kapling reaktiflerinin kullanılması bu endüstrinin gelişiminde çok önemli yere sahiptir (Plueddemann, 1991) (Ranney ve ark, 1972). Bu alanda geliştirilen oldukça fazla sayıda kapling reaktifleri sınıfları mevcuttur. Kapling reaktiflerinin iki fonksiyonel ucu vardır; bir u inorganik destek maddesi veya yüzey malzemesi ile etkileşirken diğer u organik ligand veya polimer maddesi ile etkileşir (Tee ve ark, 2007), (Martinlinna ve ark, 2004). Tan ve arkadaşlarına göre (2005), kapling reaktifi iki farklı özelliğe sahip malzeme arasında köprü görevi görerek bağlantı kurar ve yeni özelliklere sahip hibrit bir malzemenin oluşmasını sağlar.

2.7.2. Silan Kapling Reaktifleri

Organik yapıda ki reçineleri güçlendirmek amacıyla 1940 yılında cam elyaf ilk keşfedilmesiyle beraber yeni bağlanma tekniklerine ihtiyaç duyulmuştur. (Plueddemann, 1991). O tarihten günümüze gelinceye kadar organik ve anorganik bileşikleri birbirine bağlayan çok sayıda silan bileşiği keşfedildi (Mittal ve ark, 1992), (Daniels ve ark 1998). Silan kapling reaktiflerinin kendileri de inorganik ve organik başlangıç maddelerinden oluştuğu için, bu alanda hibrit malzeme oluşturmak için kapling reaktifi olarak kullanılmaları beklenen bir sonuçtur. Silan kapling reaktiflerinin  önemli avantajı var (Plueddemann, 1991);

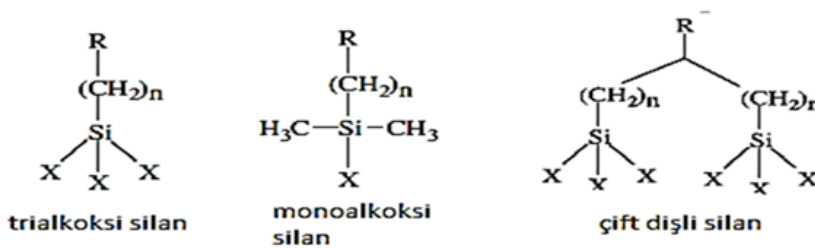
1. Ticari olarak temini çok kolaydır.
2. Bir ucuna alkoksi grubu bağlı olduğu için, silika vb. inorganik malzemenin yüzeyinde buluna –OH, -NH₂ gibi gruplarla kolay yer değiştirme reaksiyonu verir.
3. Diğer ucuna da reaksiyona girmeye uygun bir fonksiyonel grup olduğu için organik bir malzemeyle bağlanması kolaydır.

Organik ve anorganik maddeleri birbirine bağlamak için kullanılan silan kaplin reaktifleri yapısında silisyum olan ara maddelerdir. Yüze kimyası denilen kimyanın büyük bir kısmını bu maddeleri içeren malzemelerden oluşur.



Şekil 2. 4 Silan kapling ajanlarının genel formülü

Organosilanların yapısına bakıldığında genel olarak neredeyse hepsinde bir organik sübtitüent ve buna bağlı olan üç hidrolizlenebilen alkoksi grubu vardır (Şekil 2.4). Alkoksi grupları hidrolize uğrayarak ve böylece inorganik malzemenin yüzeyi ile kimyasal tepkimeye girerek yüzeye bağlanırlar. Bu tür silanların kimyasal tepkimeleri dört basamak sonucunda oluşur. Şekil 2.5'e bakıldığında birinci adımda alkoksi grupları hidrolize uğrayarak bir araya gelen gruplar kendi aralarına birleşerek oligomer oluşturur. Üçüncü basamakta, bu oligomerler inorganik malzemenin yüzeyinde – hidroksi grupları ile hidrojen bağı yaparak tutumayı sağlar. Son aşamada da bu hidroksi grupları arasında bir su molekülü ayrılmak üzere Si-O-Si kovalent bağı oluşur (Arkles, 1997). Bağlanmadan sonra bazen tek bir serbest OH grubu kalır, bazen de iki hidroksil grubu serbets halde kalır. Bu, yüzeye bağlanma gerçekleşirken kaç tane Si-O-Si bağı oluştuğuna bağlıdır (Arkles, 1997).



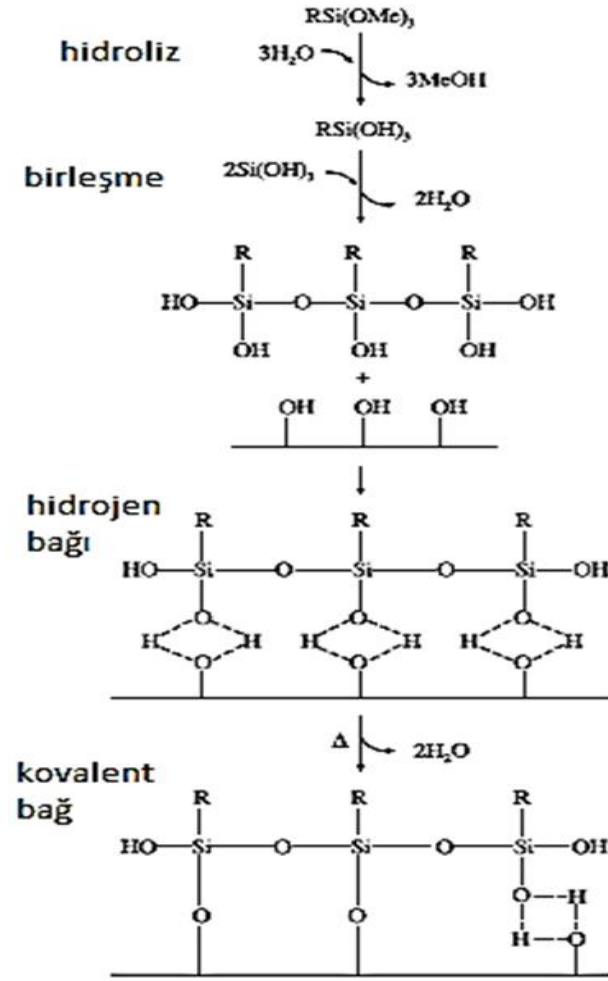
Şekil 2. 5 Bazı silan kaplin reaktiflerinin yapısı

2.7.3. Silika Yüze Modifikasyonu için Silan Kapling Reaktifleri

Durgun faz için kullanılacak silika jel yüzeylerinde düzenleme yapmak için kullanılan bazı etkenler;

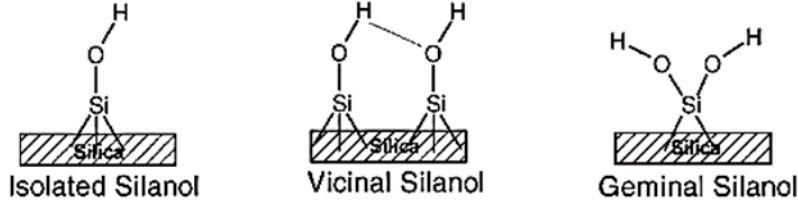
1. İnorganik yapıda ki polimerin yüzeyindeki hidroksi grubu sayısı/konsatrasyonu
2. silika jel yüzeyindeki hidroksik gruplarının türü

3. Bağlanmanın hidrolitik dayanıklılığı
4. Substrat'ın fiziksel boyutu



Şekil 2. 6 Silan kaplin reaktifinin silika jel vb. inorganik malzemeye bağlanması için genel bir şema

Silikanın yapısı incelendiğinde, SiO_2 biriminden oluşan, silisik asit türevi bir polimerdir. Silika jel ise, silikanın gözenekli ve granül yapısındaki formuna verilen isimdir ve sodum silikat veya silikon tetraklorürden sentezlenir (Iler, 1979), (Unger, 1979), (Barby, 1979). Aktif silikanın yüzeyinde bulunan alanın geniş olması adsorbsiyon ve iyon değişiminde son derece önemlidir. Silikanın yüzeyi hakkında çok kapsamlı bilgiye sahip olmasak bile özellikler oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Modifiye olmamış veya olmuş silikanın dış yüzeyinin morfolojisini direk ölçen tek metod atomik kuvvet mikroskobu (Atomik forse microscopy, AFM)'dur. Silika yüzeyinde, uç kısımlarda ya siloksan grupları ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), ya da silanol (Si-OH) grupları vardır (Şekil 2.7)



Şekil 2. 7 Silika yüzeyindeki farklı silanol gruplarının yapıları

Silika yüzeyine bağlı silanoller izole silanoller, Vicinal silanoller ve geminal silanoller olmak üzere üç farklı formda bulunabilir. Geminal silanoller birbiriyle molekül içi hidrojen bağı yapacak kadar yakındır, ancak vicinal silanollerde bu mesafe fazla olduğu için molekül içi hidrojen bağı yapmazlar (Kiselv, 1975). Ong ve arkadaşlarının bu alandaki öncü çalışmaları, silika yüzeyinde pKa değerleri 4.9 ve 8.5 olan, yüzeydeki popülasyonları da sırasıyla %19 ve %81 olan iki farklı silanol tipi olduğunu göstermiştir (Ong ve ark, 1992). pKa değeri 4.9 olan silanolun, hidrojen bağı yapmayan izole silanol olduğu düşünülüyor. İzole silanoller geminal silanollere göre yüzey modifikasyon reaksiyonlarına girmeye daha yatkın olmakla beraber daha kolay da hidroliz olur.

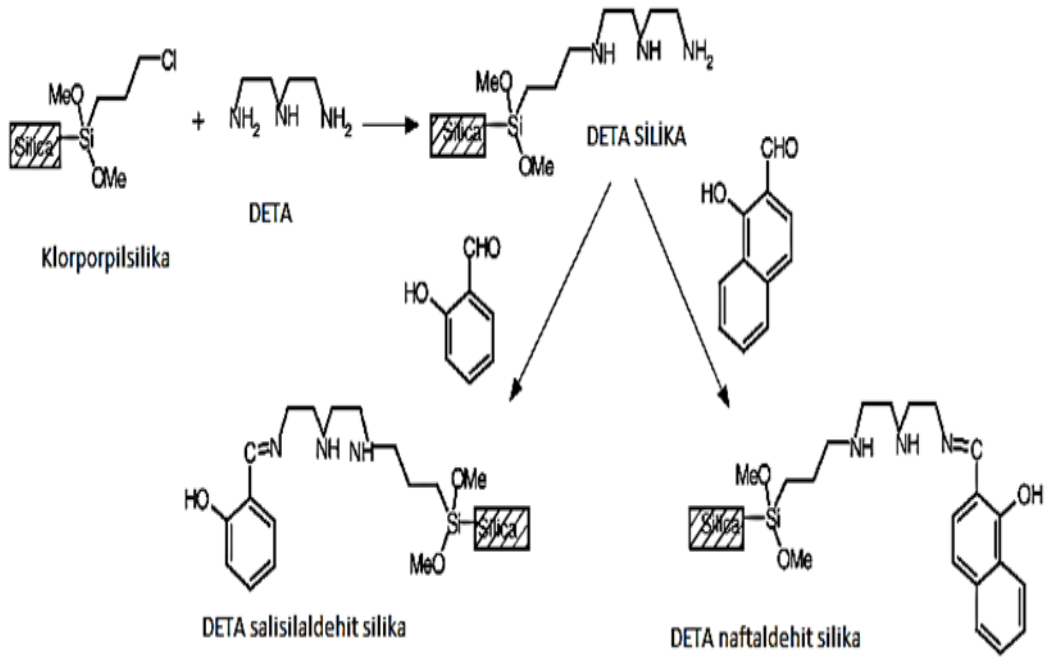
Silika yüzey modifikasyonu, yüzeyin kimyasal yapısını değiştiren tüm etmenlere bağlıdır. Silika yüzey modifikasyonu iki şekilde yapılabilir; ya yüzeydeki silanol ve siloksan konsantrasyonunun değişimine yol açan fizel işlem (termal veya hidrotermal) veya yüzeyin kimyasal yapısını değiştiren kimyasal işlem. Organik moleküllerle yüzey modifikasyonu silikaya dayanıklı, suda daha az çözünme ve artan immobilite sağlar. Böylece analitik uygulamalardaki etkinliği, hassasiyeti ve selektiviteyi artırır (Jal ve ark, 2001).

İyon şelatlayıcı organik moleküller genellikle kovalent bağlanma içeren silanlama prosedürü ile silika yüzeyine bağlanır (Weetall, 1987). Ancak ne yazık ki iyon şelatlayıcı bileşiklerin çoğunda silanlama reaksiyonu verecek bir fonksiyonel grup yoktur. Bu durumda şelatlayıcı reaktifin silika yüzeyinde fiziksel adsorpsiyonu modifikasyon oldukça kullanışlıdır. Böyle bir modifikasyon van der Waals gibi hidrofobik etkileşimlere dayanmayan kovalent olmayan modifikasyondur. (Kim ve ark., 2000), (Chan ve ark., 2002).

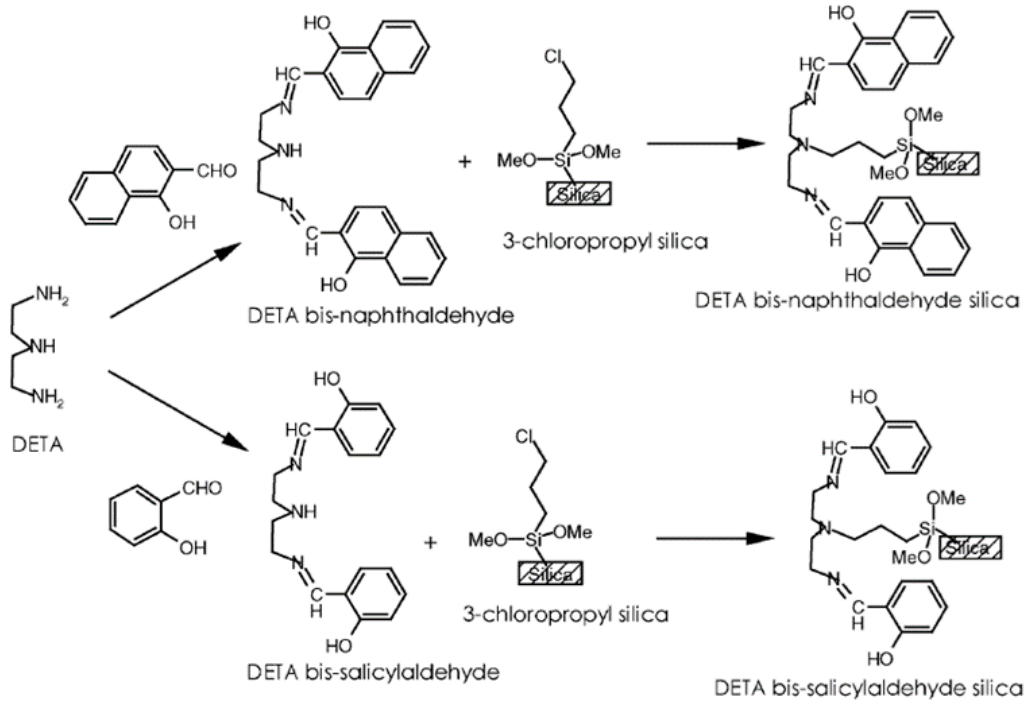
Silika yüzey modifikasyonu için geleneksel kimyasal metod ticari olarak mevcut olan silan kaplin reaktiflerinin ile silika yüzeyindeki hidroksil gruplarının kovalent

olarak bağlanmasını içerir. Normalde, bu bileşikler silika yüzeyi ile tek basamakta bağlanarak, yüzeyin başka organik ligandlarla reaksiyona girmesini sağlayan yeni fonksiyonel gruplar sunar. Bu modifikasyonda oluşan Si-O-Si-C bifonksiyonel bir doğaya ve yüksek kimyasal kararlılığa sahiptir. FTIR ve katı hal ^{29}Si NMR çalışmaları alkoksilant reaktiflerinin Si-O-Si-C birimini oluşturmak üzere silika yüzeyine doğrudan bağlanma olasılıklarını ortaya çıkardı (Debois ve ark., 1993), (Blümel ve ark., 1995).

Humik asidin, amino propilmodifiyeli silika jelle bazık ve N,N-Dimetilformamid (DMF) ortamında muamele edilmesi ile humik asit modifiyeli silika jel sentezlendi. Silikanın her bir gramına 72 mg humik asit bağlandığı rapor edilmiştir (Koopal, 1998). Szapo ve arkadaşları (1990, 1992) yaptıkları glutaraldehit modifiyeli aminopropil silikanın her bir gramına 16 mg humik asit bağladılar. Önce aminopropilsilika %5 glutaraldehit çözeltisi ile aktive edildi. Elde edilen kırmızı çözelti 8 saat boyunca oda şartlarında humik asit ile muamele edildi.

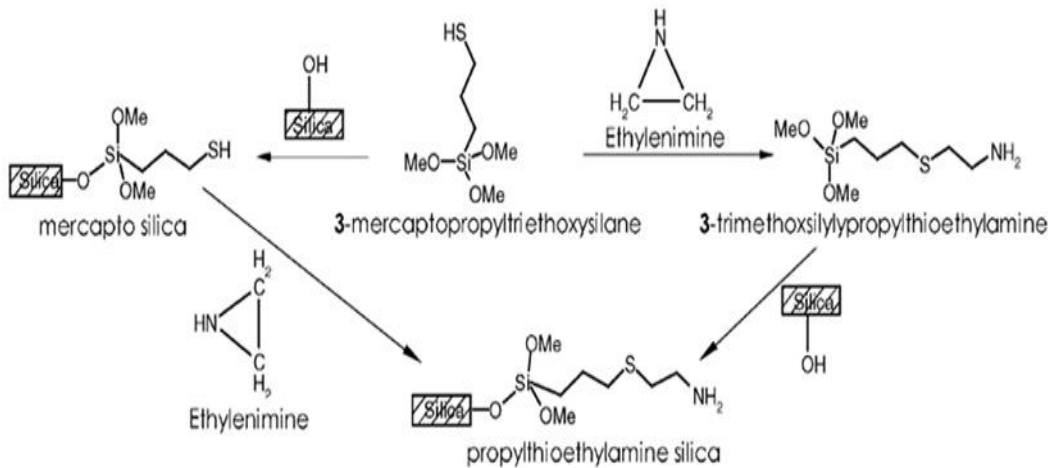


Şekil 2. 8 Çeşitli Schiff bazı modifiyeli silika jel materyallerinin sentezi için 1. Yol



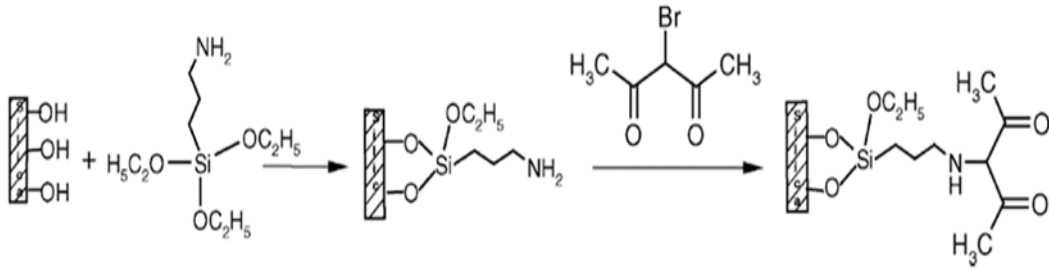
Şekil 2. 9 Çeşitli Schiff bazı modifiyeli silika jel materyallerinin sentezi için 2. Yol

Başka bir heterojen modifikasyon yolunda, önce silika bir silan kaplin reaktifi olan jel 3-merkaptopiltrimetoksisilan ile etkileştirilerek aktive edildi. Sonra da etilenimin ile etkileştirilerek bir amin aktif gruplu silika gel materyali elde edildi. Aynı sabir faz için yapılan ikinci modifikasyon yolunda da önce 3-merkaptopropiltrimetoksisilan bileşiği etilenimin ile etkileştirildi. Son olarak da elde edilen modifiye olmuş silan bileşiği silika silika jel ile etkileştirildi (Şekil 2.10) (Arakaki ve ark, 2000).

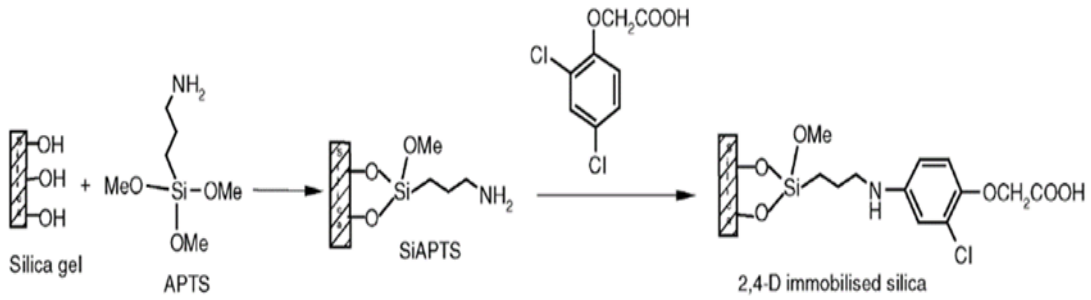


Şekil 2. 10 Kapling reaktifi olarak 3-merkaptopiltrimetoksisilan türevi silika jel materyallerinin sentezi

3-Aminopropiltrimetoksisilan ile modifiye olmuş silika jel yüzeyi Beta-diketonlar ile modifiye edildi Bunun için 3-bromo-1,4-butadien kullanıldı (Gambero ve ark, 1997) (Şekil 2.11). Yine 3-aminopropiltrimetoksisilan kullanılarak yapılan başka bir modifikasyonda, aminopropil silika jel 2,4-diklorofenoksiasetik asit ile etkileştirilerek anilin türevi bir silika jel materyali sentezlendi.

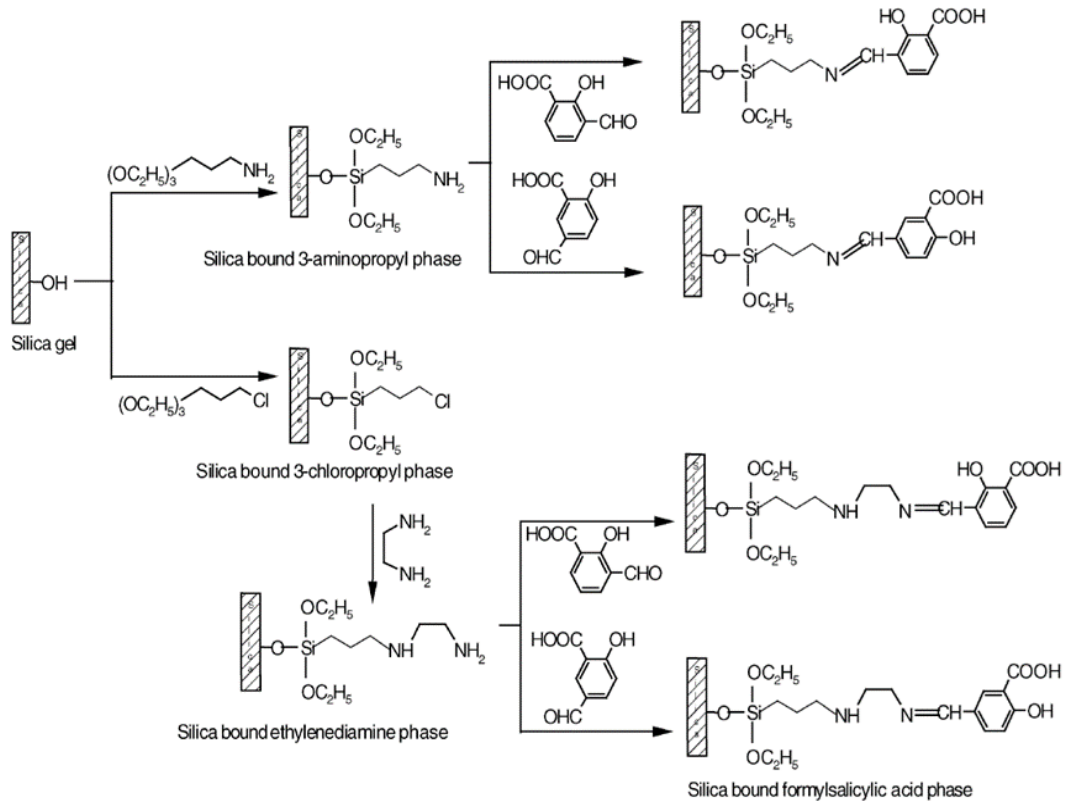


Şekil 2. 11 Beta-diketon modifiyeli silika jel sentezi

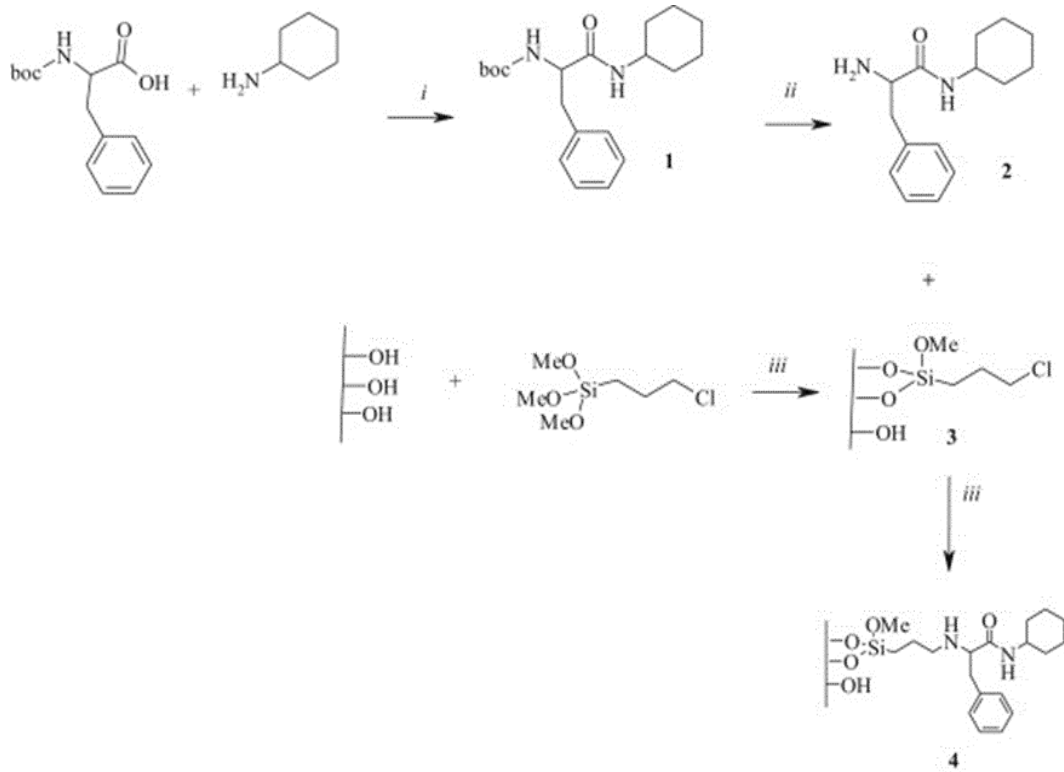


Şekil 2. 12 2,4-diklorofenoksiasetik asit modifiyeli silika jel.

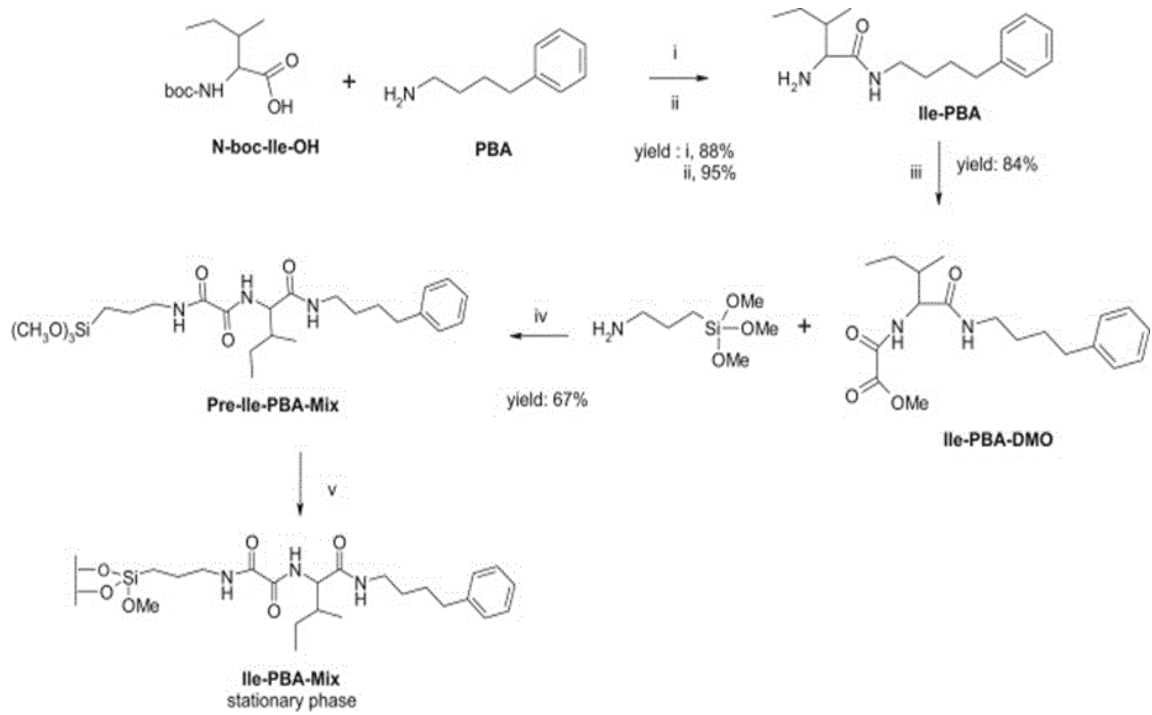
Aral ve arkadaşları (2013, 2014, 2015, 2017) kaplin reaktifi olarak 3-kloropropiltrimetoksisilan (Şekil 2.12), 3-aminopropiltrimetoksi silan (Şekil 2. 13) ve 3-glisidiloksitrimetoksi silan (Şekil 2.14) bileşiklerinin kullanarak karma mod özelliğine sahip silika jel türevi çeşitli HPLC sabit fazları sentezlediler. Sentezlenen bu materyaller HPLC kolonu halin getirip farklı polaritedeki analitlerin RPLC ve HILIC şartlarında ayrılmasında kullandılar. Bu sabit fazların karma mod kolon özelliğini göstermekte oldukça başarılı oldukları görülmektedir.



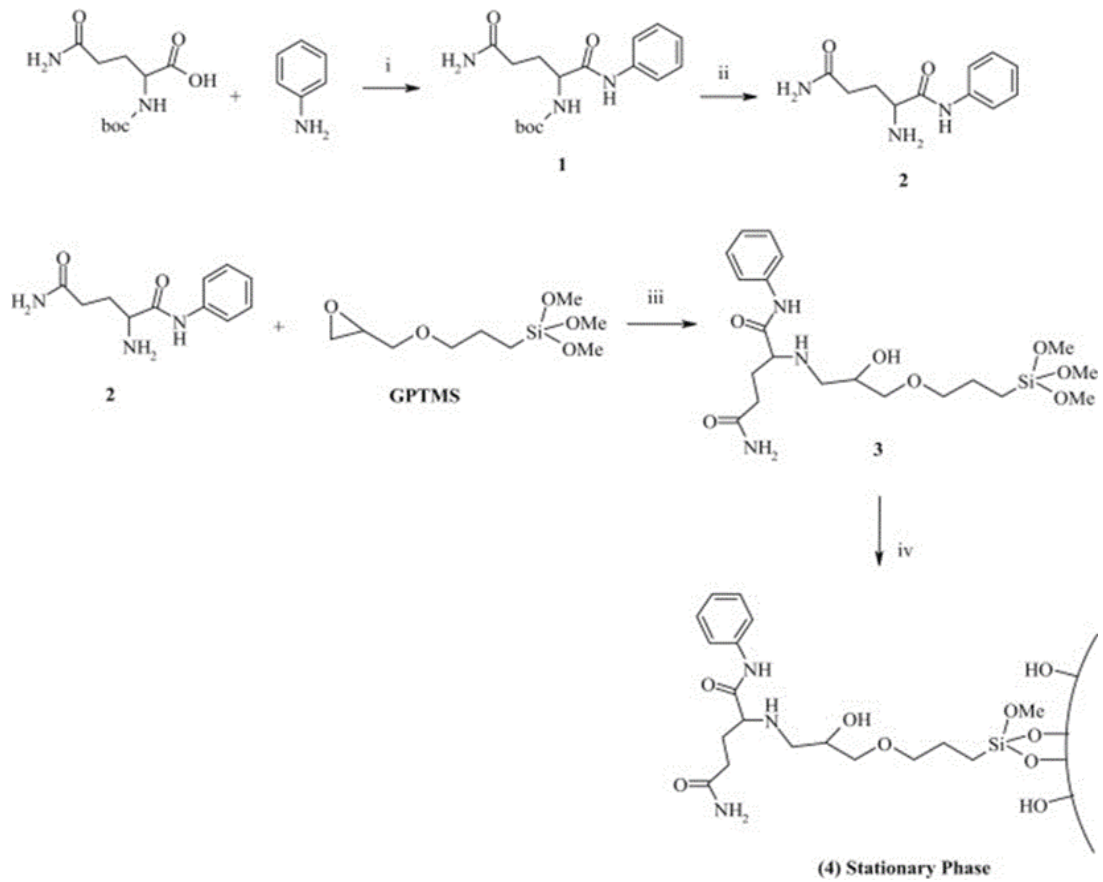
Şekil 2. 13 Formilsalisilik asit modifiyeli silika jel materyalleri



Şekil 2. 14 Kapling Reaktifi olarak 3-kloropropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri.



Şekil 2. 15 Kapling Reaktifi olarak 3-aminopropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri.



Şekil 2. 16 Kapling Reaktifi olarak 3-glisidiloksipropiltrimetoksi silan kullanılarak hazırlanan silika jel materyalleri

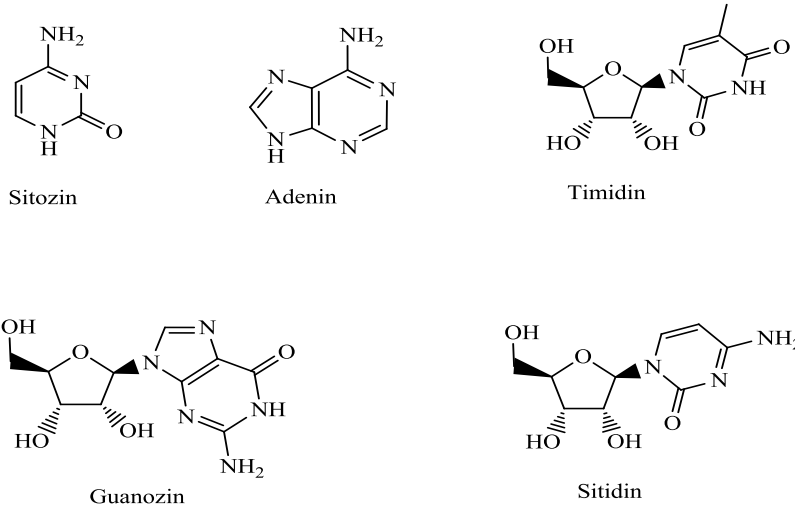
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Reaktifler ve malzemeler

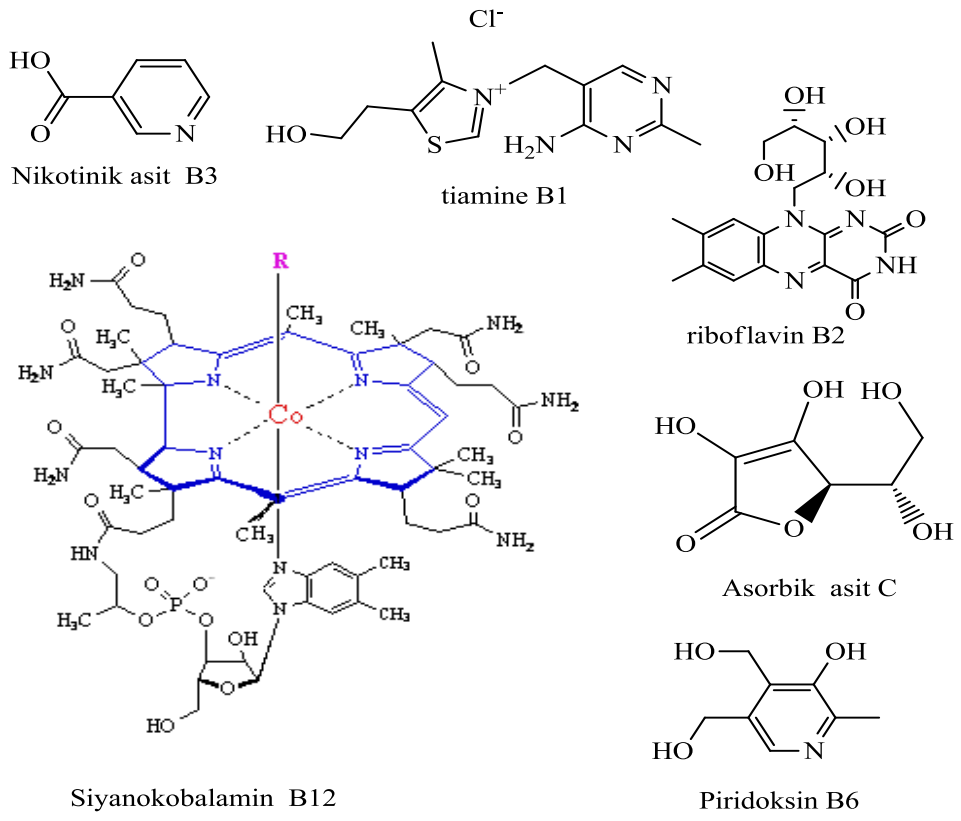
Kullanılan silika jel (Lichrospher Si 60, 5 um, 60 A, 700 m²g⁻¹) Merck'ten satın alındı. Hareketli faz olarak HPLC için kullanılan asetonitril (MeCN), metanol (MeOH), etanol (EtOH) ve izopropanol (I-ProOH) “HPLC grade” olup Merck'ten temin edildi. Bu çalışmada kullanılan tüm analitler (Şekil S1, Ek Malzemeler), diğer tüm reaktifler ve solventler Sigma-Aldrich veya Merck'ten alındı. Kolon dolgu fazı sentezi için seçilen tüm reaktifler, aksi belirtilmedikçe “reagent grade” olarak kullanıldı. Sabit fazın paketlenmesi için temin edilen boş HPLC kolonları paslanmaz çelik olup Kalite Sistem Merieux Nutrisciences (Istanbul, Turkey) firmasından ücretsiz temin edilmiştir. Sentez yapımında kullanılan tüm reaktifler “reagent grade” olduklarından bunun dışında ekstra bir saflaştırma tekniğine tabi tutulmamıştır. IR spektrumları, Mattson 1000 FTIR spektrometresi ile alındı. Element analizleri Thermo Scientific FLASH 2000 cihazı ile yapıldı. Deiyonize su, Millipore Milli-Q su sistemi kullanılarak elde edildi. SEM görüntüleri, LEO EVO 40 model enstrümanı (Dicle Üniversitesi, SEM Laboratuvarı) kullanılarak elde edildi. Katı hal ¹³C NMR, Bruker Superconducting FT.NMR Spektrometresi Avance TM 300 MHz WB cihazı (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez laboratuvarı, Katı hal NMR laboratuvarı) kullanılarak kaydedildi. ¹H (400 MHz) ve ¹³C (100 MHz) NMR spektrumları, Bruker DPX-400 Yüksek Performanslı Dijital FT-NMR Spektrometresi (Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, NMR Laboratuvarı) ile kaydedildi.

3.2. HPLC koşulları

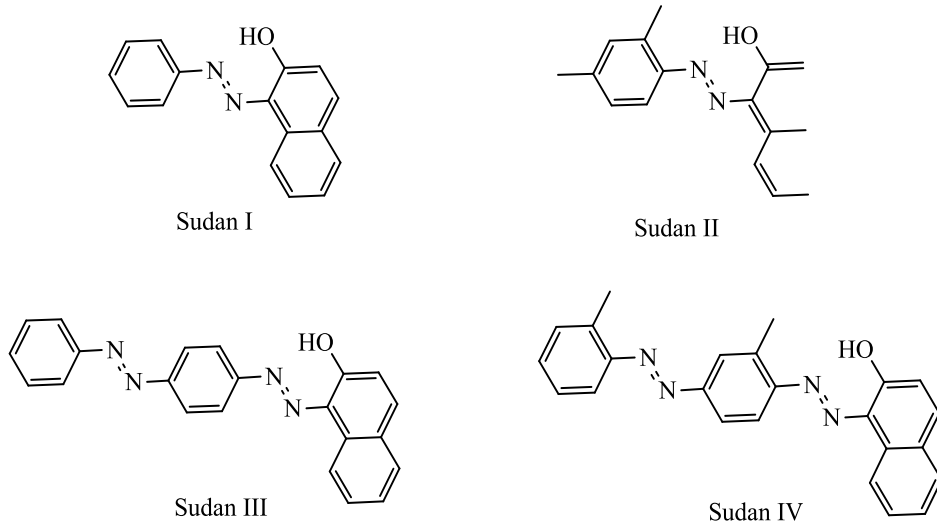
Kromatografik uygulamalar için bir kuaterner pompa, degasser ünitesi, otosampler, diode array dedektörü (DAD) ve termostatlı kolon bölmesi (Agilent, Waldbronn, Almanya) içeren Agilent 1260 HPLC sistemi kullanıldı. Her analitin standart solüsyonları (1 mg mL⁻¹), guanin hariç asetonitril (MeCN) veya su içinde hazırlandı. Guanin 0.1 N NaOH çözeltisinde çözülerek hazırlandı. Karışımdaki analit başına 100 ppm'lik bir nihai konsantrasyon elde etmek için çözeltilerin tümü su veya ACN ile seyreltildi ve +4 °C'de saklandı. Tampon çözeltiler için amonyum format, amonyum asetat veya amonyum fosfat kullanıldı. pH, gerektiğinde %2.5 amonyak veya 0.1 M ilgili asit ile ayarlandı. Diğer kromatografik koşullar ilgili bölümlerde açıklanmıştır.



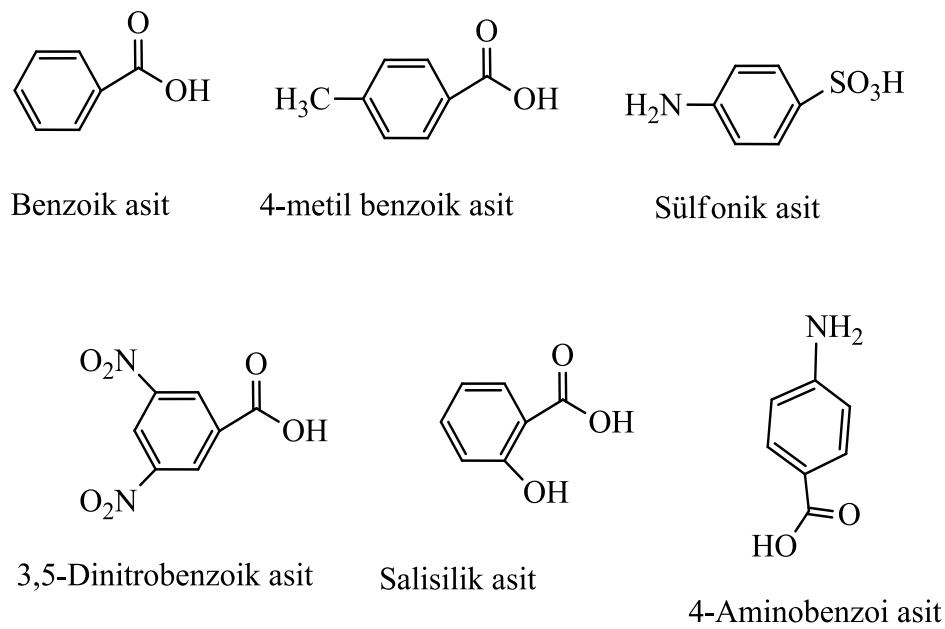
Şekil 3.1 Nükleotit ve Nükleozitler



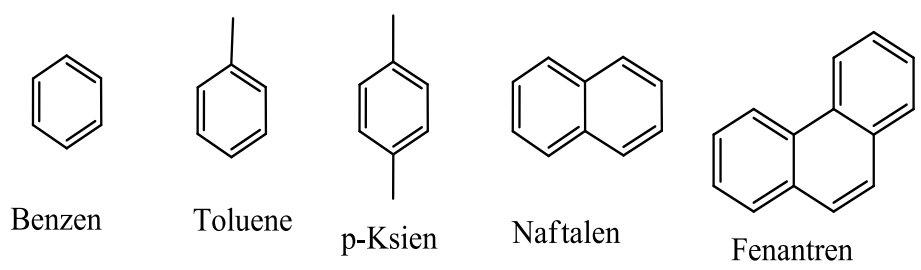
Şekil 3.2 Suda çözünen vitaminler



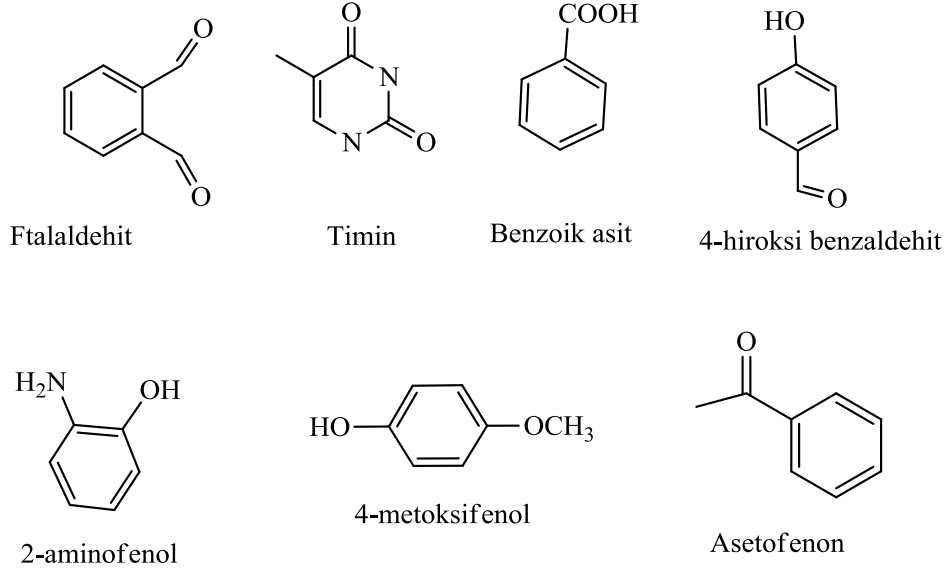
Şekil 3. 3 Sudan boyları



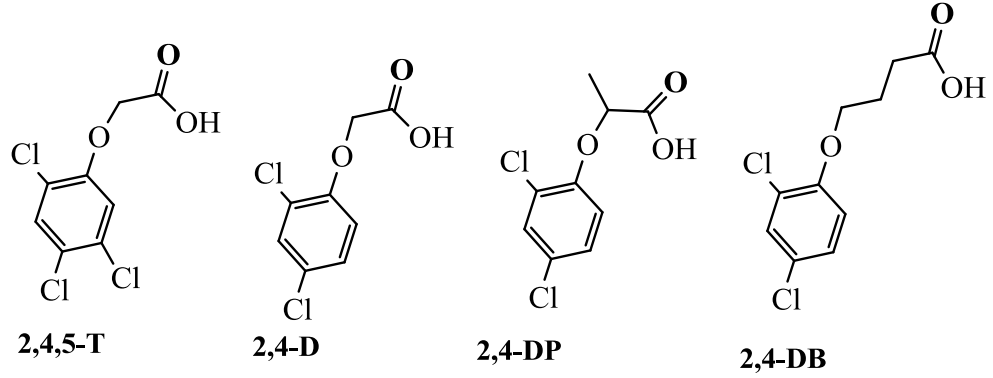
Şekil 3. 4 Benzoik asit türevleri



Şekil 3. 5 Alkil benzenler



Şekil 3. 6 Polar/Apolar test bileşikleri



Şekil 3. 7 Herbisitler

3.3. Kromatografik Sabit Fazın paketlenmesi ve Stabilit e Testleri

Kolon (250 x 4.6 mm, paslanmaz elik), daha önce bildirilen bulamaç paketleme tekniğine göre paketleme solventi olarak 2-propanol kullanılarak 450 bar basınca altında yeni sabit fazla dolduruldu (Aral, 2017). Ayrıca aynı referansa göre kolon stabilit e testleri yapılmıştır. Testler pH 2.5 ve pH 9.0'da gerçekleştirilmiştir. Her iki pH'da da kolondan 1000 kolon hacminde solvent geçtikten sonra analiz sürelerinde önemli bir değişiklik olmadı. Bu, kolonun pH 2.5 ve 9.0'da stabil olduğunu gösterdi.

3.4. Yeni durağan fazın sentezi

1 gr (4.07 mmol) [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan ve 1.31 gr (5 mmol) IlePBA 50 mL'lik yuvarlak tabanlı bir reaksiyon balonuna alındı ve üzerine 5 mL DMSO eklendi. Karışım, 100  C'de 24 saat karışmaya bırakıldı. Bu süre zarfında reaksiyon süreci, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile izlendi. Reaksiyon

tamamlandıktan sonra karışıma 30 mL toluen ve 4 g silika jel (LiChrospher Si60, 5µm, 100 Å) ilave edildi. Süspansiyon, 130°C'de 48 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyon durduruldu ve karışım süzüldü. Modifiye edilmiş silika materyali Soxhlet kartuşuna alındı ve 24 saat boyunca 200 mL kloroform ile sürekli ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyondan sonra, modifiye edilmiş silika materyali, evaporatörde normal basınç altında 7 saat ısıtılarak kurutuldu. Buradaki amaç, modifiye silika materyalini reaksiyona girmemiş başlangıç reaktiflerinden arındırmaktır. Element analizi sonucu %: C, 15.75; H, 2.20; N, 1.47. Bu sonuca göre yaklaşık 2.86 mmol Si-Ch-IlePBA 4 g silika bağlanmıştır. SEM, katı hal ¹³C NMR ve FTIR sonuçları bir sonraki bölümde verilmiş ve tartışılmıştır.

3.5. Sentezler

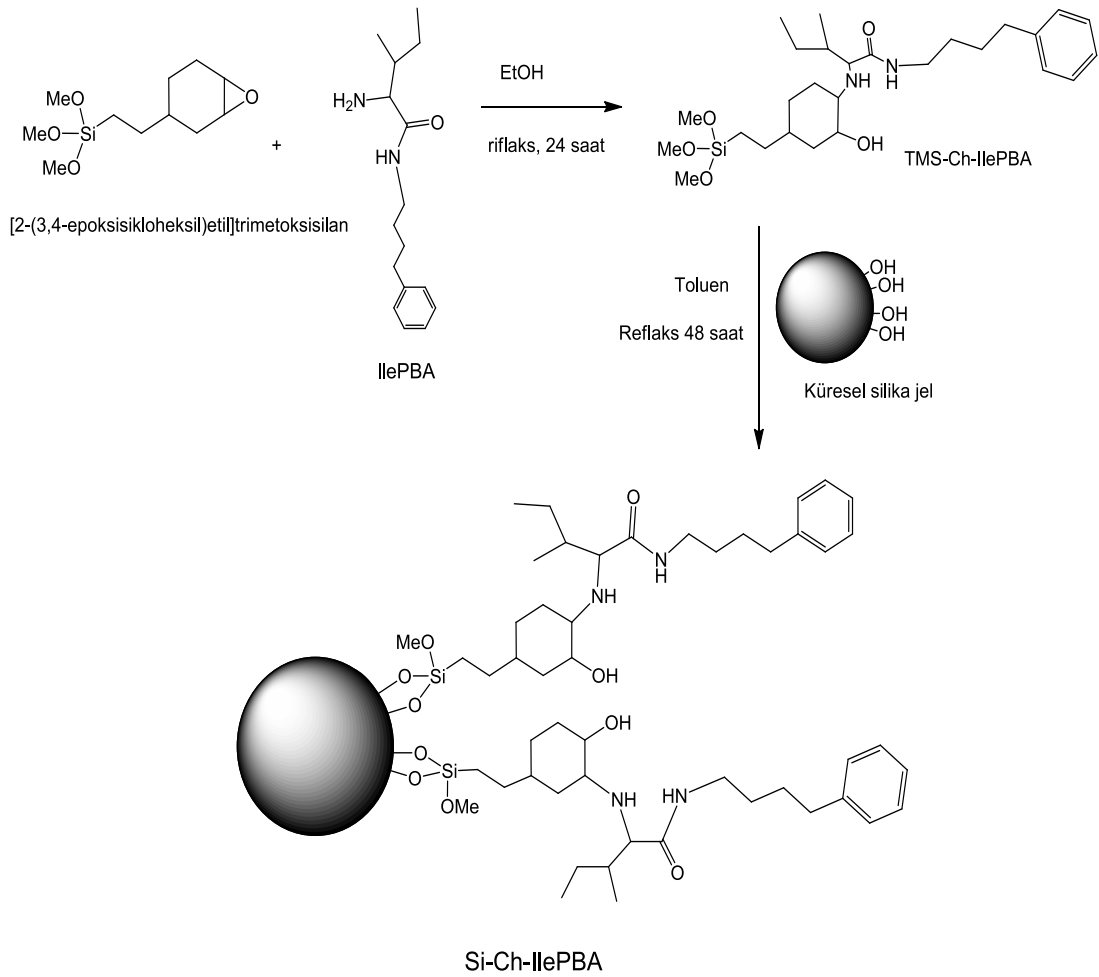
Doğal bir amino asit olan L-izolösin elde edilmesi kolay ve ucuz bir başlangıç malzemesidir. Yapısındaki polar karbonil ve amin gruplarının yanı sıra apolar alifatik zincirleri de içerir. Bir diğer polar grup olan amid fonksiyonel grubu, karbonil grubunun aminlerle reaksiyonu ile elde edilebilir. Amid ve amin fonksiyonel grupları çok amaçlı olarak kullanılabilir. Aminlerin alkil halojenürlerle ikame edilmesinin bir sonucu olarak, ikincil aminler, bir amid grubu elde etmek için epoksitler ve amino alkoller ile reaksiyona sokularak veya başka bir karbonik grupla reaksiyona sokularak elde edilebilir. Bu nedenle amino asitler sentez için çok uygun başlangıç malzemeleridir.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen sabit fazın tasarım aşamasında şu noktalara önem verilmiştir: Karma modlu durağan bir fazın polar, orta polar ve polar olmayan tüm analit sınıflarını ayırabilmesi istendiği için yapısında, farklı özelliklere sahip polar gruplara (verici ve akseptör) ek olarak, apolar gruplar da mevcut olmalı ve ilgili analitler ile iyi etkileşime girecek benzer grupları içermelidir. Bu nedenlerle, başlangıç materyali olarak izolösin amino asiti seçilmiştir.

Bu çalışmanın en önemli noktası, kromatografik durağan faz sentezinde silan bağlama reaktifi olarak ilk kez kullanılan [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilanın kullanılmasıdır. Bu reaktifin seçilmesinin nedeni hem alifatik sikloheksil halkası hem de epoksit halkası içermesidir. Epoksit halka açma reaksiyonunun bir sonucu olarak bir amino alkol oluşur. Amino alkol grubu -OH grubu içerdiğinden güçlü hidrojen bağları yapabilir ve amin grubu içerdiğinden iyi bir elektron verici grup içerir. Ek olarak,

birleştirme reaktifinde büyük alifatik grupların varlığı, silika malzemesini hidrolitik olarak kararlı hale getirir.

Çalışmanın ilk aşamasında tasarlanan durağan fazın sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). Bu amaçla ilk olarak N-Boc-izolösin amino asidinin 4-fenilbütilamin ile referanstaki prosedüre göre aktive edilmesi ve koruyucu grubun trifloroasetik asit (TFA) ile uzaklaştırılmasıyla başlangıç aminleri olan N-(4-fenilbütil)izolösin bileşikleri elde edilmiştir (Aral ve ark. 2015). Elde edilen bu amid-amin bileşiği, çok az miktarda (5 mL) DMSO içinde bir silan birleştirme reaktifi, [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan ile reaksiyona sokularak, epoksit halkasının açılmasıyla bileşik X elde edildi. Bu reaksiyon, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile takip edildi. 48 saat sonra bu ürün toluen ve HPLC kalitesinde küresel silika jel (5µm, 60 Å) izole edilmeden ilave edilerek 130°C'de 72 saat karıştırılmaya bırakıldı.



Şekil 3. 8 Karışık mod sabit fazın sentezleri, Si-Ch-IlePBA.

Filtrasyonun ardından, sabit faz maddesi kloroform ile 24 saat boyunca soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Hazırlanan bu durağan faza Si-Ch-IlePBA adı verildi. Yeni durağan fazların yapısal analizi ve karakterizasyonu, Elemental Analiz, fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), katı hal ¹³C nükleer manyetik rezonans (CAPMAS 13C NMR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapıldı.

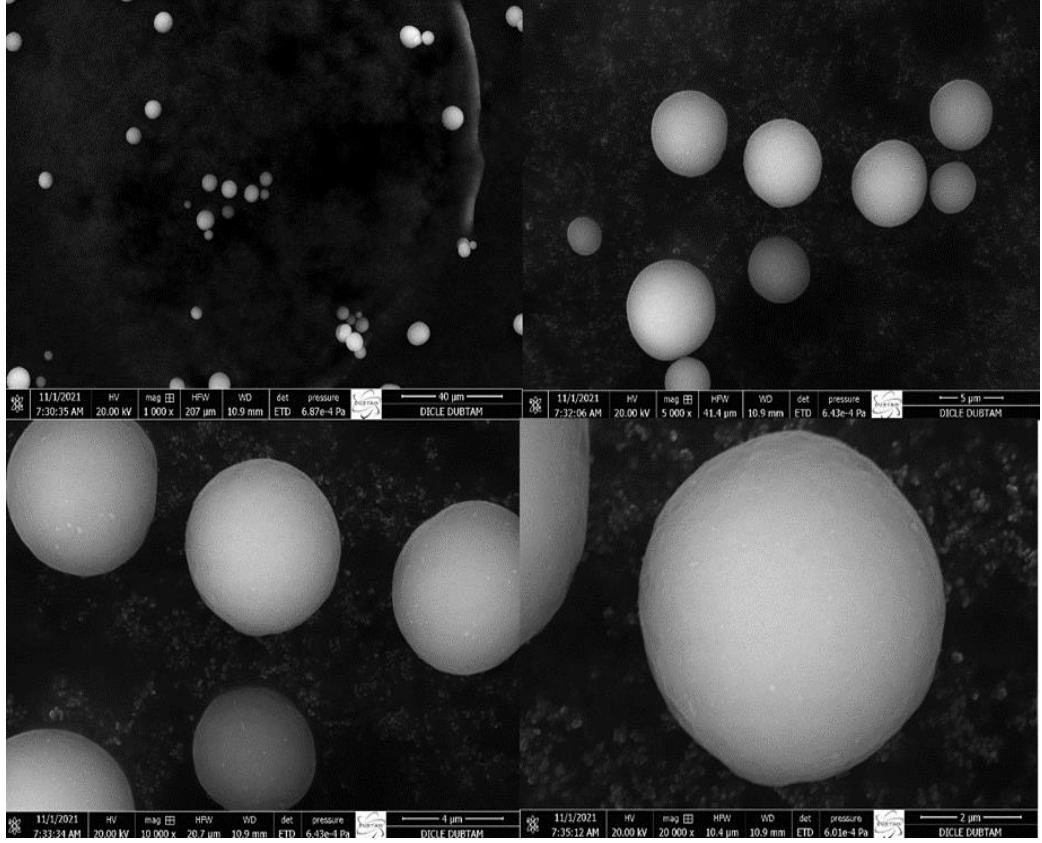
3.6. Sabit Faz Materyallerinin karakterizasyonu

Sentezlenen durağan fazın karakterizasyonu için öncelikle Element Analizi ölçümü alınmış ve malzemenin karbon, hidrojen ve azot oranları bulunmuştur (Tablo 3.1). Element Analizi sonuçlarına göre silika jele bağlanan ligand miktarı mol olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre 4 gram silika jele bağlı X miktarı sırasıyla 2.86 mmol olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamada, silan birleştirme reaktifinin iki metoksi grubunun ayrılmasıyla silika jele bağlandığı varsayılmıştır.

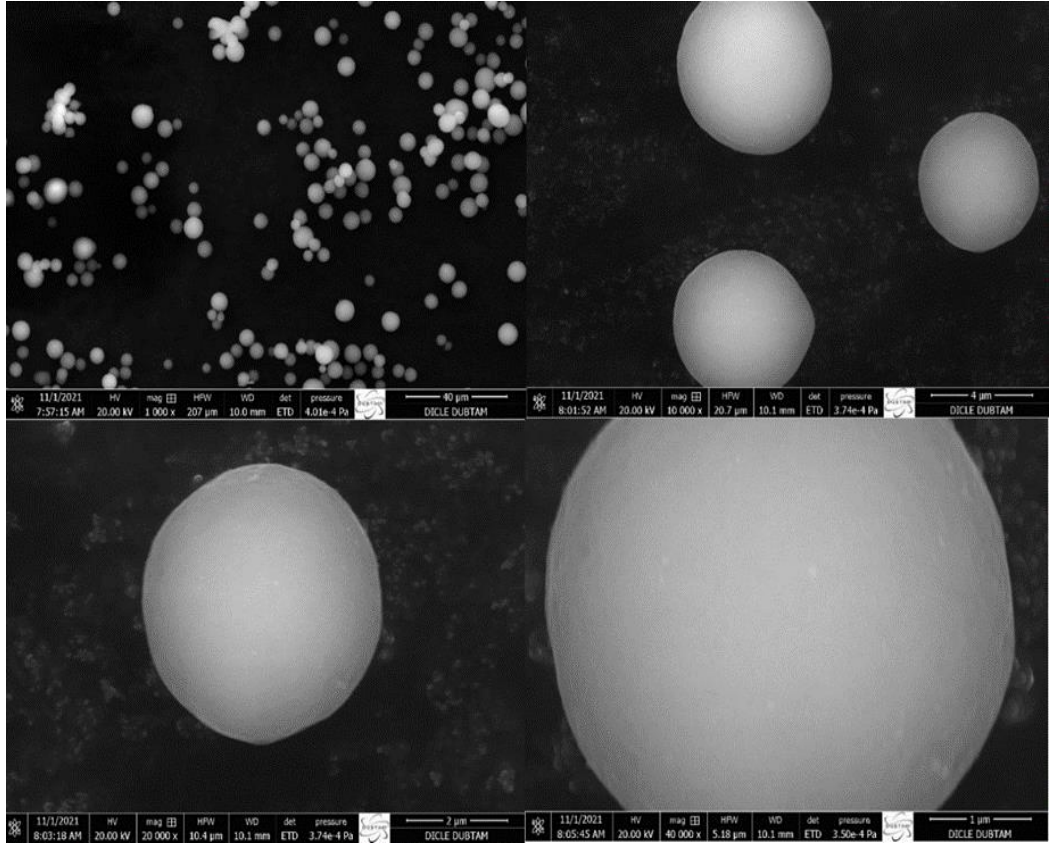
Tablo 3. 1 Hazırlanan sabit fazların Element Analizi sonuçları

	SP-Ch-IlePBA	Bare Silica
C	15.75	0.00
H	2.24	0.04
N	1.47	0.00

Bu çalışmada kullanılan silika jel, HPLC kalitesindedir ve düzenli küresel şekle sahip parçacıklardan oluşmaktadır. Kimyasal modifikasyon sonucunda partiküller parçalanabilir, düzensiz hale gelebilir veya partikül boyutu zaman zaman değişebilir. Bu nedenle modifikasyondan sonra partiküllerde yapısal bir değişiklik olup olmadığını görmek için SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.9, ticari olarak temin edilebilen modifiye edilmemiş silika jelin görüntüleridir. Şekil 3.10, yeni durağan fazın SEM görüntüleridir. Görüntülerin karşılaştırıldığı parçacık şekillerinde herhangi bir düzensizliğin olmadığı ve parçacık boyutu dağılımının değişmediği açıkça görülmektedir. Bu, modifikasyon sonucunda oluşabilecek olası bir olumsuzluğun görülmediği ve modifikasyonun başarılı olduğu anlamına gelir.



Şekil 3. 9 Boş silika jel'in SEM görüntüleri

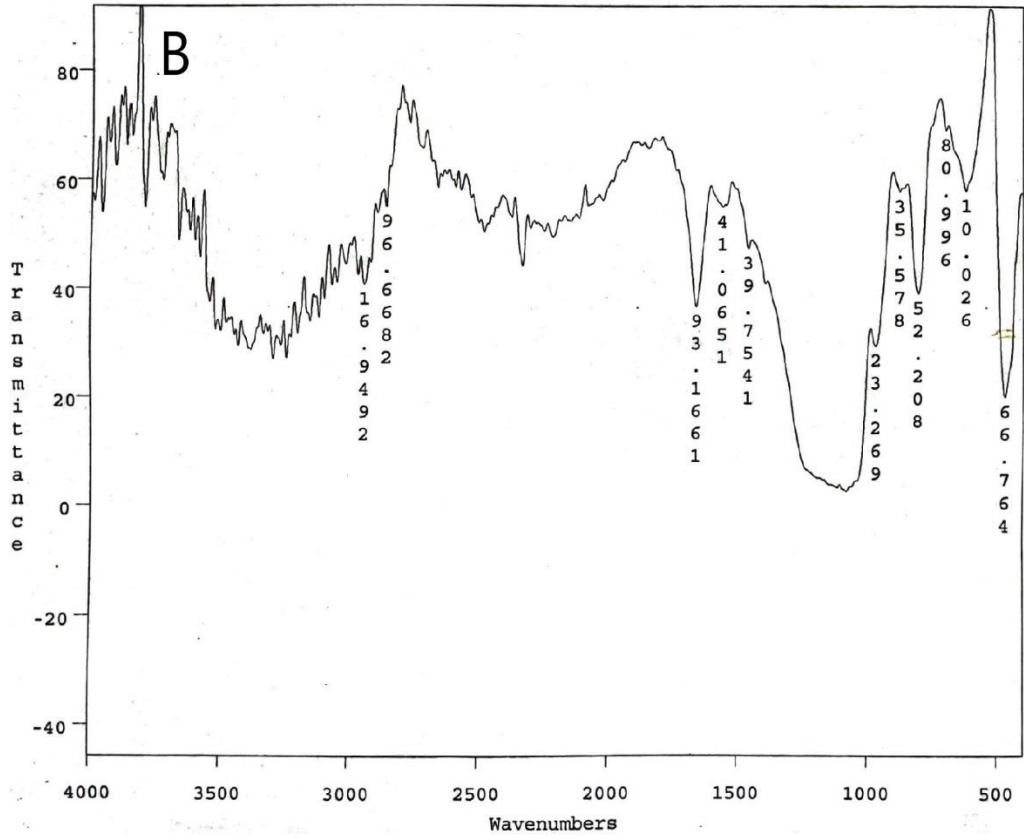
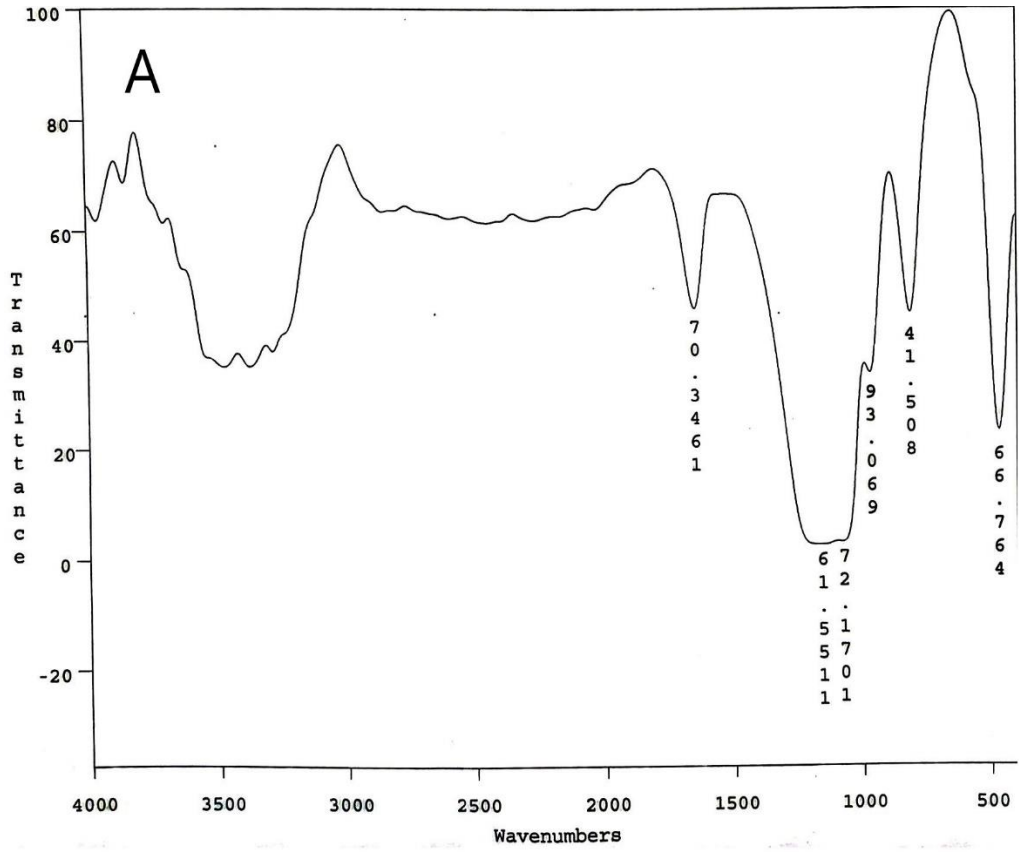


Şekil 3. 10 Yeni durağan faz Si-Ch-IlePBA'nın SEM görüntüleri

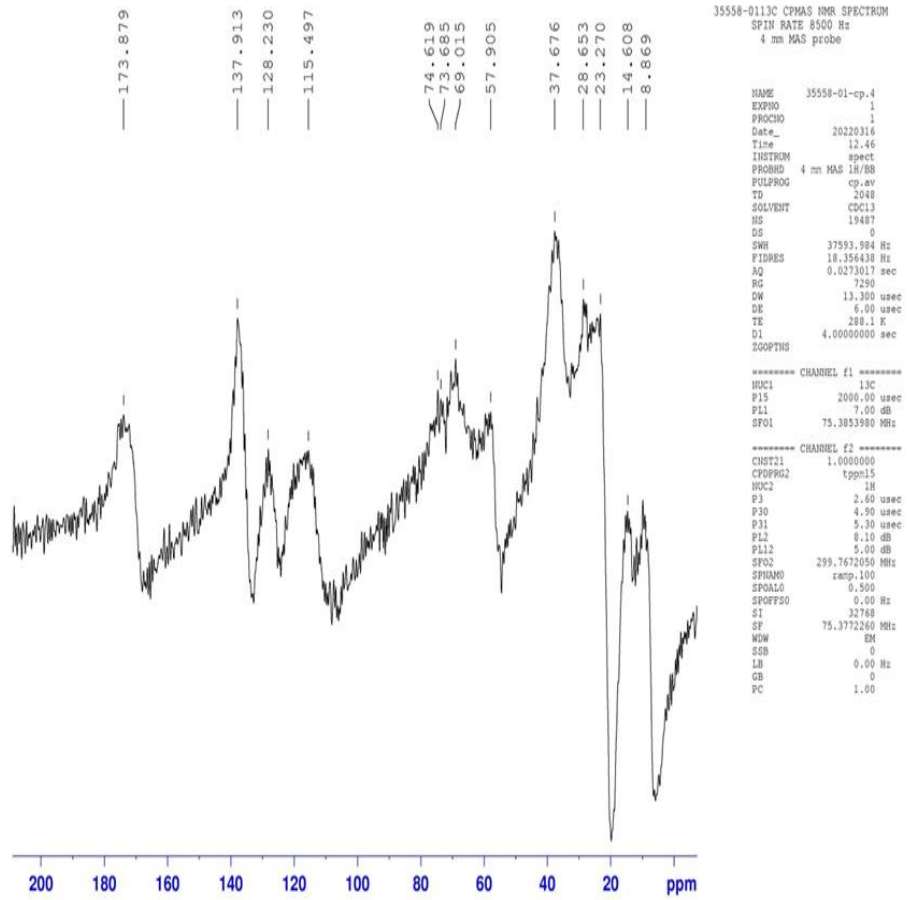
Sentezlenen durağan fazların yapı analizi ve karakterizasyonu için kullanılan diğer bir spektroskopi yöntemi FTIR analizidir. Modifiye edilmemiş silika jel (A) ve SP-Ch-IlePBA (B) FTIR spektrumları Şekil 3.11'de verilmiştir. Serbest silikanın FTIR spektrumunda 1638 cm^{-1} 'de güçlü bir sinyal varken, bu sinyalin SP-Ch-IlePBA'nın FTIR spektrumunda kaybolduğu görülmüş, ancak 1661 cm^{-1} 'de bir C=O amid gerilme sinyali gözlenmiştir. 1460 ve 1548 cm^{-1} 'de –aromatik CH_2 sinyalleri, $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ 'de alifatik CH_3 ve CH_2 sinyalleri görülmektedir. 615 ve 675 cm^{-1} civarında iki sinyal gözlenir, bu sinyaller modifiye edilmemiş silika jel spektrumunda gözlenmez. Ayrıca 900 cm^{-1} civarında zayıf bir sinyal görülmektedir. Bu muhtemelen o bölgede beklenen C-O sinyalidir.

Her iki spektrumda da –OH bandının $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ arasında olması beklenmektedir. Ancak, bu ayırt edici bir sinyal değildir. Modifiye edilmemiş silika jelde Si-OH grupları bulunduğu için bu bandın görülmesi normaldir. Modifikasyon sonrası epoksit halkasının açılması sonucu oluşan C-OH grubunun yanı sıra reaksiyona girmemiş Si-OH grupları da bulunabilir. Bu nedenle FTIR spektrumunda OH bandının görülmesi beklenen bir durumdur. Ayrıca Serbest silika spektrumunda 961 cm^{-1} 'de orta derecede silanol grubunun sinyali görülürken, Si-Ch-IlePBA (962 cm^{-1}) spektrumunda bu sinyalin şiddeti azalmaktadır. Bu da silika yüzeyindeki silanol gruplarının indirgenmiş olduğunu yani modifiye edildiğini göstermektedir.

Si-Ch-IlePBA ayrıca katı hal ^{13}C CPMAS NMR ile karakterize edildi (Şekil 3.12). 170 ppm 'deki sinyal, karbonil gruplarının karbon atomlarına ve $115\text{-}137\text{ ppm}$ arasındaki sinyal, aromatik karbon atomlarına, $8\text{-}37\text{ ppm}$ arasındaki sinyal metil (CH_3) ve metilenin (CH_2) alifatik karbonuna, $57\text{-}74\text{ ppm}$ civarındaki sinyaller, nitrojen ve oksijene bağlı metan (CH) karbonlarına aittir. IR ve NMR sonuçları, organik ligandın silika yüzeyine bağlandığını açıkça doğruladı.



Şekil 3. 11 Blanc silika (A) ve Si-Ch-IlePBA (B) FTIR spektrumları.

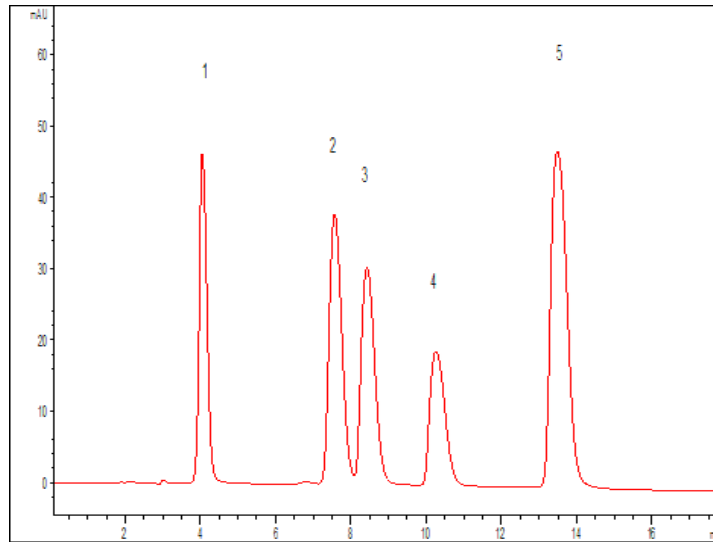


Şekil 3. 12 SP-Ch-IlePBA (8 saatlik tarama)'nın ¹³C CPMAS NMR Spektrumu.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. HILIC koşulları altında nükleotidlerin/nükleositlerin ayrılması

Nükleotidler ve nükleositler, temel özelliklere sahip polar bileşiklerdir. Geleneksel RP kolonları ile ayrılmaları çok zordur. Bu nedenle, HILIC kolonları genellikle bunların ayrılması için kullanılır (Liu ve ark. 2015, Liang ve ark. 2015). Nükleobazlar, HILIC koşulları altında karışık modlu bir kolonun performansını incelemek için çok iyi bir test bileşikleri modelidir. Aral ve arkadaşları geliştirdikleri çeşitli karma modlu kolonlar ile nükleotid ve nükleosit karışımının ayrılmasını başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir (Aral ve ark. 2015, Aral ve ark. 2017, Aral ve ark. 2016). 2017 yılında yayınladıkları makalede (Aral ve ark. 2014), 10 dakikada 6 nükleotidin ayrıldığını tespit etmişlerdir. HILIC koşulları altında Si-Ch-IlePBA'nın performansını incelemek için test bileşikleri olarak beş nükleotid/nükleosit (Şekil 3.1) kullanıldı. Mobil faz olarak Su/ACN: 30/70 çözücü sistemi kullanılarak 0,5 ml/dakikalık bir akış hızında, izokratik koşullar altında 10 dakika içinde 5 nükleotid ayrıldı (Şekil 4.1). Daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında (Liu ve ark. 2017, Liu ve ark. 2015, Aral ve ark. 2014) bu sonucun başarılı olduğu görüldü. Yeni karma mod sabit fazı, SP-Ch-IlePBA, HILIC koşulları altında nükleobazların ayrılması için iyi bir alternatiftir.



Şekil 4. 1 Nükleotidler ve nükleosit karışımının ayrılması: Mobil faz; Su/MeCN: 30/70. Akış Hızı: 0,5 mL/dak., UV: 265 nm. Analitler: 1; Timidin, 2; sitidin, 3; Sitozin, 4; Guanozin, 5; adenin

İncelenen numune karışımındaki beş analitten üçü nükleozid (timidin, sitidin, guanozin) ve ikisi nükleotittir (sitozin ve adenin). Nükleozidlerin kolon üzerinde tutulma süresi guanozin>sitidin>timidindir. Guanozin, iki aromatik halka içeren bir pürin bazı iken sitidin ve timidin, tek bir aromatik halka içeren pirimidin bazlarıdır. Bu nedenle guanozinin yapısında hem daha fazla polar heteroatom hem de daha fazla polar olmayan

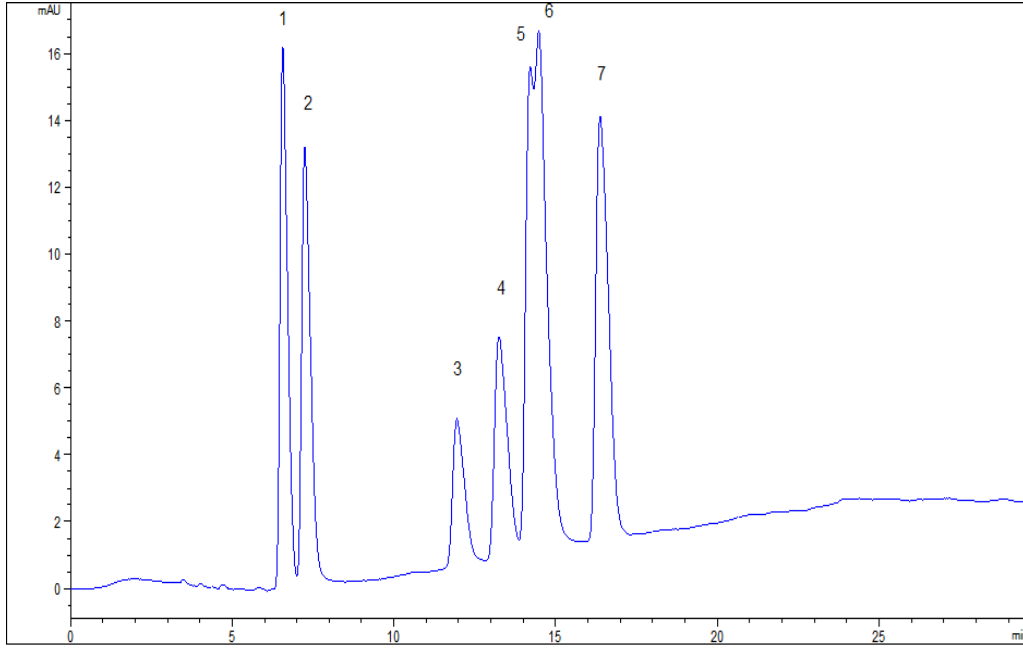
grup bulunur. Bu, guanozinin karışık mod durağan faz ile daha fazla etkileşime girmesine ve üzerinde daha fazla kalmasına neden olur. Sitidin, timidinden daha polardır; sitidin -NH₂ grubuna sahip olduğu için sabit fazın yapısındaki hidroksil, amid ve protonlanmış amin ile daha güçlü polar etkileşim yapabilecek güce sahiptir. Bu nedenle sitidinin timidine göre daha fazla tutunması beklenir. Si-Ch-IlePBA sabit fazının Sitidin ve timidin'e karşı HILIC davranışı gösterirken, guanozin'e karşı karışık mod mekanizması gösterdiği görülmektedir. Öte yandan adenin ve sitozinin tutunma sürelerine baktığımızda; aralarında büyük bir fark olduğu görülmektedir. Guanozin için yukarıda açıklanan aynı neden, adenin'in sitozinden daha fazla tutunmasına neden olur. Nükleotidler ve nükleositler arasında başka bir karşılaştırma yapılabilir. Daha polar sitidin, kolonu sitozinden daha önce terk ederken; Benzer şekilde, guanozinin kolonu adeninden daha erken terk ettiği gözlemlendi. Daha fazla polar grubun kolonu daha hızlı terk etmesi klasik ters faz davranışdır. Ancak ön deneylerde mobil fazdaki su içeriği arttıkça tüm analitlerin analiz süreleri kısalmıştır. Bu klasik HILIC davranışdır. Bu sonuçlar, Si-Ch-IlePBA sabit fazının hem hidrofilik hem de hidrofobik etkileşimlere sahip olduğunu ve karışık modlu bir ayırma mekanizması sergilediğini göstermektedir.

4.2. HILIC koşulları altında suda çözünen vitaminlerin ayrılması

Vitaminler, organizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için ihtiyaç duydukları çok önemli bir bileşik sınıfıdır (Aral ve ark. 2021). Organizmada çok az miktarda vitamin bulunması yaşamsal faaliyetler için yeterlidir. B vitaminleri siyanokobalamin (B12 vitamini), tiamin (B1 vitamini), riboflavin (B2 vitamini), nikotinik asit (B3 vitamini), piridoksin (B6 vitamini) ve C vitamini (askorbik asit) suda çözünen vitaminlerdir ve çoğunlukla gıda maddelerinde bulunurlar. Aynı zamanda koenzimler olarak hareket ederler ve enzimlerin aktivitelerini gerçekleştirmelerini sağlarlar (Aral ve ark. 2021, Stoker H.S. 2006).

Suda çözünen vitaminler oldukça polar ve yapısal olarak karmaşık bileşiklerdir. Konvansiyonel ters fazlı kolonlar üzerindeki analizleri çok zordur. Nükleobazlar gibi, onları geleneksel ters faz kolonlarında ayırmada birçok zorlukla karşılaşılır. Bu nedenle, son yıllarda HILIC ve karışık modlu kolonlarla ayrılmaları ve analizleri popülerlik kazanmıştır (Karatapanis, 2010, Karatapanis,2009). Aral ve ark. tarafından geliştirilen karma modlu bir kolon kullanarak yedi tane suda çözünen vitaminlerin 25 dakikada ayrımı gerçekleştirildi (Aral ve ark. 2021). Bu nedenle, suda çözünen vitaminler, yeni geliştirilen karma mod kolonumuzun özelliklerini ve davranışını incelemek için ideal bir bileşik grubudur. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, yedi tane suda çözünen

vitaminlerin(Şekil 3.2), gradient mobil faz koşulları altında yeni durağan faz olan Si-Ch-IlePBA ile başarılı bir şekilde ayrımı yapıldı.



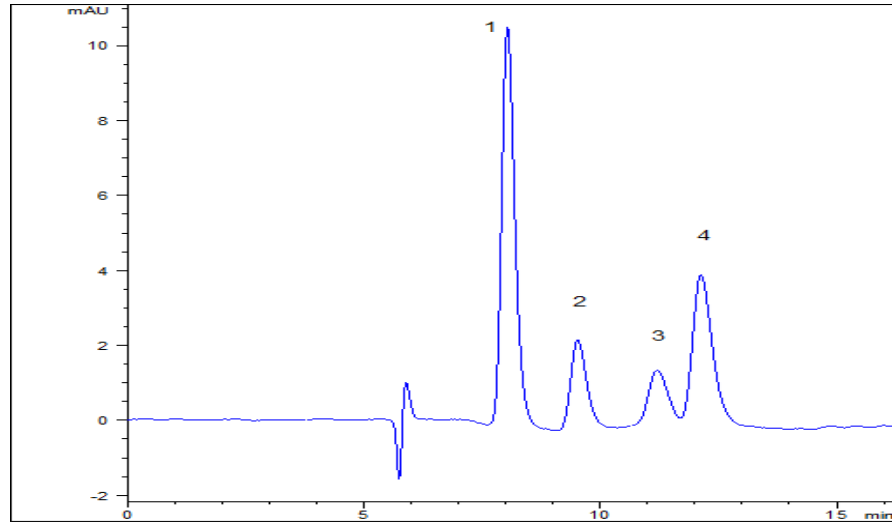
Şekil 4. 2 Suda çözünen vitaminlerin ayrılması: Gradyan: B'de % A iken A = Amonyum asetat (pH 4.50, 20 mM) ve B = MeCN. 0-5 dakika, % 10 A, 5-20 dakika; %10-40 A. Akış: 1 mL/dak. UV: 280 nm. Analitler: 1, Nikotin amid; 2, B3; 3, B6; 4, C; 5, B2; 6, B1; 7, B12.

Suda çözünen yedi tane vitaminin sabit fazda tutunma sürelerine bakıldığında, nikotin amid ve nikotinic asit gibi yüksek apolar karaktere sahip analitlerin kolonu erken terk ettiği, buna karşın birçok polar ve apolar gruplar içeren büyük kompleks bir bileşik olan vitamin B12'nin yapısındaki bu gruplar sayesinde kolonla daha güçlü etkileştiği ve kolonu daha geç terk ettiği görüldü. Benzer şekilde yapısında üç aromatik halka ve beş hidroksil grubu bulunan B2'nin, kolona B12'den sonra en çok tutunan ikinci analit olduğu tespit edildi. B2 ve B12 vitaminlerinin kolonda yüksek oranda tutulmasının nedeni ancak karışık mod ayırma mekanizması ile açıklanabilir. Yapısında iki hidroksil grubu ve bir aromatik halka bulunan B6 vitamini üçüncü sırada kolonu terk ederken, dört hidroksil grubuna sahip olan C vitamini dördüncü sırada kolonu terk etti. İlk dört satırda kolondan ayrılan analitler dikkate alındığında Si-Ch-IlePBA'nın HILIC davranışı gösterdiği, ancak kolondan en son çıkan üç analit göz önüne alındığında kolonun karışık mod ayırma mekanizması sergilediği anlaşılmaktadır.

4.3.RP Koşullarında Sudan Boyalarının Ayrılması

Sudan boyaları, gıda endüstrisinde gıda boyası olarak sıklıkla kullanılan, sağlığa zararlı aromatik bileşiklerdir. Yüksek konjuge aromatik yapılar içeren çok hidrofobik bileşikler oldukları için klasik RP kolonları ile başarılı bir şekilde ayrılabilirler ancak

HILIC kolonları ile ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle bu bileşiklerin karma mod özelliği olan kolonlarla ayrılabilmesi çok önemlidir. Aral ve ark. 2013 yılında (Aral ve ar. 2014), karışık mod özelliği ile yeni geliştirilen polar gömülü kolon ile Sudan boyalarının RP koşulları altında ayrılmasını başarıyla gerçekleştirdiler. Bununla birlikte, bu kolon yüksek polariteye sahip olduğundan, ters faz koşulları altında başarılı sonuçlar verdi, ancak HILIC koşulları altında nükleotidler/nükleozitler gibi polar bileşikleri ayırmada başarısız oldu. Durağan bir faz yapısında polar grup sayısı arttıkça, kolonun polar olmayan bileşikler olan Sudan boyalarını ayırması zorlaşır. Ancak, kimyasal yapıda polar ve polar olmayan gruplar eşit olarak dağılmışsa, bu bileşikleri karışık modlu kolonlarla ayırmak mümkündür. Bu nedenle, ayırma verimliliğini incelemek ve yeni durağan fazın karışık mod mekanizmasını anlamak için test bileşikleri olarak dört sudan boyası (Şekil 3.3) kullanıldı. Çeşitli deneysel koşullar test edildikten sonra optimum koşulların 55/45: MeCN/su mobil faz sistemi, 1.2 mL/dk akış hızı, 40 °C sıcaklık ve 504 nm'de izokratik elüsyon olduğu tespit edildi. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi, bu koşullar altında 14 dakika içinde dört Sudan boyası ayrıldı. Analitlerin kolondan ayrılma sırası, klasik ters faz davranışına karşılık gelir; daha apolar analit kolonu en son terk etmektedir. Sonuçlar, yeni geliştirilen karma modlu bir kolon olan Si-Ch-IlePBA'nın, polar bileşiklerin yanı sıra yüksek apolar özelliğe sahip bileşiklerin karışımlarını başarılı bir şekilde ayrabildiğini göstermektedir.

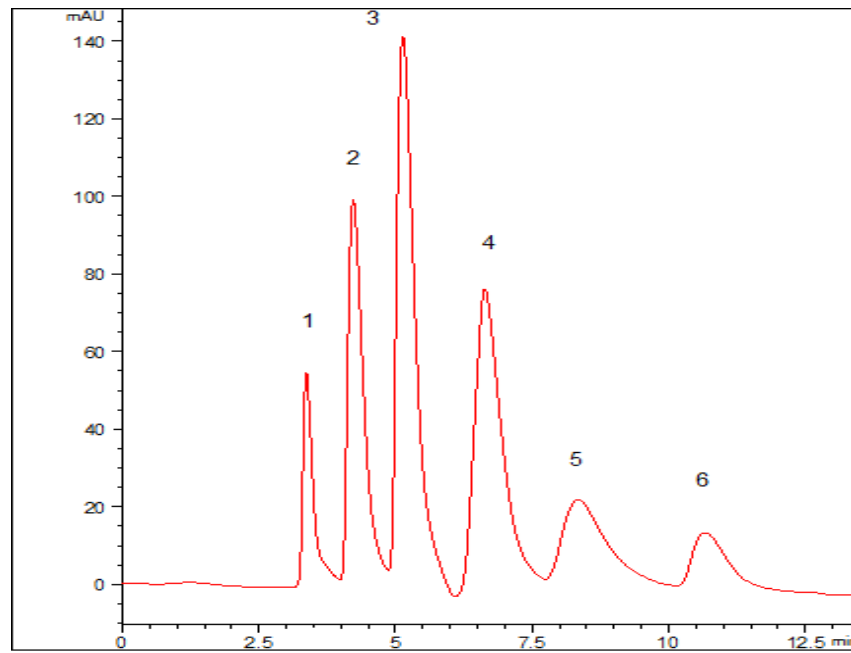


Şekil 4. 3 Sudan Boyalarının Ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 55/45. Akış: 1 mL/dak. Sıcaklık: 30 °C
UV: 506 nm. Analitler: 1, Sudan I; 2, Sudan II; 3, Sudan III; 4, Sudan IV

4.4. RP koşulları altında benzoik asitlerin ayrılması

Benzoik asitler orta polariteye sahip asidik aromatik bileşiklerdir ve klasik ters faz kolonları ile başarılı bir şekilde ayrılırlar. Yeni geliştirilen karışık mod durağan fazın

özelliklerini incelemek ve ayırma mekanizması hakkında daha detaylı bilgi elde etmek için test bileşikleri olarak benzoik asit türevlerinin kullanılması önemlidir. Bu nedenle, mevcut çalışmamızda test bileşikleri olarak altı benzoik asit türevi (Şekil 3.4) kullanılmıştır. Mobil faz oranı, pH, sıcaklık ve akış hızı gibi çeşitli deneysel koşulları test ettikten sonra, en iyi ayırmanın MeCN/tampon (amonyum asetat pH 5.23, 20 mM) : 87/13 mobil faz, 1 ml/dk akış hızı ve 230 nm dalga boyunda izokratik elüsyon şartları altında olduğu görüldü. Bu koşullar altında, 12 dakikada altı tane benzoik asit türevi ayrıldı. (Şekil 4.4). Yeni kolon bu analitleri başarılı bir şekilde ayırabilmiş olsa da, birçok deneysel koşul denenmesine tam bir baseline ayırma elde edilememiştir.

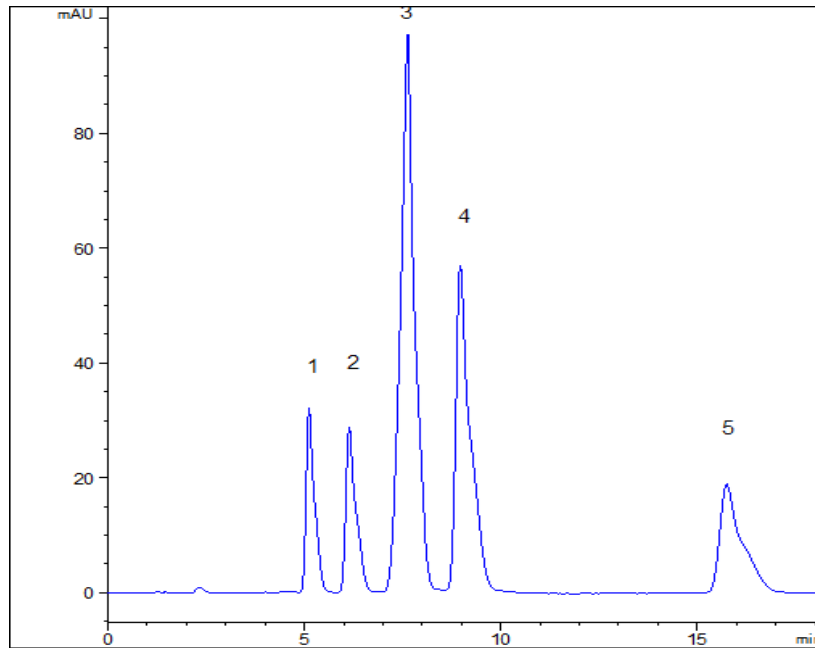


Şekil 4. 4 Benzoik asit türevlerinin ayrılması: Mobil faz; MeCN/tampon (amonyum asetat pH 5.23, 20 mM): 13/87. Akış: 1 mL/dak. UV: 230 nm. Analitler: 1, Sülfanilik asit; 2, Benzoik asit; 3, 3,5-Dinitrobenzoik asit; 4, 4-Aminobenzoik asit; 5, 4-Metilbenzoik asit; 6, Salisilik asit.

Analitlerin kolondan ayrılma sırası oldukça karmaşık görünmektedir. Tutunma süreleri ne HILIC ne de RP davranışları ile uyumlu değildir. İlk üç sırada kolondan ayrılan analitlerin suda çözünürlüklerine göre sırası şu şekildedir: Sülfanilik asit > Benzoik asit > 3,5-Dinitrobenzoik asit. Bu sıra, kolondan ayrılma sırası ile de aynıdır. Dolayısıyla bu sonuç klasik RP davranışı ile uyumludur. Ancak mevcut analitler arasında suda çözünürlüğü yüksek olan analitlerden biri olan 4-aminobenzoik asit kolonu dördüncü, suda çözünürlüğü yüksek olan salisilik asit ise kolondan son olarak ayrılmaktadır. Bu, analitler ve sabit faz arasında çok çeşitli hidrofilik ve hidrofobik etkileşimleri içeren karmaşık bir mekanizmanın varlığını kanıtlar.

4.5. RP Koşullarında Alkilbenzenlerin Ayrılması

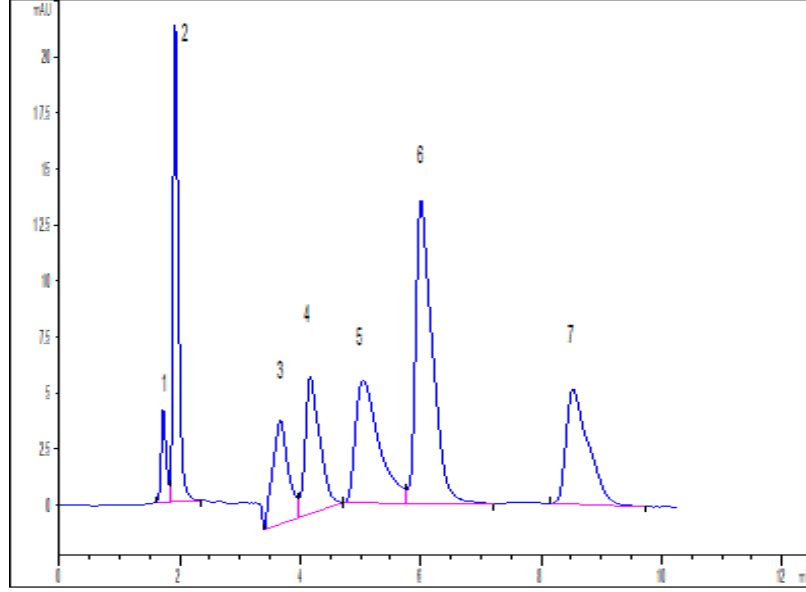
Alkil benzenler, benzen halkası üzerinde farklı alkil grupları içeren tamamen hidrofobik bileşiklerdir. Bu bileşikler, yeni geliştirilmiş bir kolonun klasik ters faz davranışını incelemek için kullanılan ana test bileşikleridir. Mevcut çalışmada, Si-Ch-IlePBA kolonunun ters faz davranışlarını araştırmak için test bileşikleri olarak beş tane alkil benzen (Şekil 3.5) kullanıldı. Farklı mobil faz içerikleri ve oranları, akış hızı ve sıcaklık koşulları test edildikten sonra, beş tane alkil benzen türevinin ayrılması için en iyi koşulun izokratik elüsyon şartları altında MeCN/su: 35/65, 35 °C, 250 nm, 1.2 ml/dk. olduğu tespit edildi. Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, 15 dakika içinde beş tane alkil benzen ayrıldı. Analitlerin kolondan ayrılma sırası, klasik ters faz davranışına karşılık gelir; daha apolar analitin kolonu en geç terk ettiği görüldü. Benzene bağlı alkil grupları arttıkça analitlerin alıkonma süreleri artar. Fenantrenin alıkonma süresi göz önüne alındığında aromatik etkileşimin alifatik etkileşimden daha güçlü olduğu söylenebilir.



Şekil 4. 5 Alkil benzenlerin ayrılması: Mobil faz; 5'li karışım: MeCN/su: 35/65. Akış: 1,2 ml/dak. Sıcaklık: 35 0C. UV: 250 nm. Analitler: 1, Benzen; 2, Toluen; 3, Ksilen; 4, Naftalin; 5, Fenantren.

4.6. Polar/nonpolar bileşiklerin bir karışımının ayrılması

Karışık modlu bir kolonun ayırma performansını görmenin en iyi yolu, numune olarak farklı polaritelere sahip bileşiklerin bir karışımını kullanmaktır. Bu nedenle, test bileşikleri olarak polar, polar olmayan ve orta polariteli bileşiklerden oluşan yedi tane analit (Şekil 3.6) kullanıldı. Şekilde 4.6'da gösterildiği gibi, yedi tane analit Si-Ch-IlePBA kolonu üzerinde 10 dakika içinde ters faz izokratik koşullar altında ayrıldı: MeCN/su: 18/82, 1 mL/dk, 230 nm, 30°C.



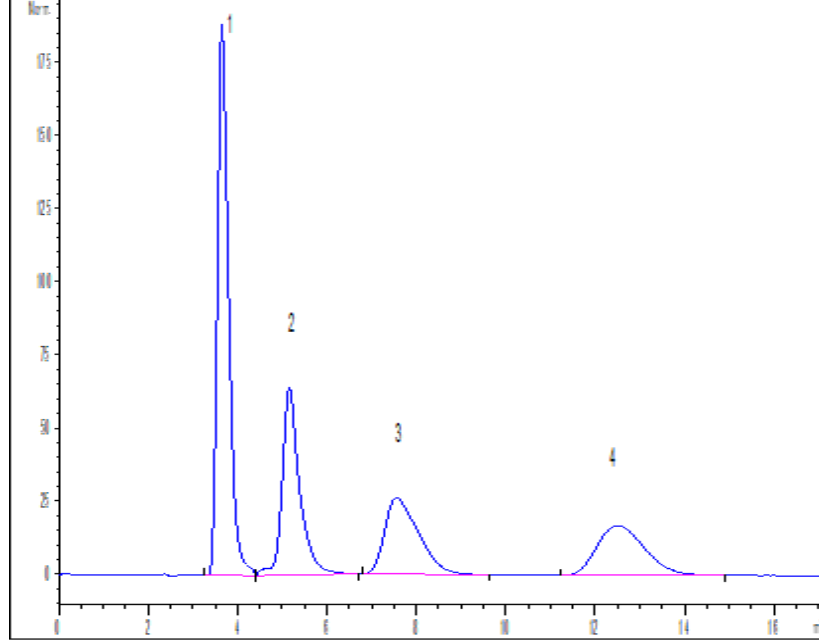
Şekil 4. 6 Polar/polar olmayan karışımın ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 18/82. Akış: 1 mL/dak. Sıcaklık: 30 0C. UV: 230 nm. Analitler: 1, Ftaldialdehit; 2, Benzoik asit; 3, Timin; 4, 4-hidroksibenzaldehit; 5, 2-Aminofenol; 6, Metoksifenol; 7, Asetofenon

Analitlerin alıkonma sırası, benzoik asitlerin davranışı ile benzerlik göstermektedir. Suda çözünürlüğü en yüksek olan timinin klasik RP davranışına göre kolonu ilk sırada terk etmesi gerekirken, üçüncü sırada terk ettiği görülmektedir. Benzer şekilde timinden sonra suda çözünürlüğü diğer analitlere göre daha yüksek olan 4-aminofenolün dördüncü sırada kolonu terk ettiği görülmektedir. Bu davranış, durağan faz ve bu iki analit arasındaki güçlü hidrofilik etkileşimleri (hidrojen bağları, iyon-dipol etkileşimleri, vb.) gösterir. Yüksek hidrofobik özelliklere sahip olan metoksifenol ve asetofenonun kolonunu en son terk etmesi, RP davranışı ile uyumludur. Bunların dışında ön deneylerde mobil fazda MeCN oranı arttıkça tüm analitlerin alıkonma süreleri azalmaktadır. Bu sonuçlar, kolonun bu analit karışımına karşı ağırlıklı olarak RP davranışı göstermesine rağmen, zaman zaman HILIC davranışı da gösterdiğini, dolayısıyla karma modlu bir ayırma mekanizması sergilediğini göstermektedir.

4.7. RP koşulları altında klorlu herbisitlerin ayrılması

Herbisitler, bitkileri yabancı otlardan temizlemek için kullanılan pestisitlerdir. Ancak insan sağlığına zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Sanz ve ark. 2004). Bu nedenle tarım ve gıda endüstrisinde herbisitlerin analizi ve belirlenmesi çok önemlidir (Xiong ve ark. 2014). Klorlu herbisitler, bir herbisit sınıfıdır ve karboksilik asit yapısında hidrofobik bileşiklerdir. Bu nedenle, yeni kolonun bu bileşikleri ayırabilmesi önemlidir. Bu amaçla, mevcut çalışmada test bileşikleri olarak dört herbisit (Şekil 3.7) kullanılmış ve yeni karışık mod kolonda başarılı bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 4.7).

Birçok deneysel koşul test edildikten sonra, bu analitlerin yeni kolonda ayrılması için en iyi izokratik koşulun MeCN/su: 10/90 mobil faz, 0.8 ml/dk akış hızı, 30 °C, 230 nm UV dalga boyu olduğu tespit edildi. Dört tane analitin kolondan ayrılma sırası polardan nonpolara doğru artar. Bu, Si-Ch-IlePBA sabit fazının klorlu herbisitlere karşı ters faz davranışı gösterdiği anlamına gelir.



Şekil 4. 7 Klorlu herbisitlerin ayrılması: Mobil faz; MeCN/su: 10/90. Akış: 0,8 ml/dak. Sıcaklık: 30 0C. UV: 230 nm. Analitler: 1, 2,4-D; 2, 2,4-DP; 3, 2,4,5-T; 4, 2,4-DB.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yeni HPLC durağan fazın sentezi ve karışık mod HPLC uygulamaları, ilk kez bir bağlama reaktifi olarak [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Si-Ch-IlePBA olarak adlandırılan bu karma modlu durağan fazın ayırma performansı, HILIC ve ters faz koşulları altında incelenmiştir. HILIC koşulları, nükleotidlerin/nükleositlerin ve suda çözünen vitaminlerin ayrılmasını başarıyla gerçekleştirdi. Ters faz koşullarında, alkil benzenler, benzoik asitler, Sudan boya, klorlu herbisitler ve çeşitli polar/apolar bileşikler karışımının ayrılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Yeni kolonun yapısındaki amid, hidroksil, amin, alifatik ve aromatik gruplar nedeniyle çok çeşitli hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler gösterdiği, bazen klasik ters faz davranışı, bazen de HILIC veya karmaşık mekanistik özellik sergilediği gözlemlendi. Bu da yeni kolonun karma mod özelliğini kanıtladı. Sonuç olarak, bu yeni kolon birçok polar, polar olmayan ve orta polar analit sınıfını ayırmak için kullanılabilir ve mevcut ticari kolonlara iyi bir alternatif olabilir.

6. KAYNAKÇA

- Abdighahroudi MS, Lutze HV, Schmidt TC. Development of an LC-MS method for determination of nitrogencontaining heterocycles using mixed-mode liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020;412:4921-4930
- Aguilar, M.I. (2004). *HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Amran, M.B.; Aminah, S.; Rusli, H.; Buchari, B. Bentonite-based functional material as preconcentration system for determination of chromium species in water by flow injection analysis technique. *Heliyon* 2020, 6, e04051. [CrossRef] [PubMed]
- Aral H, 2013 (1-2) farklı polaritelere sahip amid-silika kolon dolgu materyallerinin sentezi ve hplc ile çeşitli polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılması. Doktora tezi, Dicle üniversitesi fen bilimleri enstitüsü kimya anabilim dalı.(1-2)
- Aral, H.; Aral, T.; Ziyadanoğulları, B.; Ziyadanoğulları, R. Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones. *Talanta* 2013, 116, 155–163. [CrossRef]
- Aral, H., T. Aral, K. S. Çelik, B. Ziyadanoğulları, R. Ziyadanoğulları, HPLC separation of different groups of small polar compounds on a novel amide-embedded stationary phase, *Chromatographia* 77 (2014) 771-781.
- Aral, T., H. Aral, B. Ziyadanoğulları, R. Ziyadanoğulları, Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications, *Talanta* 131 (2015) 64–73.
- Aral, H. Aral, T. Aral, K.S. Çelik, G. Topal, Preparation of a novel ionic hybrid stationary phase by non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with amino-derivatized silica gel for fast HPLC separation of aromatic compounds. *Talanta* 149 (2016) 21-29 (30)
- Aral, H., K.S. Celik, R. Altindag, T. Aral, Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography, *Talanta* 174 (2017) 703–714.
- Aral, T., H. Aral, B. Ziyadanoğulları, R. Ziyadanoğulları, Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications, *Talanta* 131 (2015) 64–73.
- Aral, T., H. Aral, R. Altındağ, Separation properties of a mixed-mode stationary phase: Hydrophilic interaction liquid chromatography separation of B vitamins, *Fresenius Environmental Bulletin* 30 (11A) (2021) 12588-12594
- Akakaki L.N.H., Airolti C., *Polyhedron* 19 (2000) 367.

- Arkles B., Tailoring Surfaces with Silanes, CHEMTECH, 7, 766, 1977.
- Bai, Q.; Liu, Y.; Wang, Y.; Zhao, K.; Yang, F.; Liu, J.; Shen, J.; Zhao, Q. Protein separation using a novel silica-based RPLC/IEC mixed-mode stationary phase modified with N-methylimidazolium ionic liquid. *Talanta* 2018, 185, 89–97. [CrossRef]
- Barby D., in: G.D. Parfitt, G.S.W. Sing (Eds.), *Silicas in Characterization of Powder Surfaces*, Academic Press, London, UK, 1976, p353.
- Bergqvist Y, Hopstadius C. Simultaneous separation of atovaquone, proguanil and its metabolites on a mixed mode high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;741(2):189-193.
DOI: 10.1016/s0378-4347(00)00082-7
- Bo C, Wang X, Wang C, Wei Y. Preparation of hydrophilic interaction/ ion-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with adjustable selectivity by controlling different ratios of the co-monomers. *Journal of Chromatography A*. 2017;1487:201-210.
DOI: 10.1016/j.chroma.2017.01.061
- Bo, C.; Li, Y.; Liu, B.; Jia, Z.; Dai, X.; Gong, B. Grafting copolymer brushes on polyhedral oligomeric silsesquioxanes silsesquioxanatedecorated silica stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2021, 1659, 462627. [CrossRef] [PubMed]
- Bouvier, E.S.; Koza, S.M. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014, 63, 85–94. [CrossRef]
- Busby, K.N.; Fulzele, A.; Zhang, D.; Bennett, E.J.; Devaraj, N.K. Enzymatic RNA Biotinylation for Affinity Purification and Identification of RNA–Protein Interactions. *ACS Chem. Biol.* 2020, 15, 2247–2258. [CrossRef]
- Calinescu O, Badea IA, Vladescu L, Meltzer V, Pincu E. HPLC separation of acetaminophen and its impurities using a mixed-mode reversed-phase/ cation exchange stationary phase. *Journal of Chromatographic Science*.2012;50(4):335-342.DOI: 10.1093/chromsci/bmr043
- Chan S., Kim J.S., Yi J., *Sep. Sci. Technol.* 37 (2002) 701.
- Chu, Z.; Zhang, L.; Zhang, W. Preparation and evaluation of maltose modified polymer-silica composite based on cross-linked poly glycidyl methacrylate as high performance liquid chromatography stationary phase. *Anal. Chim. Acta* 2018, 1036, 179–186. [CrossRef] [PubMed]
- Cong, H.; Xing, J.; Ding, X.; Zhang, S.; Shen, Y.; Yu, B. Preparation of porous sulfonated poly(styrene-divinylbenzene) microspheres and its application in hydrophilic and chiral separation. *Talanta* 2020, 210, 120586. [CrossRef]

- Daniels, M. W. and Francis, L. F. (1998). Silane Adsorption Behaviour, Microstructure, and Properties of Glycidoxypropyltrimethoxysilane-modified Colloidal Silica Coatings, *J. Colloid. Interface Sci.*, 205: 191–200.
- Debois L.H., Zagarski B.R., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 1190
- Durkee KH, Roh BH, Doellgast GJ. Immunoaffinity chromatographic purification of Russell's viper venom factor X activator using elution in high concentrations of magnesium chloride. *Protein Expression and Purification.* 1993;4(5):405-411. DOI: 10.1006/prep.1993.1053
- Eldin, M.S.M.; Rahman, S.A.; El Fawal, G.F. Novel immobilized Cu²⁺-aminated poly (methyl methacrylate) grafted cellophane membranes for affinity separation of His-Tag chitinase. *Polym. Bull.* 2020, 77, 135–151. [CrossRef]
- Eric L, Caroline W, Elise L, Philippe H, Sophie B. Mixed-mode chromatography—A review. *LCGC Supplements.* 2017;30(6):22-33
- Gambero A., Kubota L.T., Gushikem Y., Airoidi C., Granjeiro J.M., Taga E.M., Alc[^]antara E.F.C., *J. Colloid Interface Sci.* 185 (1997) 313.
- Gao, J.; Luo, G.; Li, Z.; Li, H.; Zhao, L.; Qiu, H. A new strategy for the preparation of mixed-mode chromatographic stationary phases based on modified dialdehyde cellulose. *J. Chromatogr. A* 2020, 1618, 460885. [CrossRef]
- Guo, D.; Lou, C.; Zhang, P.; Zhang, J.; Wang, N.; Wu, S.; Zhu, Y. Polystyrene-divinylbenzene-glycidyl methacrylate stationary phase grafted with poly (amidoamine) dendrimers for ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 2016, 1456, 113–122. [CrossRef]
- Hartmann E, Chen Y, Mant CT, Jungbauer A, Hodges RS. Comparison of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction/cationexchange chromatography for the separation of amphipathic α -helical peptides with L- and D-amino acid substitutions in the hydrophilic face. *Journal of Chromatography A.* 2003;1009:61-71. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00620-4
- Hinterwirth H, Lämmerhofer M, Preinerstorfer B, Gargano A, Reischl R, Bicker W, et al. Selectivity issues in targeted metabolomics: Separation of phosphorylated carbohydrate isomers by mixed-mode hydrophilic interaction/ weak anion exchange chromatography. *Journal of Separation Science.* 2010; 33(21):3273-3282. DOI: 10.1002/jssc.201000412
- He Y, Friese OV, Schlittler MR, Wang Q, Yang X, Bass LA, et al. On-line coupling of size exclusion chromatography with mixed-mode liquid chromatography for comprehensive profiling of biopharmaceutical drug product. *Journal of Chromatography A.* 2012;1262:122-129. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.012
- Hirano A, Shiraki K, Kameda T. Effects of arginine on multimodal chromatography: Experiments and simulations. *Current Protein and Peptide Science.* 2019;20(1):40-48

- Hrobořnová, K.; Moravčík, J.; Lehotay, J.; Armstrong, D.W. Determination of methionine enantiomers by HPLC on the cyclofructanchiral stationary phase. *Anal. Methods* 2015, 7, 4577–4582. [CrossRef]
- Hsieh Y, Duncan CJG, Liu M. A mixed-mode liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of cytarabine in Mouse plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2007;854(1-2):8-12. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.03.034
- Holstein MA, Nikfetrat AA, Gage M, Hirsh AG, Cramer SM. Improving selectivity in multimodal chromatography using controlled pH gradient elution. *Journal of Chromatography A*. 2012;1233:152-155. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.074
- Holstein MA, Parimal S, McCallum SA, Cramer SM. Mobile phase modifier effects in multimodal cation exchange chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012;109(1):176-186. DOI: 10.1002/bit.23318
- Hou Y, Cramer SM. Evaluation of selectivity in multimodal anion Exchange systems: A priori prediction of protein retention and examination of mobile phase modifier effects. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(43):7813- 7820. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.08.080
- Hou, Y.; Lu, J.; Wei, D.; Lv, Y.; He, H.; Wang, C.; He, L. Establishment of substance P modified affinity chromatography for specific detection and enrichment of Mas-related G protein-coupled receptor X2. *J. Chromatogr. A* 2021, 1659, 462633. [CrossRef][PubMed]
- Hu, K., Y. Zhang, J. Liu, K. Chen, W. Zhao, W. Zhu, et al., Development and application of a new 25,27-bis(L-phenylalaninemethylester-N-carbonylmethoxy)-26,28-dihydroxy-para-tert-butylcalix[4]arene stationary phase, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 445–453.
- Hu, K.; Feng, S.; Wu, M.; Wang, S.; Zhao, W.; Jiang, Q.; Yu, A.; Zhang, S. Development of a V-shape bis(tetraoxacalix[2]arene[2]triazine) stationary phase for High performance liquid chromatography. *Talanta* 2014, 130, 63–70. [CrossRef]
- Huang, T.; Zhang, W.; Lei, X.; Chen, H.; Lin, C.; Wu, X. Rapid polymerization of polyhedral oligomeric siloxane-based zwitterionic sulfoalkylbetaine monolithic column in ionic liquid for hydrophilic interaction capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 2021, 1659, 462651. [CrossRef]
- Huberman, L.B.; Wu, V.W.; Kowbel, D.J.; Lee, J.; Daum, C.; Grigoriev, I.V.; O'Malley, R.C.; Glass, N.L. DNA affinity purification sequencing and transcriptional profiling reveal new aspects of nitrogen regulation in a filamentous fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2021, 118, e2009501118. [CrossRef] [PubMed]
- Hosseini, E.S.; Heydar, K.T. Preparation of two amide-bonded stationary phases and comparative evaluation under mixed-mode chromatography. *J. Sep. Sci.* 2021, 44, 2888–2897. [CrossRef] [PubMed]

- Hosseini, E.S.; Heydar, K.T. Silica modification with 9-methylacridine and 9-undecylacridine as mixed-mode stationary phases in HPLC. *Talanta* 2021, 221, 121445. [CrossRef] [PubMed]
- Hovhannisyanyan, R.H.; Carstens, R.P. Affinity chromatography using 20 fluoro-substituted interactions in RNase-rich or RNase-treated extracts. *BioTechniques* 2009, 46, 95–98. [CrossRef]
- Iler R.K., in: *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979.
- Jal P.K., Dutta R.K., Sudershan M., Saha A., Bhattacharyya S.N., Chintalapudi S.N., Mishra B.K., *Talanta* 55 (2001) 233.
- Ji, B.; Yi, G.; Gui, Y.; Zhang, J.; Long, W.; You, M.; Xia, Z.; Fu, Q. High-Efficiency and Versatile Approach To Fabricate Diverse Metal–Organic Framework Coatings on a Support Surface as Stationary Phases for Electrochromatographic Separation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2021, 13, 41075–41083. [CrossRef]
- Jin, G.; Ding, J.; Zhou, Y.; Xia, D.; Guo, Z.; Liang, X. Synthesis and chromatographic evaluation of pyrazinedicarboxylic anhydride bonded stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2021, 1638, 461825. [CrossRef]
- Janco, M.; Iv, J.N.A.; Bouvier, E.S.P.; Morrison, D. Ultra-high performance size-exclusion chromatography of synthetic polymers: Demonstration of capability. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2718–2727. [CrossRef]
- Kadlecová Z, Kozlík P, Tesařová E, Gilar M, Kalíková K. Characterization and comparison of mixed-mode and reversed-phase columns; interaction abilities and applicability for peptide separation. *Journal of Chromatography A.* 2021;1648:462182. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462182
- Kang B, Tang H, Zhao Z, Song S. Hofmeister series: Insights of ion specificity from amphiphilic assembly and Interface property. *ACS Omega.* 2020;5(12):6229-6239. DOI: 10.1021/acsomega.0c00237
- Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D. HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column. *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 909-917.
- Karatapanis, A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, Study of the behavior water-soluble vitamins in HILIC on a diol column, *Chromatographia* 71 (2010) 751-759.
- Kawamura, I.; Mijiddorj, B.; Kayano, Y.; Matsuo, Y.; Ozawa, Y.; Ueda, K.; Sato, H. Separation of D-amino acid-containing peptide phenylseptin using 3,30-phenyl-1,10-binaphthyl-18-crown-6-ether columns. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteom.* 2020,1868, 140429. [CrossRef]
- Kiselyov A.V., Lygin V.I., *Infrared Spectra of Surface Compounds*, Wiley, New York, 1975.
- Kim J.S., Chah S., J. Yi, *Kor. J. Chem. Eng.* 17 (2000) 118.

- Koopal L.K., Yang Y., Minnaard A.J., Theunissen P.L.M., Van Riemsdijk W.H., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspect* 141 (1998) 385.
- Kothencz, R.; Nagy, R.; Bartha, L.; Tóth, J.; Vágó, Á. Analysis of the interaction between polymer and surfactant in aqueous solutions for chemical-enhanced oil recovery. Part. *Sci. Technol.* 2018, 36, 887–890. [CrossRef]
- Kühnreich R, Holzgrabe U. Impurity profiling of L-methionine by HPLC on a mixed mode column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016;122:118-125. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.057
- Lemasson E, Richer Y, Bertin S, et al. Characterization of retention mechanisms in mixed-mode HPLC with a bimodal reversed-phase/cation-exchange stationary phase. *Chromatographia.* 2018;81:87-399. DOI: 10.1007/s10337-018-3477-5
- Lämmerhofer M, Lindner W. Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *Journal of Chromatography A.* 1996;741:33-48. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00137-9
- Lee TD. Introduction to modern liquid chromatography. *Journal of the American Society for Mass Spectrom.* 2011;22:196. DOI: 10.1002/9780470508183
- Liang, T., Q. Fu, A. Shen, H. Wang, Y. Jin, H. Xin, et al., Preparation and chromatographic evaluation of newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 110–118.
- Li D, Dück R, Schmitz OJ. The advantage of mixed-mode separation in the first dimension of comprehensive two-dimensional liquid-chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2014;1358:128-135. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.086
- Li, S.; Li, Z.; Zhang, F.; Geng, H.; Yang, B. A polymer-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Talanta* 2020, 26, 120927. [CrossRef]
- Lin, H.; Ou, J.; Zhang, Z.; Dong, J.; Wu, M.; Zou, H. Facile Preparation of Zwitterionic Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary Column with an Improved “One-Pot” Approach for Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography (HILIC). *Anal. Chem.* 2012, 84, 2721–2728. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, S., H. Xu, J. Yu, D. Li, M. Li, X. Qiao, et al., Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8989–8997.
- Li Y, Xu Z, Feng Y, Liu X, Chen T, Zhang H. Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. *Chromatographia.* 2011;74:523-530. DOI: 10.1007/s10337-011-2120-5

- Liu, X., C. Pohl, New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 83–89.
- Liu X, Pohl CA. HILIC behavior of a reversed-phase/cationexchange/anionexchange trimode column. *Journal of Separation Science*. 2010;33:779-786. DOI: 10.1002/jssc.200900645
- Liu XK, Fang JB, Cauchon N, Zhou P. Direct stability-indicating method development and validation for analysis of etidronate disodium using a mixed-mode column and charged aerosol detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;46(4):639-644. DOI: 10.1007/s00216-020-02665-x
- Mallik, A.K., T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara, Novel approach for the separation of shape-constrained isomers with alternating copolymer-grafted silica in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3320–3328.
- Mallik, A.K.; Noguchi, H.; Han, Y.; Kuwahara, Y.; Takafuji, M.; Ihara, H. Enhancement of Thermal Stability and Selectivity by Introducing Aminotriazine Comonomer to Poly(Octadecyl Acrylate)-Grafted Silica as Chromatography Matrix. *Separations* 2018,5, 15. [CrossRef]
- Maria S, Joucla G, Garbay B, Dieryck W, Lomenech A-M, Santarelli X, et al. Purification process of recombinant monoclonal antibodies with mixed mode chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1393:57-64. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.03.018
- Martinlinna, J. P., Lassila, L. V. J., Yli-Urpo, A. and Vallittu, P. K. (2004). An Introduction to Silanes and their Clinical Applications in Dentistry, *Int. J. Prosthodont.*, 17: 155–64.
- Mant, CT., Hodges RS. Mixed-mode hydrophilic interaction/cationexchange chromatography: Separation of complex mixtures of peptides of varying charge and hydrophobicity. *Journal of Separation Science*. 2008;31:1573-1584. DOI: 10.1002/jssc.200700619
- Mittal, K. L. (1992). *Silane and Other Coupling Agents*, pp. 21–22, VSP, Utrecht, The Netherlands
- Moravcová, D.; Planeta, J. Monolithic Silica Capillary Columns with Improved Retention and Selectivity for Amino Acids. *Separations* 2018, 5, 48. [CrossRef]
- Ngoc-Van Thi Nguyen Submitted: January 13th, 2022 Reviewed: March 17th, 2022 Published: April 23rd, 2022, *Analytical Liquid Chromatography - New Perspectives* DOI: 10.5772/intechopen.104545
- Nováková L, Vlčková H, Petr S. Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives. *Talanta*. 2012;93:0-105. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.01.054
- Ohyama, K., Y. Inoue, N. Kishikawa, N. Kuroda, Preparation and characterization

- of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 257–260.
- Ong S.W, Zhao X.L., Eisenthal K.B., *Chem. Phys. Lett.* 191 (1992), 327.
- Plato. (1888). *Timaeus*, English translation by Archerr, R. D. Hinds, McMillan and Co., London.
- Perez-Moral, N.; Plankeele, J.-M.; Domoney, C.; Warren, F.J. Ultra-high performance liquid chromatography-size exclusion chromatography (UPLC-SEC) as an efficient tool for the rapid and highly informative characterisation of biopolymers. *Carbohydr. Polym.* 2018, 196, 422–426. [CrossRef] [PubMed]
- Pirkle WH, Pochapsky TC. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chemical Reviews.* 1989;89:347-362. DOI: 10.1021/ cr00092a006
- Plueddemann, E. P. (1991). *Silane Coupling Agents*, 3rd edn, Plenum Press, New York.
- Qiao, L., S. Wang, H. Li, Y. Shan, A. Dou, X. Shi, et al., A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014) 240–247.
- Qiu, X.; Liu, Y.; Zhao, T.; Zuo, L.; Ma, X.; Shan, G. Separation of chiral and achiral impurities in paroxetine hydrochloride in a single run using supercritical fluid chromatography with a polysaccharide stationary phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022, 208,114458. [CrossRef]
- Ray, S., M. Takafuji, H. Ihara, Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: mixed mode behavior, *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 43–52.
- Ranney, M. W., Berger, S. E. and Marsden, J. G. (1972). *Reinforcement of Elastomers by Fillers: Review of*
- Riguero, V.; Clifford, R.; Dawley, M.; Dickson, M.; Gastfriend, B.; Thompson, C.; Wang, S.-C.; O'Connor, E. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *J. Chromatogr. A* 2020, 1629, 461505. [CrossRef]
- Roverso M, Di Gangi IM, Favaro G, Pastore P, Bogialli S. Use of a mixed cationic-reverse phase column for analyzing small highly polar metabolic markers in biological fluids for multiclass LC-HRMS method. *Applied Sciences.* 2020;10(20):7137. DOI: 10.3390/ app10207137
- Rusli, H.; Putri, R.M.; Alni, A. Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. *Molecules* 2022, 27, 907. <https://doi.org/10.3390/ molecules2703090>

- Sanz, C.P. Sanz, R. Halko, Z.S. Ferrera, J.S. Rodriguez, Micellar extraction of organophosphorus pesticides and their determination by liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 265–270.
- Sathitnaitam, S.; Suttangkakul, A.; Wonnapijit, P.; McQueen-Mason, S.J.; Vuttipongchaikij, S. Gel-permeation chromatography–enzyme-linked immunosorbent assay method for systematic mass distribution profiling of plant cell wall matrix polysaccharides. *Plant J.* 2021, 106, 1776–1790. [CrossRef] [PubMed]
- Shen, A, X. Li, X. Dong, J. wei, Z. Guo, X. Liang, Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 63–69.
- Snyder, LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 1997
- Stoker, H.S. *General Organic and Biological Chemistry*. 5th edition, MA: Houghton Mifflin Co, Boston, USA, 2006.
- Sun M., H. Qiu, L.Wang, X. Liu, S. Jiang, Poly(1-allylimidazole)-grafted silica, a new specific stationary phase for reversed-phase and anion-exchange liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3904–3909.
- Sun, M.; Feng, J.; Luo, C.; Liu, X.; Jiang, S. Benzimidazole modified silica as a novel reversed-phase and anion-exchange mixed-mode stationary phase for HPLC. *Talanta* 2013, 105, 135–141. [CrossRef] [PubMed]
- Sun WY, Lu QW, Gao H, et al. Simultaneous determination of hydrophilic and lipophilic constituents in herbal medicines using directlycoupled reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatographytandem mass spectrometry. *Scientific Reports*. 2017;7:7061. DOI: 10.1038/ s41598-017-07087-x
- Sýkora D, Řezanka P, Záruba K, Král V. Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases. *Journal of Separation Science*. 2019;42(1):89-129. DOI: 10.1002/ jssc.201801048
- Szabo G., S.L. Prosser, R.A. Bulman, *Chemosphere* 21 (1990) 777.
- Szabo G., G. Farkas, R.A. Bulman, *Chemosphere* 24 (1992) 403.
- Taylor T. Mixed-mode HPLC separations: What, why, and how. *LCGC North America*. 2014;32:226
- Taraji M, Haddad PR, Amos RI, alebi M, Szucs R, Dolan JW, et al. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2018;1000:20-40

- Tee, D. I., Mariatti, M., Azizn, A., See, C. H. and Chong, K. F. (2007). Effect of Silane-based Coupling Agents on the Properties of Silver Nanoparticles Filled Epoxy Composites, *Composite Science and Technology*
- Walter TH, Alden BA, Field JA, Lawrence NL, Osterman DL, Patel AV, et al. Characterization of a highly stable mixed-mode reversed-phase/weakanion-exchange stationary phase based on hybrid organic/inorganic particles. *Journal of Separation Science*. 2021;44:1005-1014. DOI: 10.1002/jssc.202001136
- Wan QH. *Mixed-mode Chromatography Principles, Methods, and Applications*. Chapter 3. Berlin, Germany: Springer; 2021. pp. 71-117
- Wang, Q.; Ye, M.; Xu, L.; Shi, Z.-G. A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications. *Anal. Chim. Acta* 2015, 888, 182–190. [CrossRef]
- Wang Q , Long Y, Yao L, Xu L, Shi ZG, Xu L. Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/ hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase. *Talanta*. 2016;146:442-451. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.09.009
- Vagenende V, Yap MG, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009;48(46): 11084-11096. DOI: 10.1021/bi900649t
- Weetall H.H., *Covalent Coupling Methods for Inorganic Supports Materials*, *Methods in Enzymology*, vol. 135, Academic Press, New York, 1987.
- Wei, J., Z. Guo, P. Zhang, F. Zhang, B. Yang, X. Liang, A new reversed-phase/strong anion-exchange mixed-mode stationary phase based on polar-copolymerized approach and its application in the enrichment of aristolochic acids, *J.Chromatogr. A* 1246 (2012) 129–136.
- Wu, Q.; Hou, X.; Lv, H.; Li, H.; Zhao, L.; Qiu, H. Synthesis of octadecylamine-derived carbon dots and application in reversed phase/hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2021, 1656, 462548. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, Q.; Hou, X.; Zhang, X.; Li, H.; Zhao, L.; Lv, H. Amphipathic carbon quantum dots-functionalized silica stationary phase for reversed phase/hydrophilic interaction chromatography. *Talanta* 2021, 226, 122148. [CrossRef] [PubMed]
- Xiong, W. Xiong, X. Tao, S. Pang, X. Yang, G.L. Tang, Z. Bian, Separation and quantitation of three acidic herbicide residues in tobacco and soil by dispersive solid-phase extraction and UPLC–MS/MS, *J. Chromatog. Sci.*52 (2014) 1326–1331
- Xiong, C.; Yuan, J.; Wang, Z.; Wang, S.; Yuan, C.; Wang, L. Preparation and evaluation of a hydrophilic interaction and cationexchange chromatography stationary phase modified with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *J. Chromatogr. A* 1546, 56–65. [CrossRef] [PubMed]

- Yan Y, Xing T, Wang S, Daly TJ, Li N. Coupling mixed-mode size exclusion chromatography with native mass spectrometry for sensitive detection and quantitation of homodimer impurities in bispecific IgG. *Analytical Chemistry*. 2019;91(17):11417-11424. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02793
- Yang X, Zhang Y, Wang F, Wang LJ, Richardson D, Shameem M, et al. Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixedmode chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2015;484:173-179.DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.014
- Yang Y, Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218:8813- 8825. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.009
- Yu, J.; Wey, M.; Firooz, S.K.; Armstrong, D.W. Ionizable Cyclofructan 6-Based Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Using Superficially Porous Particles. *Chromatographia* 2021, 84, 821–832. [CrossRef]
- Zeng, R.; Jin, B.-K.; Yang, Z.-H.; Guan, R.; Quan, C. Preparation of a modified crosslinked chitosan/polyvinyl alcohol blended affinity membrane for purification of His-tagged protein. *J. Appl. Polym. Sci.* 2019, 136, 47347. [CrossRef]
- Zhang K, Liu X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;128:73-88. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.007
- Zhang K, Dai L, Chetwyn NP. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(37):5776-5784. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.07.035
- Zheng W, Borgia A, Buholzer K, Grishaev A, Schuler B, Best RB. Probing the action of chemical denaturant on an intrinsically disordered protein by simulation and experiment. *Journal of the American Chemical Society*. 2016;138(36):11702-11713. DOI: 10.1021/jacs.6b05443
- Zheng Y, Liu H, Ma G, Yang P, Zhang L, Gu Y, et al. Determination of S-propargyl-cysteine in rat plasma by mixed-mode reversed-phase and cation-exchange HPLC–MS/MS method and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;54(5):1187-1191. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.11.027
- . Zhao, W.; Zhang, C.; Yan, Z.; Zhou, Y.; Li, J.; Xie, Y.; Bai, L.; Jiang, L.; Li, F. Preparation, characterization, and performance evaluation of UiO-66 analogues as stationary phase in HPLC for the separation of substituted benzenes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *PLoS ONE* 2017, 12, e0178513. [CrossRef]
- Zong, R.; Wang, X.; Yin, H.; Li, Z.; Huang, C.; Xiang, Y.; Ye, N. Capillary coated with three-dimensional covalent organic frameworks for separation of fluoroquinolones by open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 2021, 1656, 462549. [CrossRef]

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Yaşar MUMİN
Uyruğu : T.C.

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	Mazıdağı lisesi / MARDİN	2005
Üniversite	: Dicle Üniversitesi / DİYARBAKIR	2012
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi / BATMAN	Devam
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012-2014	Diyarbakır valiliği	Kimya Öğretmeni
2014-2015	Dicle eğitim kurumları	Kimya Öğretmeni
2015-	Milli Eğitim Bakanlığı	Kimya Öğretmeni

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER: İNGİLİZCE

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR*