



**T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C12-Hidroksi Mixed-Mod Kolonu ile Sülfanamid İlaçların HPLC
Ayrılması, Karma Mod Ayırma Mekanizmasının Kantitatif
Parametrelerle İncelenmesi**

Yekun ALTUN

**Ocak-2025
BATMAN**

**T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**C12-Hidroksi Mixed-Mod Kolonu ile Sülfanamid İlaçların HPLC
Ayrılması, Karma Mod Ayırma Mekanizmasının Kantitatif
Parametrelerle İncelenmesi**

Yekun ALTUN

**Danışman
Dr.Öğr.Üyesi Hayriye ARAL**

Diğer Jüri Yeleri

**Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL**

**Ocak 2025
BATMAN**

TEZ KABUL VE ONAYI

Yekun ALTUN tarafından hazırlanan “C12-Hidroksi Mixed-Mod Kolonu ile Sülfanamid İlaçların HPLC Ayrılması, Karma Mod Ayırma Mekanizmasının Kantitatif Parametrelerle İncelenmesi” adlı tez çalışması 15/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Danışman

Unvanı Adı SOYADI

Dr.Öğr.Üyesi Hayriye ARAL

Üye

Unvanı Adı SOYADI

Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Murat ÖTER
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

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 beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabullendiğimi bildiririm.

ETHICAL DECLARATION

I declare that all the information in this thesis has been obtained within the framework of ethical behavior and academic rules, and that the source of any statements and information that do not belong to me in this study prepared in accordance with the thesis writing rules has been fully cited, and I declare that I accept all kinds of legal responsibility in case of any contrary situation.

İmza
Yekun ALTUN
Tarih: 15/01/2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

C12-Hidroksi Mixed-Mod Kolonu ile Sülfonamid İlaçların HPLC Ayrılması, Karma Mod Ayırma Mekanizmasının Kantitatif Parametrelerle İncelenmesi

Yekun ALTUN

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Hayriye ARAL

2025, 58 Sayfa

Sülfonamidler geniş spektrumlu antibakteriyel etkilere sahiptir. Ancak, yaygın kullanımları, antimikrobiyal direnç gibi sağlık risklerini beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, sülfonamid kalıntılarının varlığını izlemek için gelişmiş ve doğru analitik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, hem hidrofobik bir C12 zinciri hem de hidrofilik bir diol grubu içeren bir C12-diol karma modlu kolonda sekiz sülfonamid karışımı ayrılmıştır. pH, tampon konsantrasyonu, mobil faz bileşimi, sıcaklık ve akış hızı gibi çeşitli deneysel parametrelerin kolonun ayırma verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tüm sekiz sülfonamid, 15 °C'de 250 nm dalga boyunda ve asetonitril/fosfat tamponu (pH 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄) çözeltisi ile gradyan elüsyon kullanılarak 20 dakika içinde ayrılmıştır. 3 ila 7 arasında değişen pH değerlerinde analitlerin alıkonma zamanlarının incelenmesi, sülfonamidlerin ortamın asitliğinden önemli ölçüde etkilendiğini ve böylece karma modlu ayırma mekanizmasının ayrıntılı bir şekilde tartışılmasını sağlamıştır. Sekiz sülfonamid ile C12-diol karma modlu kolon arasındaki etkileşim mekanizması, logD, logS ve pKa gibi kantitatif yapı-aktivite ilişkisi parametreleri kullanılarak araştırılmıştır. Sülfonamidler ile C12-diol karma modlu kolon arasındaki etkileşim kısmen klasik ters faz özelliğini göstermesine rağmen, polar etkileşimler önemli bir rol oynamış ve karma modlu etkileşim mekanizması polar ve apolar etkileşimler tarafından domine edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, hem ayırma performansı hem de tutulma davranışı açısından ticari bir ODS-C18 kolonuyla karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karma Mod, Sülfonamidler, alıkonma mekanizması, LogD, LogS, yapı-alıkonma ilişkisi

ABSTRACT

MASTER THESIS

Yekun ALTUN

Batman University Graduate Education Institute

Chemistry Department of Science

Advisor: Dr.Öğr.Üyesi Hayriye ARAL

2025, 58 Pages

Sulfonamides exhibit broad-spectrum antibacterial effects. However, their extensive use poses health risks, such as antimicrobial resistance. Therefore, advanced and accurate analytical techniques to monitor the presence of sulfonamide residues are needed. In this study, a mixture of eight sulfonamides was separated on a C12-diol mixed-mode column containing both a hydrophobic C12 chain and a hydrophilic diol group. The influence of various experimental parameters, including pH, buffer concentration, mobile phase composition, temperature, and flow rate, on the separation efficiency of the column was investigated. All eight sulfonamides were separated within 20 min via gradient elution with an acetonitrile/phosphate buffer (pH 6.5, 40 mM KH₂PO₄ /K₂HPO₄) solution at 15 °C and a detection wavelength of 250 nm. Examination of the retention times of the analytes at different pH values ranging from 3 to 7 revealed that the sulfonamides were significantly affected by the acidity of the medium, thus enabling a detailed discussion of the mixed-mode separation mechanism. The interaction mechanism between the eight sulfonamides and the C12-diol mixed-mode column was explored using quantitative structure–retention relationship parameters such as logD, logS, and pKa. Although the interaction of the sulfonamides with the C12-diol mixed-mode column partly showed the classic reverse-phase feature, polar interactions played a major role, and the mixed-mode interaction mechanism was dominated by polar and apolar interactions. The obtained results were compared with a commercial ODS-C18 column in terms of both separation performance and retention behavior.

Keywords: mixed-mode, sulfonamides, retention mechanism, logD, logS, quantitative structure–retention relationship

ÖN SÖZ

Çalışma sürecinde her türlü yol gösterici ve her konuda yardımcı olan, olumlu tavrı ile kısıtlı imkanlarda bile fırsat üreten, çalışmaya farklı açılardan bakmamı sağlayan, her türlü sorumu cevaplayan ve bilgi birikimi ile bana ışık olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Hayriye ARAL'a sonsuz teşekkür ederim. Bu çalışmayı yapmamda büyük emekleri olan, bilgi birikimini ve desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr.Tarık ARAL'a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında önemli yardımlarını gördüğüm ve güler yüz ve yardımseverliklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Meryem DOKDEMİR'e ve Kübra TUNÇ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı yapmam için bana laboratuvar imkanı sunan kimya bölüm başkanlığına teşekkür ederim. Ayrıca tüm hayatım boyunca maddi manevi benim yanımda olan, aldığım kararları destekleyen ve cesaretlendiren babam Sinan ALTUN'a, annem Şerife ALTUN'a, bütün maneviyatları ile yanımda olan kardeşlerim Lezin, Ali, Arafat ve Hevi'ye ve çok değerli arkadaşım Hatice ÇOLAK'a her türlü desteği için teşekkür ederim.

Yekun ALTUN
BATMAN-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar/ ÇİZELGELER LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.2. Sıvı Kromatografisinde Bileşiklerin Ayrılma İlkeleri.....	1
Affinite	4
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. Küçük Kiral Bileşikler İçin Yeni Sabit Fazların Geliştirilmesi	7
2.2. Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH'ların) Ayrılması İçin Sabit Fazların Geliştirilmesi.....	12
2.3. Karma Mod Kromatografisi.....	15
3. YÖNTEM	25
3.1. Malzemeler	25
3.2. HPLC Koşulları	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerine pH'ın Etkisi	30
4.2. Mobil Faz Bileşiminin Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerine Etkisi	32
4.3. Tampon Konsantrasyonunun Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerindeki Etkisi	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
5.1 Sonuçlar	45
5.2 Öneriler	45
KAYNAKLAR	47
EKLER	59

TABLOLAR/ ÇİZELGELER LİSTESİ

Tablo 1.1. Sıvı kromatografi türleri, bileşiklerin ayrılma prensipleri ve sıvı kromatografisi alanındaki son gelişmeler. (Rusli vd. 2022, s.3,4,5) sayfa. 4,5,6

Tablo 4.1. Bu çalışmada kullanılan sülfonamidlerin hesaplanan logD1, logS1 ve pKa değeri Bulgular ve tartışma sayfa. 29

Tablo 4.2. Van't Hoff eşitliğinden elde edilen ΔH° ve ΔS° değerleri (Şekil 4.6.B) Sülfonamidlerin ayrılması ve alıkonması üzerine sıcaklığın etkisi sayfa. 41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

ABDMS: aminobütildimetilmetoksisilane

ACN: Asetonitril

CD: Karbon noktaları

C-CP: Kapiler kanallı polimer

CSP'ler: Kiral sabit fazlar

EC: Elektron Kromatografisi

EtOH: Etanol

EPI: Epiklorohidrin

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)

GPC: Jel Geçirgenlik Kromatografisi

GC: Gaz Kromatografisi

HCIC: Hidrofobik yük indüksiyon kromatografisi

HIC: Hidrofobik etkileşim kromatografisi

HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi)

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

IEC: İyon Değişim Kromatografisi

IC: İyon Kromatografisi

IL: iyonik sıvı

LC: sıvı kromatografi

logD: Bir bileşiğin dağılım katsayısının PH'a bağlı logaritmik değeri

logS: Bir bileşiğin suda çözünürlük derecesinin logaritmik bir ölçüsüdür

MCC: Çok Kolonlu Kromatografisi

MeOH: Metanol

MMC: Karma Mod Kromatografisi

MOF'ler: metal-organik çerçeveler

MS: kütle spektrometrisi

NPLC: Normal-Phase Liquid Chromatography (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi)

PAH: Polisiklik Hidrokarbonlar

PEME: poli(etilen-alt-maleat)ester

pCEC: basınçlandırılmış kapiler elektro-kromatografi

RP-HPLC: ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi

RPLC: Reversed-Phase Liquid Chromatography (Ters Faz Sıvı Kromatografisi)

SEC: Boyut Dışlama Kromatografisi

SEM: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)

SDM: sülfadimetoksin

SDZ: sülfadiazin

SMOP: sülfametoksipiridazin

SMR: sülfamerazin

SMZ: sülfametazin

SMX: sülfametoksazol

SPE: katı faz ekstraksiyonu

STZ: sülfatiazol

SQX: sülfakionoksalin

UV: Ultraviyole, güneşten gelen ışık enerjisinin bir türü

UV-VIS: Ultraviyole ve görünür ışık (absorpsiyon spektroskopisi)

WCX: Zayıf katyon değişim kromatografisi

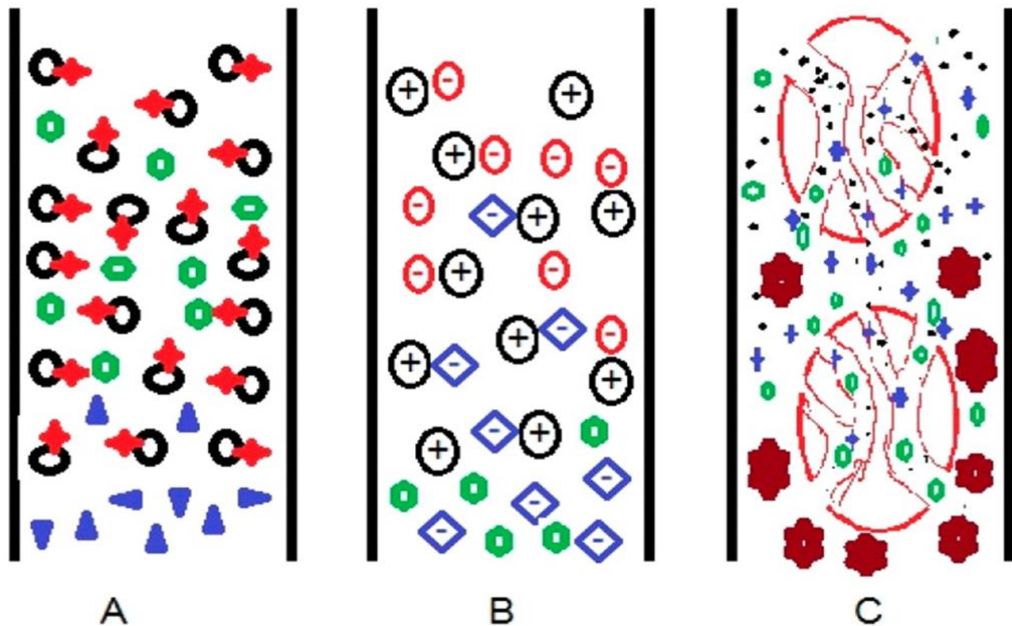
1. GİRİŞ

1.1.Bileşik Ayırma ve Sıvı Kromatografisi

Ayırma, ister doğal bir ürün isterse sentetik bir ürün olsun, belirli bir bileşiği izole etmek için kritik bir süreçtir. Bir ayırma sürecindeki en büyük zorluk, rasemik ve homolog karışımlar gibi iki veya daha fazla bileşik arasındaki yüksek benzerliktir. Sıvı kromatografisinin, bu sorunlara etkili bir çözüm olduğu kanıtlanmıştır. Sıvı kromatografisi ayırmanın anahtarı, iyi bir alıkonma ve elüsyon sürecidir. Sabit fazlar, sıvı kromatografisinde bileşikleri ayırmak için esastır. Hem preparatif hem de kantitatif türlerde çeşitli sıvı kromatografi kolonları kullanılmakta ve geliştirilmektedir. Bu nedenle, sıvı kromatografisi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmakta ve bunlara kolaylıkla erişilebilmektedir.

1.2.Sıvı Kromatografisinde Bileşiklerin Ayrılma İlkeleri

Sıvı kromatografi sistemiyle bileşiklerin ayrılması, örnekte bulunan bileşiklerin sabit ve mobil fazlarla olan farklı etkileşimleri sayesinde mümkündür (Şekil 1.1). Sabit fazlar, bileşiklerin ayrılmasını sağlamak için çeşitli mekanizmalara göre geliştirilebilir.



Şekil.1.1. (A) afinite, (B) elektrostatik kuvvetler ve (C) sıvı kromatografisindeki boyut farkına dayalı olarak kolon ve hedef moleküller arasındaki fiziksel etkileşimlerin şeması. Rusli'den (2022) Eldin vd. (2020, s.77)

Afiniteye dayalı ayırmada (A) bileşiklere olan afinite farkları, (B) hedef bileşiklerle elektrostatik kuvvetlerin gücündeki farklılıklar ve (C) hedef bileşiklerin boyut farklılıkları. Bu etkileşim modlarından biri veya daha fazlası, sıvı kromatografisi kullanılarak bileşik ayırma yol açacaktır. Ticari veya gelişmekte olan uygun kolonları seçmek kullanıcı için biraz kafa zor olabilir. Etkileşim modlarını anlamak, kullanıcılara belirli bir analit türü için uygun kolonları seçmelerine yardımcı olacaktır. Şekil 1.1.A, belirli fonksiyonel gruplara (kırmızı) sahip sabit faz parçacıkları (siyah), bir etkileşim ağı aracılığı ile spesifik bağlanma yoluyla uygun bileşiklerle (yeşil) etkileşime girerek kolonda tutunmaya neden olur. Sabit faz, etkileşime girmeyen bileşikler(mor) tutmaz ve bileşikler sabit faza tutunmadan sabit fazı terk ederler. Bu ayırma modundaki yaygın etkileşimler, dipol-dipol iletişimleri, London kuvvetleri ve kompleks oluşumdur. Hidrojen bağı ve dipol-dipol etkileşimlerinin birleşimi, hidrofilik etkileşimi sağlarken, London kuvvetleri hidrofobik etkileşimleri temsil eder.

Kompleks oluşumu genellikle analitlerin protein (Riguero vd. 2020; Zeng vd. 2019, s.136), DNA, (Huberman vd. 2021, s.118) ve RNA (Busby vd. 2020, s.15; Hovhannisyan vd. 2009, s.46) olduğu kromatografide meydana gelir. Sabit faz, ligand-metal kompleks bağlanma bölgesine sahip olan bir makromolekül ile modifiye edilir. Analitler ile sabit faz arasındaki daha güçlü bir etkileşim, alıkonma süresini artırırken, daha zayıf bir etkileşim alıkonma süresini azaltır. Hiçbir afinite etkileşimi olmayan analitler bulmak neredeyse imkansızdır. Sabit faz ve analitler çok farklı polaritelere sahip olsa ve hiçbir fonksiyonel grup etkileşime giremese bile, London kuvvetleri her zaman vardır. Her molekül etkileşime girer. Her molekül, farklı fonksiyonel grupları, atom numaraları ve 3D yapıları nedeniyle farklı şekilde etkileşime girer. Bu fark, analog Moravcova vd. (2018, s.5) ve homolog bileşiklerin (Cong vd. 2020, s.210; Wang vd. 2015, s.888) ayrılmasını sağlar.

Sadece elektrostatik ayrılmaya dayalı ayırım modu, katyonik türler ile anyonik türler arasında Coulomb kuvvetlerinin oluşmasını gerektirir. Sabit faz üzerindeki fonksiyonel grupların türüne ve deneysel koşullara bağlı olarak katyon ya da anyon olarak işlev görebilir. Şekil 1.1.B'de görüldüğü gibi, mavi renkle gösterilen anyon, sabit fazdaki katyona (siyah) elektrostatik kuvvetler aracılığıyla bağlanır ve sabit faz ile kırmızı renkli

analitlerden daha güçlü etkileştiği için kırmızı renkli analitlerle yer değiştirir. Yeşil renkle gösterilen bileşik ise ne pozitif ne de negatif yüklü yani nötral olduğundan, sabit fazdaki katyon ile herhangi bir Coulomb etkileşimi yapmaz ve sabit fazda tutunmadan elüe edilir. Aynı ilke, katyonik bileşiklerin anyonik sabit fazlar kullanılarak ayrılmasında da geçerlidir. Moleküllerin daha yüksek yük yoğunluğu, daha güçlü bir elektrostatik kuvvet oluşturur ve bu da daha uzun bir alıkonma süresiyle sonuçlanır.

Bu tür elektrostatik kuvvetler, iyon değişim kromatografisi (IEC) veya iyon kromatografisi (IC) sistemlerinde yaygın olarak kullanılır. Sabit fazın ve analitin yükü, mobil faz sisteminin pH'ı veya bileşimi ayarlanarak değiştirilebilir, böylece ayrılma gerçekleştirilebilir. pH ayarı, zayıf asit veya zayıf baz olan molekülleri etkiler. Mobil fazdaki değişiklikler, yeni geçici moleküllerin oluşmasına veya moleküllerin 3D konformasyonunda değişikliklere neden olabilir. Bir mobil faz sisteminde değişebilecek değişkenler; tuz konsantrasyonu, tampon tipi ve kompleks oluşturan ligandlardır. Örnek olarak kullanılan analit türleri küçük iyonlar (Amran vd. 2020, s.6; Guo vd. 2016, s.1456) ve makromoleküllerdir. Zhang vd. (2014, s.1343).

Genellikle, daha küçük boyutlu analit sabit fazın gözeneklerinde daha uzun süre tutulur, bu nedenle alıkonma süresi daha büyük bileşiklere kıyasla artar (Şekil 1.1.C'de gösterildiği gibi). Genel olarak, bu sistem 2000 ile 20.000.000 amu (dalton) arasındaki büyük molekül kütleli bileşikler, örneğin proteinler. (Bouvier ve Koza. 2014, s.63; Sathitnaitham vd. 2021, s.106), karbonhidratlar, Perez-Moral vd. (2018, s.196), yüzey aktif maddeler Kothencz vd. (2018, s.36) ve polimerler Janco vd. (2013, s.36) gibi, ayırmak için kullanılır.

Yukarıda belirtilen ayrılma modlarından ikisinin veya üçünün birleştirilmesi, yalnızca bir modun uygulanmasına kıyasla daha etkili bileşik ayrımı sağlayabilir.

Kiral kromatografi, boyut dışlama ve afinitiyeye temelli ayırma prensiplerini bir arada kullanır. Elektro-kromatografi (EC) (Huang vd. 2021, s.1659; Ji vd. 2021, s.13), proteinler ve DNA'nın ayrılmasında yaygın olarak kullanılır ve boyut ile elektrostatik ayırım prensiplerini birleştirir. Daha yüksek yük yoğunluğuna sahip bileşikler, düşük yük yoğunluğuna sahip olanlara göre daha hızlı elüe edilir. Karma mod kromatografisi (MMC) (Qiao vd. 2014, s.1360; Aral vd. 2015, s.131), özellikle mobil fazdaki ölçüm koşullarına bağlı olarak en az iki tür kromatografinin kullanılabileceği bir sistemdir.

Tablo 1.1. son 10 yılda geliştirilen çeşitli kromatografi türlerine dair örnekleri özetlemektedir. Teorik olarak, kullanılabilecek mobil faz kombinasyonları sınırsızdır. Ancak, sabit ve mobil fazlar arasındaki uyumluluk dikkatle değerlendirilmelidir. Mobil

faz karışımları birbiriyle tamamen karışabilir olmalıdır. Ayrıca, mobil faz sabit faza zarar vermemeli veya onu çözmemelidir.

Tablo 1.1. Sıvı kromatografisi türleri, ayrılma prensipleri ve sıvı kromatografisi alanındaki yeni gelişmeler. (Rusli vd. 2022, s.3,4,5)

Sıvı kromatografi modu	Ayrılma prensibi	Sabit Faz	Analit	Mobil Faz
Ters Faz Kromatografisi	Affinite	Silika, oktadesil akrilat ve 2-vinil-4,6-diamino 1,3,5-triazine ile modifiye edilmiştir. Mallik vd. (2018, s.5)	PAH'lar	Metanol
	Affinite	Silika, oktadesil akrilat ve N-metilmaleimid ile modifiye edilmiştir. Mallik vd. (2018, S.1555)	PAH'lar ve Tokoferoller	Metanol ve Su Karışımı
	Affinite	Silika, N-Boc-fenilalanin ve sikloheksamin ile modifiye edilmiştir. Aral vd. (2013, s.116)	Fitohormonlar	Fosfat Tamponu ve Asetonitril karışımı
	Affinite	Zr ₆ O ₄ (OH) ₄ MOF, 2-amino-tereftalik asit veya 4,4'-bifenildikarboksilik asit ile modifiye edilmiştir. Zhao vd. (2017, s.12)	PAH'lar ve Aromatik Bileşikler	Metanol ve Su Karışımı
Hidrofobik Etkileşimli Sıvı Kromatografisi	İyonik	Silika, (2-(metakriloloksi-etil) dimetil-(3 sülfonilpropil) amonyum hidroksit veya 2-metakriloyoksietil fosforilkolin ile modifiye edilmiştir. S. Li vd. (2020, s.26)	Toluen, Formamid, Dimetil formamid ve Tiyoüre Karışımı	Su ve Asetonitril Karışımı
	Affinite	Amino silika, poliedral oligomerik silseskioksan ve akrilamid türevleri ile modifiye edilmiştir. Bo vd. (2021, s.1659)	Nükleozidler, Organik Asitler ve B-Agonistleri	Asetonitril ve Amonyum Formiat Çözeltisi Karışımı
	Affinite	Silika, EGDMA ve maltos ile modifiye edilmiştir. Chu vd. (2018, s.1036)	Nükleobazlar ve Nükleotidler	Su ve Asetonitril Karışımı
	Affinite	Silika, vinil silseskioksan ve ditiotreitol ile modifiye edilmiştir. Lin vd. (2012, s.84)		Oligosakaritler, Alkaloidler ve Organik Asit Grupları
	İyonik ve affinite	Silika, pirazinedikarbodikanhidrit ile modifiye edilmiştir. Jin vd. (2021, s.1638)	Oligosakaritler, alkaloidler ve Organik	Asetonitril, Amonyumformiat çözeltisi, KH ₂ PO ₄
Karma Mod Kromatografisi	İyonik ve affinite	2-metakriloloksietil fosforilkolin ile modifiye edilmiştir silika. Xion vd. (2018, s. 1546)	Asit Grupları Protein ve Lizozim	Çözeltisi, NaCl Çözeltisi Karışımı

	İyonik ve affinite	Silika, oktadesil ve diol grupları ile modifiye edilmiştir. Wang vd. (2015, s. 888)	Aristoloşik Asit ve Türevleri	Formik Asit ve Asetonitril Karışımı
	İyonik ve affinite	Silika, glutatyon ile modifiye edilmiştir. Shen vd. (2013, s. 1314)	Protein	Su, Formik Asit ve Asetonitril Karışımı
	İyonik ve affinite	poli(12-metakriloil dodesil fosfatidik asit-co-etilen glikol dimetakrilat). Peng vd. (2016, s.6)	Keton Aromatikler, Fenol ve Türevleri, Küçük Organik Bileşikler	Amonyum Formiat Çözeltisi ve Asetonitril Karışımı
	Affinite	Amino silika, oktadesil ve karbon noktaları ile modifiye edilmiştir. Wu vd. (2021, s.1656)	PAH'lar, Nükleozidler ve Nükleobazlar	Su ve Metanol, Asetonitril ve Amonyum Asetat Çözeltisi Karışımı
	İyonik ve affinite	Agaroz, 2-Merkapto-1-metilimidazol ile modifiye edilmiştir. Lu vd. (2017, s. 119)	Protein	NaOH Çözeltisi
Affinite Kromatografi	İyonik ve affinite	Ligand kompleksi ile modifiye edilmiş. Sepharose Riguero vd. (2020, s. 1629)	Histidinli Protein	Tris Tamponu, Sodyum Klorür ve İmidazol Karışımı
	İyonik ve affinite	Silika, N-metilimidazoliyum iyonik sıvı ile modifiye edilmiştir. Bai vd. (2018, s. 185)	Protein	Asetonitril, Trifluoroasetik Asit, NaClO ₄ Çözeltisi, KH ₂ PO ₄ Çözeltisi ve NaCl Çözeltisi Karışımı
	İyonik ve affinite	Silika, glutaraldehit ile modifiye edilmiştir. Hou vd. (2021, s. 1659)	Protein	Fosfat Tamponu
İyonik Kromatografi	İyonik	Bentonit, kitosan ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ile modifiye edilmiştir. Amran vd. (2020, s.6)	Cr(III) ve Cr(VI) Çözeltisi	Cr(III) İçin Nitrik Asit Çözeltisi ve Cr(VI) İçin Amonyum Çözeltisi
	İyonik	Polistiren-metakrilat türevleri, poli(amidoamin) ile modifiye edilmiştir. Guo vd. (2016, s. 1456)	Küçük Anyonlar, Nitrat, Sülfatlar, Bromür vb.	NaOH Çözeltisi
Kiral Kromatografi	Boyut ve affinite	Polisakarit, 3-kloro-4-metilfenilkarbamit ile modifiye edilmiştir. Qiu vd. (2022, s. 208)	Paroksetin Hidroklorid Grupları	Süperkritik CO ₂ Metanol ve Amonyum Asetat Çözeltisi Karışımı

	Affinite	İzopropilkarbamat siklofruktan 6 grupları. Hrobo vd. (2015, s. 7)	Metiyonin Grupları	Metanol, Asetonitri l, Asetikasit ve Trietilamin Karışımı
	Boyut	Silika, 3,3'-fenil-1,10-binaftil-18-kron-6-eter ile modifiye edilmiştir. Kawamura vd. (2020, s. 1868)	Amino Asitler ve Peptitler	Perklorik Asit Çözeltisi, Asetontitr il ve Metanol Karışımı
	Affinite	Poli(stiren-divinilbenzen) kaplı çitosan. Cong vd. (2020, s.210)	Benzoin	Su ve Asetontitril Karışımı
Elektrokro mat oğrafi	Boyut ve iyonik	Poli(POSS-co-META-co-DMMSA). Huang vd. (2021, s.1659)	BenzoikAsit, Nükleozidler , Bazlar, Glikopeptitlr	Fosfat Tamponu, Trietilamin ve Asetontitril Karışımı
	Affinite	Silika, metal-organik çerçeve (MOF) ile modifiye edilmiştir. Ji vd. (2021, s.13)	Benzenler ve Türevleri	Fosfat Tamponu ve Asetontitrilkarışımı
Boyut Dışı Kromatogr afi	Boyut	Poli(metakrilik asit-co-etilen glikol dimetakrilat). Sun vd. (2018, s. 185)	Protein	Su ve Asetontitril Karışımı

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Küçük Kiral Bileşikler İçin Yeni Sabit Fazların Geliştirilmesi

Enantiyoseçicilik insan vücudunda ilaç-reseptör etkileşimlerinin temel ve karakteristik bir özelliği vardır; saf olmayan enantiomerik ilaçların yüksek ölüm oranlarına yol açtığı bildirilmiştir. Bunun bir örneği, bilim insanlarını kiral molekül ayırmalarına çok ciddi bir şekilde yönelten talidomid trajedisidir. Blaschke vd. (1979). Kiral sabit fazlar (CSP'ler) kullanarak sıvı kromatografisi (LC), kiral ilaçların enantiyoselektif ayrılması için en yaygın kullanılan tekniktir. Nguyen vd. (2006).

Kromatografik kolonlarda sabit fazların seçimi, moleküllerin ayrılması için kritik bir adımdır. Silika, yüzey kimyası ve yüzey modifikasyonu konusundaki kapsamlı uygulanabilirliği nedeniyle küçük moleküllerin ayrılmasında uzun zamandır tercih edilen bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Ancak, göreceli termal ve kimyasal kararsızlığı, karmaşık moleküller için verimli ayırmaların geliştirilmesindeki kullanımını sınırlamaktadır. Si-O-Si bağı, pH > 8'de, yüksek sıcaklıklarda (>40 °C) ve fosfat ve karbonat gibi çok yaygın ama son derece zararlı türlerin varlığında hidrolize olur. Hatta ılımlı derecede yüksek sıcaklıklarda bile, hafif alkaline olan sulu/organik ortamlarda çözünür. Soukupova vd. (2005)

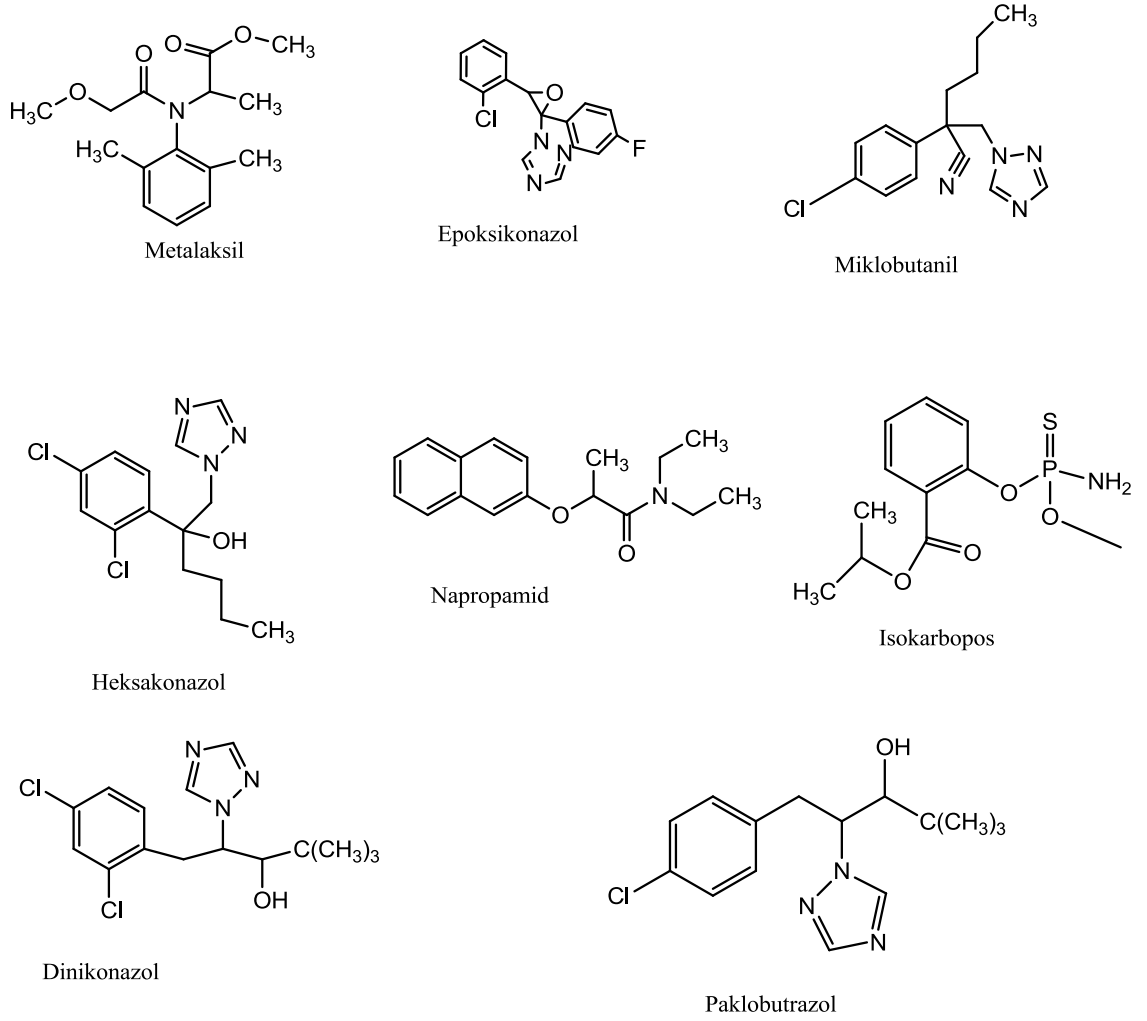
Polimerik ters fazlar, yaygın kullanım koşullarında düşük mekanik kararlılık sergilemelerine rağmen pH 1'den 13'e kadar kararlardır. Çeşitli modifikasyonlara sahip polistiren tabanlı sabit fazların geliştirilmesi hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Svec ve Maya (2014, s.55), çeşitli çapraz bağlayıcılarla polistiren-co-divinilbenzen monolitleri hazırlamış ve bunların küçük kiral moleküllerin ayrılmasındaki kromatografik performansını araştırmıştır. Polimerin modifikasyonları, Fe³⁺ katalizörü kullanılarak Friedel-Crafts reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşullarının, yani

- (i) Öncü monolitlerin polimerizasyonu için kullanılan sıcaklık ve süre
- (ii) Dış çapraz bağlayıcının ve katalizörün miktarı ve yükleme prosedürü ve
- (iii) Friedel-Crafts alkilasyonunun sıcaklığı ve reaksiyon süresi, monolitlerin
- (iv) Özelliklerini ve dolayısıyla kromatografik performanslarını etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Polistiren bazlı polimerik malzemelerin, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) altında alkil aril ketonlar ve barbitüratların ayrılmasında da uygulamaları bildirilmiştir ve bu işlemler yüksek sıcaklıklarda (100–200 °C) gerçekleştirilmiştir. Sanagi ve See (2005, s.32).

Selobiyohidrolaz (CBH), silika jel üzerine immobilize edildikten sonra bir kiral kolon olarak geliştirilen ve Chiralpak CBH'nin bir parçası olarak ticari olarak mevcut olan kiral seçici özellik gösteren bir protein türüdür. Zhao vd. (2018). Fu ve arkadaşları (Fu vd. (2020) β -blokerler, antiasit ve katinon gibi enantiyomerik ilaç karışımlarını ayırmak için Lux Selüloz-1 ve Chiralpak CBH olmak üzere iki tür kolonun kromatografik ayırım özelliğini çalışmıştır. İkisi arasında, Chiralpak CBH kolon temel olarak 5 mM amonyum asetat (pH = 6.4)/metanol (95/5, v/v)'den oluşan mobil faz kullanarak altı kiral ilacı ayırmıştır.

Zhao ve arkadaşları bir toprak örneğinden pestisit karışımının ayrılmasında Zhao vd. (2018). Kiral sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresini kullanmış ve Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi bir dizi numune hazırlığından sonra katı çevresel matrislerdeki sekizkiral pestisit enantiyomerik bileşimini analiz edebilmiştir. S-metalaksil ve R-metalaksilin ayrılması, 0,6 mL/dk akış hızında izokratik modda sulu formik asit (%0,1, v/v) (A) ve asetronitril (B) (60:40, v/v) oranında gerçekleştirilen polisakkarit tabanlı kolon (Chiralcel) kullanılarak elde edilmesi dikkat çekicidir.



Şekil 2.1. Kiral pestisitlerin kimyasal yapıları (Rusli'den (2022) Zaho vd. 2018, s.10)

Kiral bileşiklerin ayrılması için sabit faz geliştirmede bir diğer strateji, genellikle küçük moleküllerden oluşan bir kiral seçici tarafından kiral tanıma temeli üzerine tasarlanmış Pirkle tipi kiral sabit fazların (CSP'ler) kullanılmasını içermektedir. CSP'ler için doğal olarak bol bulunan küçük moleküllerin tercih edilmesi önemlidir. Fenilglisin ve lösin türevleri ile birlikte kinin, CSP'ler olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. (Hora ve Lammerhofer, 2019, s.1596; Yu vd. 2018)

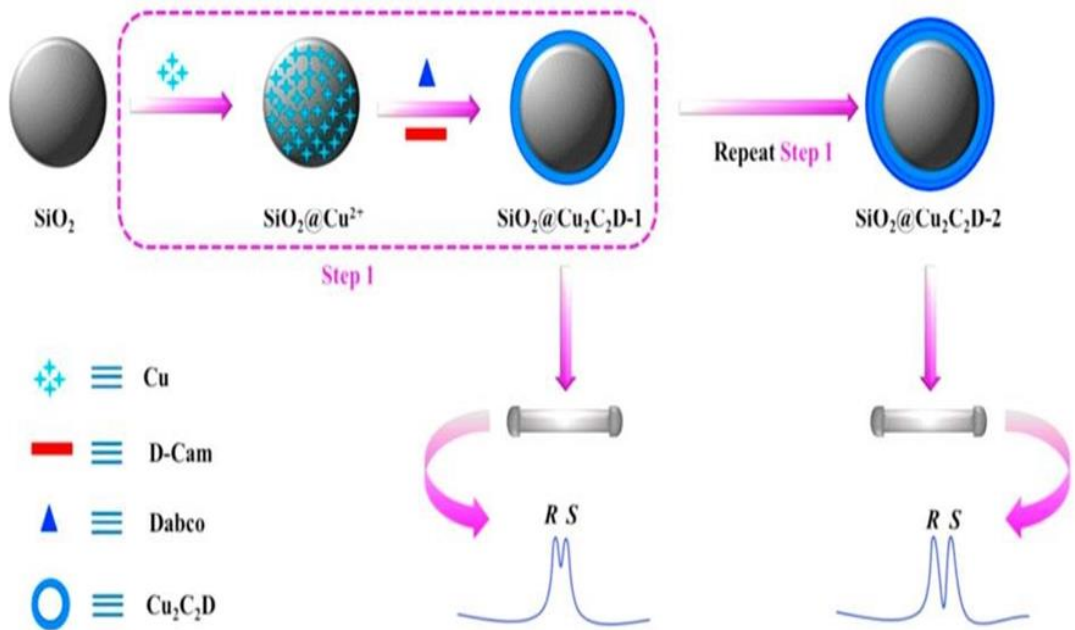
Siklodekstrin, kiral sıvı kromatografi (LC) sabit fazı sentezinde yaygın bir kiral seçici olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda Malsche ve arkadaşları, bu bileşiğin gözenekli silika sütun dizilerinde kaplama uygulamasını rapor ederek, kiral steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların (NSAID'ler) ayrımındaki kromatografik performansını araştırmışlardır. Naghdi vd. (2020). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları

mevcuttur. Kimyasal kaplama yöntemi, amino asitler ve dipeptidlerin enantiyomerik ayrımında üstünlük gösterirken, dinamik kaplama yöntemi ise α -hidroksi asitlerin ayrımında daha başarılıdır. Pittler vd. (2009).

Son zamanlarda kullanılan metal-organik çerçeveler (MOF'ler) dikkat çekmiştir. Ancak, MOF'lerin geniş partikül boyutu dağılımı ve düzensiz şekli gibi bazı zorluklar, düşük kolon verimliliği, istenmeyen kromatografik pik şekli ve yüksek kolon basıncı gibi sorunlara neden olmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek hâlâ ilgi alanı olan araştırma konularıdır. Bu zorlukları aşmaya yönelik bir deneme, Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kiral çekirdek-kabuk mikro kürecik ($\text{Cu}_2(\text{d-Cam})_2(4,40\text{-bpy})_n\text{@SiO}_2$ kompozitinin kiral sabit faz (CSP) olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, alkol, amin, keton, epoksit ve organik bazlar gibi rasemik karışımları başarıyla ayırmıştır. Chen vd. (2021).

Kiral MOF ($\text{Cu}_2((+)\text{-Cam})_2\text{Dabco})(\text{Cu}_2\text{C}_2\text{D})$ ile kiral sabit fazın (CSP) mikrosferik silika parçacıklarına immobilizasyonu için tek adımlı sentez yöntemi, MOF tabanlı kiral sabit fazın hazırlanmasını daha da basit hale getirmiştir. Wanga vd. (2020). Bu yöntemle hazırlanan kiral sıvı kromatografi sabit fazı, asimetrik Michael katılma reaksiyonu sonucu oluşan iki enantiomeri ayırmak için kullanılmıştır.

Şekil 2.2. silika (SiO_2) parçacıklarının bakır ($\text{Cu}(\text{AcO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), D-(+)-Kampforik asit (DCam) ve 1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktan(Dabco) ile modifiye edilerek $\text{SiO}_2\text{@Cu}_2\text{C}_2\text{D}$ yapısının sentez şemasını göstermektedir. Bu işlem, $\text{Cu}_2\text{C}_2\text{D}$ kabuğunu tanıtmaktadır.

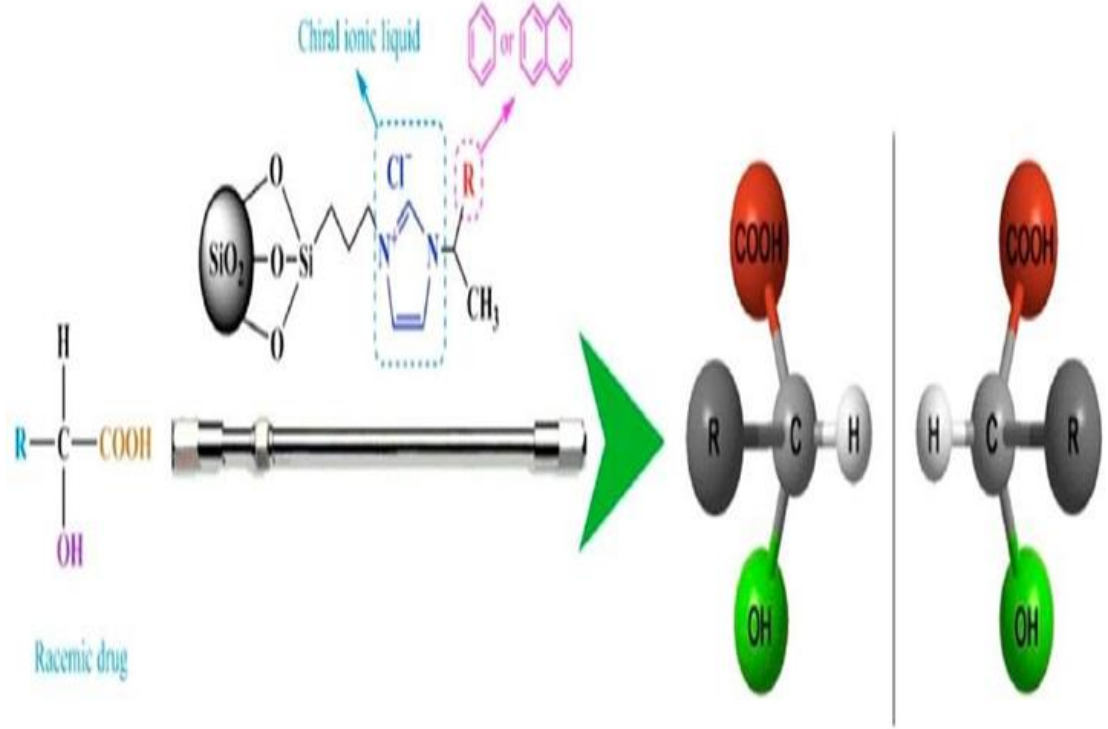


Şekil 2.2. Silika (SiO_2) parçacıklarının bakır ($\text{Cu}(\text{AcO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), D-(+)-Kampfforik asit (DCam) ve 1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktan (Dabco) ile modifikasyonu ile $\text{SiO}_2 @ \text{Cu}_2\text{C}_2\text{D}$ 'nin üretimi. (Rusli, 2022, akt. Wanga vd. 2020, s.218)

İyonik sıvılar (IL'ler), kiral küçük bileşenlerin ayrılmasında umut verici yeni malzemelerdir. IL'lerin Janus davranışı gösterirler, yani iyonik sıvı molekülünün bir ucunda polar (suyu seven), diğer ucunda ise apolar (suyu sevmeyen) özellikler taşıması anlamına gelir. Bu durum, IL'lerin hem polar hem de apolar bileşiklerle etkileşime girmesini sağlar. Bu sayede, IL'ler hem suda hem de organik çözücülerde çözünabilir ve farklı türdeki molekülleri ayırmak için kullanılabilir. Janus özelliklerinden dolayı IL'ler apolar bileşenleri apolar sabit fazlar gibi ve polar bileşenleri ise polar sabit fazlar gibi ayırabilmelerini sağlar. Kiral IL'ler ile ayırım, sıvı katyonik gruplar ile anyon örnekleri arasındaki iyon değişimi etkileşimi yoluyla gerçekleştirilir; bu, kiral asitlerin ayırımında olduğu gibi örneklenebilir. He ve arkadaşları He vd. (2018), imidazol türevleri ile halkasal hekzen oksidin halka açılması yoluyla kiral imidazolyum hazırlamış ve ardından substitüentleri modifiye etmişlerdir.

Ayrıca, kiral IL'ler, silikon küre yüzeyine tıklama kimyası (click chemistry) aracılığıyla immobilize edilmiştir. He vd. (2018) Modifiye edilen substitüentlerin, hem kiral seçicide hem de mobil fazda kiral ayırma yeteneklerini önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir; bu da başka iyon değişimi etkileşimlerinin mevcut olduğunu göstermektedir. Deneylerde çeşitli parametreler araştırılarak, sterik engel, hidrojen bağı ve π - π etkileşimlerinin enantiyoselektivite için hayati öneme sahip olduğu önerilmiştir.

Kiralin imidazolium IL'leri, silikona bağlı olarak CSP'ler olarak kullanılmış ve organik asitlerin ayırımında uygulamaları Huang ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Wang vd. (2016). Kolon malzemesi silikona immobilize edilmiştir ve kiral farmasötiklerin ayırımında potansiyel uygulamalarını göstermiştir. Şekil 2.3. silikona emdirilmiş kiral IL'lerin kolon malzemeleri olarak şematik temsilini sergilemektedir. Substitüentlerin (R) varyasyonları, belirli rasemik ilaçlara yönelik kromatografi performansın ayarlanmasına olanak tanır.



Şekil 2.3. HPLC için kiral imidazolium sabit fazları.(Rusli, 2022, akt. Wang vd. 2016, s.70)
kaynaklı izni ile yeniden basılmıştır.

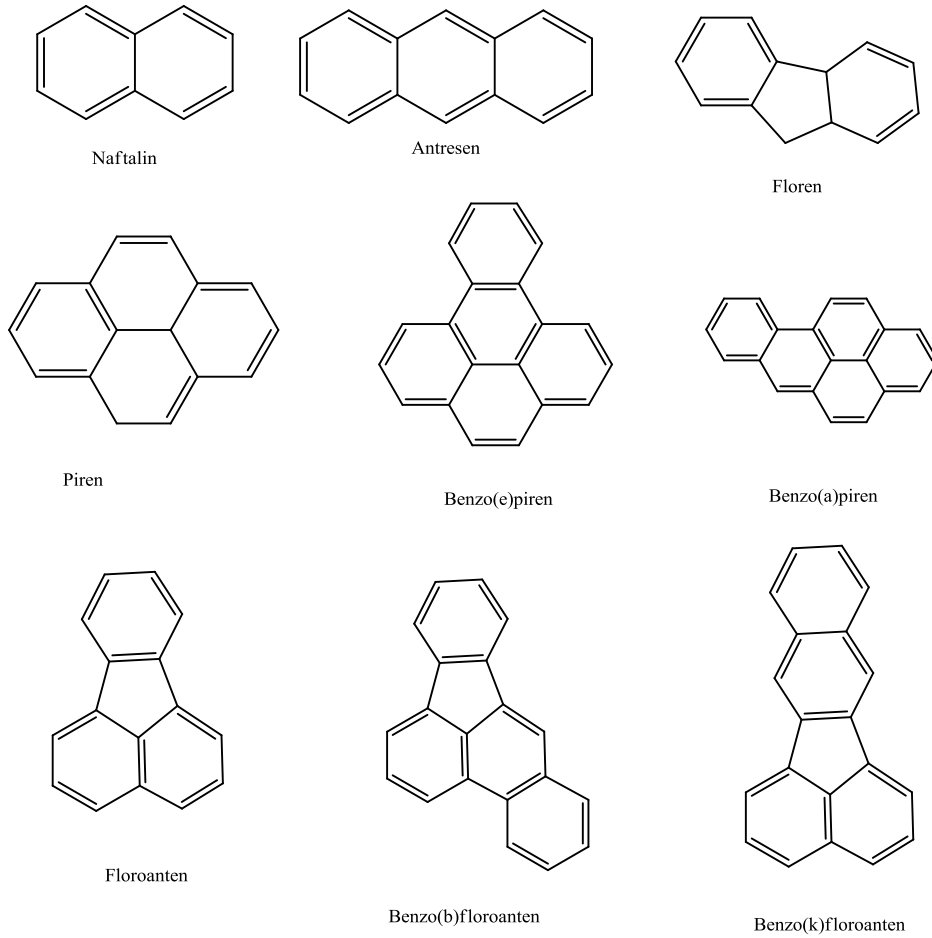
2.2. Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH'ların) Ayrılması İçin Sabit Fazların Geliştirilmesi

Küçük organik bileşiklerden bir diğer sınıf, sırasıyla mikroplastiklerin ardından çevresel sorunlara neden olan başlıca kirleticiler olarak ortaya çıkan poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar)dır. PAH'ların yapıları Şekil 2.4'te gösterilmektedir.

PAH'lar çeşitli yöntemlerle analiz edilebilir; bunlar arasında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)(Chu vd.2021; Dong vd. 2012) ve voltametri Penezi'c vd. (2014) bulunmaktadır. Analiz edilen örnek türleri su örnekleriyle sınırlı kalmamış, aynı zamanda gıda ürünleri Onopiuk vd. (2022) ve kozmetik ürünler Wang vd. (2019) gibi diğer örnekleri de içermektedir. Örneklerin PAH analizi katı faz ekstraksiyonu (SPE) veya sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) ile başlayan bir ekstraksiyon süreci ile başlar.

PAH'ları analiz etmek için en standart HPLC kolonu, yüzeyinde oktadesil işlevsel grubu bulunan silikadır; bu daha çok C18 kolonu olarak bilinir. Lung vd. (2015) Standart

sabit faz, birçok PAH'tan oluşan bir örnek için tatmin edici sonuçlar vermez. Fernandez-Navarro vd. (2012) Bu nedenle, yeni materyaller kullanılarak sabit fazın geliştirilmesi gerekmektedir.



Şekil 2.4. Çeşitli PAH türleri ve bunların türevleri. (Rusli vd. 2022, s.13)

Poliaromatik hidrokarbonların (PAH'lar) analizi için en yaygın olarak geliştirilen ve ticari olarak mevcut olan sabit faz, belirli fonksiyonel gruplara sahip karbon zincirleri ile graftlenmiş silikadır. Silika parçacıklarını hazırlamak için yaygın olarak kullanılan öncüler tetrametoksisilane (TMOS), tetraetoksisilane (TEOS) ve sodyum silikattir. PAH'lar hidrofobik özellikler sergilediğinden hidrofobik bir sabit faza ihtiyaç duyarlar. Silikanın silanol gruplarının varlığı nedeniyle hidrofilik özellikleri vardır; bu nedenle teorik olarak PAH ayrımı için uygun değildir. Bu nedenle, silika yüzeyinin bir modifikatör kullanılarak hidrofobik hale getirilmesi gerekmektedir.

Kullanılan bazı modifikatörler trikloro-oktadesilsilan (TCES), 4aminobütildimetilmetoksisilane (ABDMS), viniltrimetoksisilane (VTMS) ve fenilpropyldimetilklorosilan (PPDMC) gibi bileşenlerdir (Taskin vd. 2018, s.41; Stevenson vd. 2010, s.1217). Geliştirilen modifikatörlerin ortak özellikleri, alkoksi alkil silan ve halojen alkil silan ailelerinin varlığıdır. Modifikatör, hidrofobik silika elde etmek için çoğu silanol grubu ile reaksiyona girer. Silikanın hidrofobikliğini artırmak için bir son kaplama işlemi gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem, kalan silanol gruplarını ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Taskin ve arkadaşları, C18 silika parçacıklarını elde etmek için TCES kullandılar. Önceki araştırmalardan farklı olarak, bu çalışmada TCES ile silika parçacıkları arasındaki reaksiyonun yan ürünü olan piridin, bir HCl bağlayıcısı olarak kullanıldı. Son kaplama işlemi heksametildisilazan kullanılarak gerçekleştirildi. Taskin vd. (2010) Mermat ve ekibi ise daha karmaşık bir yöntem kullandı. Bu grup, silika yüzeyine sitronellol eklemek için bir dizi reaksiyon gerçekleştirdi. Sitronellol, ABDMS bağlayıcı ajanı ve 4'-hidroksi-4-bifenilkarboksil kullanılarak silika yüzeyine bağlandı. Son kaplama işlemi, N-(trimetilsilil)dimetilamin ile gerçekleştirildi. Mermat vd. (2020).

Stevenson ve arkadaşları, bağlayıcı ve son kaplama ajanları olarak sırasıyla fenilpropyldimetilklorosilan ve trimetilklorosilan kullandı. Çalışma, bağlı fenil miktarını artırmanın PAH'ların ayırım verimliliğini artırabileceğini gösterdi. Stevenson vd. (2010) Karbon noktaları (CD), Wu ve arkadaşlarının gösterdiği gibi, eşdeğer C18 tipi ticari kolonlardan daha iyi ayırım verimliliği sağlama yeteneğine sahiptir. CD, sitrik asit ve oktadekanamin kullanılarak solvotermal bir teknikle (yani yüksek sıcaklık ve basınç altında) hazırlandı. Uygun polariteye sahip CD, ardından silika yüzeyine EDC/NHS bağlayıcı ajanı kullanılarak bağlandı. Wu vd. (2021) Ancak, bu çalışmada, ayırım verimliliğini artıracak olan son kaplama işlemi gerçekleştirilmedi.

Parçacık bazlı akrilikler, son yıllarda PAH ayırımı için en yaygın yöntemlerden biri haline gelmiştir. Zhao ve arkadaşları, radikal polimerizasyon ilkesini kullanarak VTMS ile modifiye edilmiş silika yüzeyinde poli(N-izopropil akrilamid) üretebildiler. Zhao vd. (2020).

Tiyol-ene reaksiyonları gibi, tiol-metakrilatın Michael katılma reaksiyonu da silika kolonlarının üretiminde kullanılabilir. Lin ve arkadaşları, metakrilat-polihidrojenli oligomerik silseskvisilan ile üç çoklu tiol çapraz bağlayıcıyı aynı anda, yani 1,6heksandiol ditiol, trimetilolpropandi tris(3-merkaptopropionat) ve pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropionat) ile dimetil-fenil fosfin katalizörü kullanarak sıvı kromatografi için bir kapiler kolon hazırladılar. Lin vd. (2015). Mallik ve ekibi, oktadekil

akrilat, N-metil maleimid ve 3merkpto propil trimetoksisilane'ı AIBN katalizörü kullanarak bir telomer elde etmek için reaksiyona soktular. Bu telomer daha sonra silika yüzeyinde hidrolize edildi. Mallik vd. (2018).

Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilen reçine, PAH'ları ayırmada iyi bir performans göstermiştir. Reçine, metil metakrilat monomeri ve etilen glikol dimetakrilat çapraz bağlayıcı ile akril pimarik asit etilen glikol akrilat ve AIBN katalizörü kullanılarak sentezlenmiştir. Wang vd. (2019). Peng ve arkadaşları, 12-metakrilil dodekilde fosfatidik asit ile etilen glikol dimetakrilatın AIBN katalizörü ile polimerizasyon reaksiyonundan bir kapiler kolon sentezlemeyi başardılar. Peng vd. (2016). Yu ve arkadaşları benzer sonuçlar bildirmiş ancak propargil metakrilat ve etilen dimetakrilat kullanarak sentez yapmışlardır. Yu vd. (2015)

Kiral moleküllerin seçici ayrımı için, modifiye edilmiş polistiren, selüloz biyohidrolaz, siklodekstrinler, kiral metal-organik çerçeveler (MOF'ler) ve iyonik sıvılar gibi kiral seçiciler kullanılarak kiral sabit fazlar (CSP'ler) hazırlanmıştır. PAH bağlanması için hidrofobik yüzeyler, sıvı kromatografisinin temel bir bileşenidir. Ayrıca, elüsyon koşullarının, özellikle ortamın pH ve iyonik güç, ayarlanmasıyla, hidrofobik yük indüksiyonu kromatografisi (HCIC) ve karma mod kromatografisi (MMC) gibi yöntemler de daha iyi protein saflaştırması elde etmek için incelenmiştir.

Son gelişmelere rağmen, sıvı kromatografisinde sabit fazların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni materyaller, potansiyel adsorbentler olarak sabit fazlar haline dönüştürülebilir. Moleküllerin hızlı ve seçici bir şekilde birleştirilmesine izin veren bir yöntem olarak tıklama kimyasının (Click chemistry) ve host-guest kimyasının popülerleşmesi, sabit faz malzemelerinin modifikasyonu ve çeşitlendirilmesi için fırsatlar sunmaktadır.

2.3. Karma Mod Kromatografisi

Son birkaç yılda, HPLC, evrensel uygulanabilirliği ve olağanüstü analiz hassasiyeti nedeniyle araştırma, tıp, gıda, üretim ve birçok diğer çeşitli alanda vazgeçilmez bir analitik teknik olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, analizlerin ayrılması ve karakterizasyonunda yüksek verim sağlar. Sabit fazlar, etkili bir ayrılma sağlayan HPLC sisteminin temel birimlerini oluşturur. Farklı silika malzemeleri arasında, alkile edilmiş silika, özellikle oktadesil zinciri (C18) ile fonksiyonelleştirilmiş olan, ters faz (RP) bileşiminde en çok kullanılan sabit fazdır. C18 sabit fazı, hidrofobik iletişimlerin

gücünden faydalanarak analitlerin ayrılmasını sağlarken, aynı zamanda ortamın pH ve polaritesi gibi değişkenlerine bağlı olarak ayrılma selektivitesini arttırmayı sağlar. RP Çözücü ile uyumlu faz arasında hidrofobik iletişimlere kullanan kromatografi, özellikle düşük sıklıkta ayrılma için en sık kullanılan ayırma modu kalmaya devam etmektedir. Bu yöntem, analizlerin farklı karışımlardan yüksek verimlilikle ayrılmasına olanak tanıırken, aynı zamanda analizlerin dağılımını ve hassasiyetini de artırmaktadır. Bununla birlikte, farklı maddelerin etkin bir şekilde ayrılması için alternatif sistemlerin de kullanılmasını gerektirmemektedir. Orta ve düşük polariteye sahip analitler için mükemmel verimlilik ve seçicilik sağlar. Bu özellikler sayesinde hidrofobik işlemlerle kromatografi, özellikle karmaşık biyomoleküler karışımların analizi için vazgeçilmez bir yöntem haline getirilmiştir. Yüksek polariteye sahip analitlerin ayrılması için farklı yöntemlerin uygulanması mümkündür. Ancak, RPLC (Ters Faz Sıvı Kromatografisi) uyum yeteneği olasılıkları ve ayrılabilen çözücülerin aralığı da kısıtlıdır. Yüksek polariteye sahip analitler için, bu türdeki RP sorbentlerinde ayrılma yetersiz olduğundan, HILIC alternatif ayırma modu olarak uygulanır. HILIC, son yıllarda hızla büyüyen ayrılma modlarından biridir. Bu yöntem, yüksek polariteye sahip analizlerin ayrılmasında aktivitesi ile dikkat çekmekte ve özellikle biyomoleküller, şekerler ve diğer polar moleküllerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yeni keşfedilen mod, RPLC'yi uygun bir şekilde tamamlamaktadır. HILIC, özellikle polar analitlerin ayrılmasında yüksek verim ve seçiciliği sayesinde, çok fazlı kromatografi ile birlikte karışımların analizinde daha geniş çözüm sunmaktadır. Polar ve hidrofilik ayırma için tercih edilen bir yöntem sunmakta ve bu spesifik alanda HILIC, RPLC'yi açıkça geride bırakmaktadır. HILIC, özellikle polar analitlerin yüksek verim ile ayrılmasını sağlarken, bu tür çalışmalar için daha iyi sonuçların elde edilmesine olanak sağlar. Ancak, her iki kromatografik yöntemin ayrı ayrı uygulanabilirliği mümkündür. Bu kısıtlamalar, farklı polarite ve yapılaraya sahip analitlerin etkin bir şekilde ayrılmasını zorlaştırmakta ve analitik çalışmalarda daha geniş çözüm yolu gerektirmektedir. Farmakolojik ürünlerde, çevrede ve gıdalarda bulunan bazı bileşikler, tek bir ayırma mekanizmasına sahip sabit fazlar kullanılarak etkin bir şekilde ayrıştırılamaz. Buna karşın, (Halfpenny ve Brown 1986, s.20) çalışması, çeşitli fonksiyonel grupların etkileşimi için karma mod fazlarının daha iyi sonuçlar sağlayabileceğini birçok kez kanıtlamıştır. Bu tür sabit faz analitlerin ayrılmasında daha fazla seçicilik ve verimlilik sunarak, kompleks karışımların analizini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, birden fazla alıkoyma seçeneğine sahip karma-mod kromatografi (MMC), son birkaç yılda önemli bir ilgi odağı haline geldi. Bunun birçok nedeni vardır; Bunlar

arasında, geleneksel tek modlu fazlarla kıyaslandığında daha geniş bir analit sınıfına uygulanabilme esnekliği sunması, MMC sorbentinin farklı elüsyon modlarında uygulanabilmesi, iki veya daha fazla tek modlu sabit fazların tek bir sabit fazda birleştirilmesinin mümkün olmasıdır. Ayrıca karma-mod kromatografi, analitlerin ayrılmasında yüksek verimlilik ve seçicilik ile kompleks karışımların analizinde daha kapsamlı uygulama sunmaktadır. MMC, bazı tek modlu ayırmada elde edilen analizlerden çok daha üstün analizler sağlamakta ve bu da analitlerin daha net ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Çoğu karma modlu kromatografi (MMC) sorbentleri, genellikle ters faz sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) olmak üzere üç yaygın moddan ikisinin birleşimine dayanır. Ancak florofilik etkileşimler, boronat afinitesi, kiral tanıma ve daha birçok etkileşim gibi başka etkileşimler de mümkündür. MMC, çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Örneğin, farklı tek molekül sabit fazlarla doldurulmuş iki veya daha fazla kolon seri olarak bağlanabilir veya birden fazla tek molekül yapısına sahip maddeler karıştırılıp kolona yerleştirilerek MMC ayırma analizi uygulanabilir. Öte yandan, silika veya organik polimer gibi uygun bir destek maddesi, karma-mod sabit faz oluşturmak amacıyla uygun şekilde modifiye edilebilir. Hazırlanan MMC sorbentlerinin şekillerinde önemli farklılık gösterebilir. Silika tabanlı karma modlu fazlar polar embedded, polar end-capped ve zwitteriyonik yapıli ligandların yanı sıra, farklı fonksiyonel gruplu ligandlarla da modifiye edilmiş olabilir. Zhang vd. (2016). Polimerik, hibrit ve monolitik MMC fazları söz konusu olduğunda, tasarım çeşitliliği daha da belirginleşir, çünkü sabit faz matrisi kendi başına çoklu etkileşimlere sahip olabilir ve ayrıca türevlendirilebilir. Mevcut ticari kolonların farklı seçiciliğe sahip yeni sabit fazlara olan talep devam ettikçe, birçok bilim insanı sorbentlerin çeşitliliğini daha da artırmak için yeni malzemeler tasarlamaya devam etmektedir. MMC'nin öncelikli olarak düşük molekül ağırlıklı çözünenlerin ayrılması için kullanılmasına rağmen, antikorlar ve serum proteinleri de dahil olmak üzere biyomoleküller şu anda çeşitli MMC ile başarılı bir şekilde izole edilmekte, yoğunlaştırılmakta ve saflaştırılmaktadır. İyi tuz toleransı, yüksek sorpsiyon kapasitesi, seçicilik ve uygun maliyet, MMC'nin bu alandaki başlıca avantajlarını temsil etmektedir. Hong vd. (2016).

2.3.1. Silika Tabanlı Karma Modlu Sabit Fazlar

Yeni karma modlu kromatografi (MMC) sabit fazlarının çoğu, yüksek verimliliği ve kolay kimyasal modifikasyon özellikleri nedeniyle destek malzemesi olarak silikayı kullanmaktadır. Silika, çeşitli gözenek boyutları, yüzey alanı, gözenek genişliği dağılımı, yoğunluk, partikül boyutu ve şekillerde hazırlanabilir. Tüm bunlar, mevcut sentetik ve hibrit kromatografik sabit fazlar önemli bir rekabeti oluşturmaya rağmen, silikayı yeni bağlanmış fazların elde edilmesi için daha da cazip kılmaktadır. Silika, ayrıca çeşitli fonksiyonel gruplar ile kimyasal olarak bağlanabilir, bu da hedef moleküllere kararlı ve seçici bağlanmayı sağlar. Bu özellikler, silikayı karma modlu kromatografi için ideal bir temel haline getirir. Son yıllarda silika üzerinde bir dizi iyonik sıvı (IL) MMC fazı hazırlanmıştır. IL'ler sıvı formdaki tuzlardır. Ho vd. (2014). Düşük uçuculuk ve yüksek termal kararlılık gibi benzersiz özellikler, ayırma işlemleri için çekici hale getirir. IL'lerin MMC fazlarına dahil edilmesi, kromatografik ayırma işleminin seçiciliğini ve verimliliğini artırır. 100 °C'de veya altında erime noktalarına sahiptirler. Çoğu durumda, IL'ler bir organik katyon, bir organik veya inorganik anyondan oluşur. 1992'de oda sıcaklığında kararlı imidazol bazlı IL'lerin ilk kez piyasaya sürülmesinden bu yana, IL'lerin hazırlanması ve uygulamaları için yapılan araştırmalar kimya topluluğu içinde hız kazanmıştır. Wilkes ve Zaworotko (1992). IL'lerin iyi çözücü özellikleri, yüksek yük yapısı ve mükemmel kararlılık, ihmal edilebilir buhar basıncı ve yanıcı olmama gibi olağanüstü özellikleri, bunların çeşitli alanlarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Yao vd. 2018; Radaï vd. 2018). İyonik sıvıların (IL'lerin) özgün özellikleri, IL'leri oluşturan katyon ve anyon kısımları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra, birbirleriyle benzersiz intermoleküler etkileşimler sergileme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, IL'ler belirli bileşik grupları için olağanüstü seçicilik gösterecek şekilde tasarlanabilir. Bir IL'ye polar süstituentler eklenmesi, IL ile polar çözünenler arasında dipol-dipol etkileşimlerini teşvik edebilir. Benzer şekilde, uzun alifatik alkil zincirlerini bir IL'ye uyarlamak, polar olmayan analitlerle dispersiyon etkileşimlerine girme yeteneğini artırabilir. IL'ler, hareketli faza katkı maddesi olarak kullanılabilirler veya sabit fazın yüzeyine tutunabilirler yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) önemli bir rol oynarlar. İlk imidazolyum bağlı silika 2004'te hazırlandığından bu yana, birçok yeni IL tabanlı sabit faz sentezlenmiştir. (Liu vd. 2004, s.15; Zhang vd. 2014, s.53).

HILIC/anyon değişim sisteminde kullanılmak üzere yeni bir iyonik sıvı (IL) türü sabit faz olarak önerilmiş, sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Yang vd. (2016). Nükleozitler, nükleobazlar, suda çözünebilir vitaminler, sülfonamidler ve sakkaritler HILIC modunda bu sabit fazın etkinliğini belirlemek için analit olarak kullanılmıştır.

Jiang ve arkadaşları, 1-oktilbenzimidazol ile 3-kloropropil silika arasındaki reaksiyon yoluyla oktilbenzimidazolyum grubunu silika yüzeyine bağlamıştır. Jiang vd. (2016). Sorbent ters faz ve anyon değişim uygulamalarında başarılı bir şekilde çalışmıştır. Polsiklik aromatik hidrokarbonlar, süstitüe benzenler, anilinler, fenoller, inorganik ve organik anyonlar kullanılarak gösterildiği üzere, sorbent ters faz ve anyon değişim uygulamalarında başarılı bir şekilde çalışılmıştır.

Yeni bir sabit fazın hazırlanmasında, imidazolyum bazlı iyonik sıvıya gömülü oktadecil (C18) ve aril sülfonat grupları ile fonksiyonelleştirmek için tiyol-en klik kimyası kullanılmıştır. Ren vd. (2018). Ürünün fonksiyonelliği göz önüne alındığında, RP/HILIC/IEC karma modlu kapasite beklenmiştir. Gerçekten de, alkilbenzenler RP modunda, nükleositler ve flavonoidler HILIC modunda ve fenoller, benzoik asitler ve anilinler ise iyon değişim modunda ayrılmıştır. Ayrıca, yeni sabit fazın, ticari C18 faza göre daha hızlı ve daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir.

Amid grubu içeren imidazolyum iyonik sıvısı, 3-merkaptopropil modifiye silika ile vinil-substitüsyonlu imidazolyum iyonik sıvısı arasındaki tiol-en klik kimyası yoluyla silika üzerine modifiye edilmiştir. Qiao vd. (2018). Hazırlanan amid IL kolonunun kromatografik performansının, özellikle insan idrar örneklerindeki flavonoidler gibi karmaşık örneklerle yönelik olarak ticari bir MMC sorbentine göre üstün olduğu bulunmuştur. Bu, bu sabit fazın biyoanaliz ve çevresel uygulamalardaki potansiyelini ve IL modifikasyonlarının ayırma kabiliyetini artırmadaki etkinliğini gösterir.

Son zamanlarda, iyonik sıvı (IL), yeni bir karma mod kromatografisi (MMC) fazı oluşturmak için bir kaliksaren yapısıyla birleştirilmiştir. Hu vd. (2016). Kaliksarenler, ayarlanabilir bir kaviteye ve çok yönlü kompleksleşme yeteneğine sahip olarak, taç eterler ve siklodekstrinlerden sonra üçüncü nesil süpramoleküllerin temsilcilerindendir. Bu kombinasyon, ayırmaların seçiciliğini ve verimliliğini artırarak çeşitli bileşiklerin hedeflenen şekilde ayrılmasına ve analizine olanak tanır. Kaliksaren çerçevesinin benzersiz özellikleri, IL'lerin avantajlı özellikleriyle birlikte, bu yeni sabit fazı analitik kimyadaki uygulamalar için özellikle umut verici hale getirir. Makrosiklik yapıları metilen köprüleriyle birbirine bağlanan fenolik birimlerden oluşur. Zhang vd. (2016). Bu yapılandırma, çeşitli analitlerle seçici etkileşimlere izin vererek karışık modlu kromatografi uygulamalarında tutma ve ayırma verimliliğini artırır. Kaliksaren yapısının ayarlanabilirliği, hedef bileşikler için belirli afinitelere sahip sabit fazların tasarlanmasını sağlar ve bu da onu çeşitli kromatografik teknikler için çok yönlü bir seçim haline getirir. İyonik sıvıların dahil edilmesi, bu fazların kararlılığını ve performansını daha da

iyileştirerek etkili ayırma süreçlerini kolaylaştırır. Ayırma biliminde kaliksarenlerin uygulanmasına odaklanan değerli inceleme makaleleri yayınlanmıştır. (Mokhtari vd. 2011, s.69-73; Sliwka-Kaszynska, 2007, s.37; Gezici vd. 2015, s.83). Bu incelemeler, kaliksarenlerin benzersiz özelliklerini, konak-misafir kompleksleri oluşturma kabiliyetleri ve çeşitli analitler için seçiciliği artırma potansiyelleri dahil olmak üzere vurgulamaktadır. Bu makalelerde sağlanan içgörüler, farklı alanlarda ayırma tekniklerindeki ilerlemelere katkıda bulunarak, yenilikçi kromatografik sabit fazlar geliştirmede kaliksaren bazlı malzemelerin önemini vurgulamaktadır. Kaliksarenler, π - π ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve inklüzyon konak-misafir değişimi dahil olmak üzere çeşitli etkileşim mekanizmalarına aracılık eder ve bu da geleneksel sabit fazlara göre potansiyel avantajlarını gösterir. Bu etkileşimler, kromatografik uygulamalarda gelişmiş seçicilik ve hassasiyet sağlar ve kaliksarene bazlı malzemeleri karmaşık karışımların ayrılması için özellikle değerli hale getirir. Silikaya kovalent olarak bağlı olan kaliksaren-IL ligandları, sulu ortamlarda organik bileşikler ve iyonlar için benzersiz tanıma yetenekleri sergileyebilir. Bu gelişmiş seçicilik, kaliksaren boşluk yapısının ve iyonik sıvının özelliklerinin birleşik etkilerinden kaynaklanır ve hedef analitlerle etkili etkileşimlere olanak tanır. Bu malzemelerin uyarlanabilirliği, onları çevre analizi, ilaçlar ve biyokimyasal ayırmalar dahil olmak üzere çeşitli alanlardaki uygulamalar için umut verici adaylar haline getirir. Sulu koşullarda etkili bir şekilde çalışabilme yetenekleri, biyomoleküllerin ve diğer suda çözünen bileşiklerin ayrılması ve saflaştırılması için özellikle faydalıdır. (Abraham vd. 2004, s.1037; Vitha ve Carr, 2006, s.1126; Sykora vd. 2016, s.39).

Üç adımlı bir buhar fazı çöktürme yöntemi kullanılarak, hidrotermal kararlılığı artırılmış yeni bir amino-fonksiyonelize edilmiş karma modlu kromatografik (MMC) sabit fazı sentezlenmiştir. M. Chen & L. Chen (2018, s.10). Bu yaklaşımla sabit fazların çoğaltılması amacıyla gelişmiş bir yöntem sunulmaktadır. Aminopropil-fonksiyonlu silikalar, karbonhidratlar ve diğer hidrofilik analitler için sıklıkla kullanılır. Aminopropil fonksiyonel gruplu silikalar, sıklıkla karbonhidratlar ve diğer hidrofilik bileşiklerin analizinde kullanılan sabit fazlardır. Bu fazlar, HILIC, RP, normal faz ve IEC dahil olmak üzere çoklu modlu ayırmalarda uygulanabilir. Ancak, aminopropil-silika kolonları genellikle kısa ömürlüdür. Faz üzerindeki yüksek amin grubu konsantrasyonu nedeniyle bazik ortam, silika altlığının aşınmasına yol açar ve özellikle su varlığında bağlanmış grupların hidrolizini katalizler. Amino-fonksiyonel gruplu malzemelerde köprü görevi gören etilen gruplarının dahil edilmesi, hidrofobikliği artırabilir ve nihai

aminopropilmodifiye edilmiş sabit fazın hidrotermal stabilitesini yükseltebilir. C. Li vd. (2011).

2.4. SÜLFONAMİDLER

Sülfonamidler, sülfamatlar ve sülfamidler gibi yapısal olarak ilişkili türevleri, fonksiyonel grubun ya doğrudan aromatik, heterosiklik, alifatik veya şeker iskeletine (tip A) bağlı olduğu ya da çoğunlukla oksijen veya nitrojen olmak üzere bir heteroatom aracılığıyla böyle bir iskelete eklendiği (bu da sırasıyla sülfamatlara ve sülfamidlere yol açar) genel formülü $A-SO_2NHR$ olan bileşik sınıfıdır. (Capasso,2014, s.29; Carta, 2004, s.6; Scozzafava vd. 2003; Supparan, 2017, s.10). R kısmının doğası da oldukça değişken olabilir; birincil sülfonamidler/sülfamatlar/sülfamidler dikkate alındığında hidrojenle başlar. Carta vd. (2008-2012) ve yukarıda A için belirtilen tiplerdeki heteroatomları (OH, NH_2 , vb.) ve organik iskeletleri içeren çeşitli kısımlara kadar uzanır. (Scozzafava vd. 2013; Winum vd. 2006). Bu nedenle, bu bileşik sınıfı, genellikle klasik sentetik metodolojiler Supuran (2008, s.7) yoluyla kolayca elde edilebilen ve ayrıca onlarca yıldır iyi bilinen ilaç benzeri özelliklere sahip olan çok çeşitli türevlere yol açabilir. (Carta, 2013, s.23; Masini vd. 2013, s.23; Monti vd. 2013, s.23; Neri 2011, s.10; Scozzafava vd. 2013, s.23; Supuran, 2016, s.31). Sülfonamidler, hayvancılıkta enfeksiyonları önlemek, hastalıkları tedavi etmek ve büyümeyi desteklemek için veterinerlik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan bir grup antibakteriyel ajandır. (Dost vd. 1991, s.74; Stowe, 1965; Jen vd. 1998) Hayvancılıkta sülfonamidlerin yaygın kullanımı, et ve et ürünlerinde sülfonamid kalıntısının varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Bu ilaçların hayvan dokularındaki belirgin kalıntılarına ek olarak, bu ilaç kalıntılarının ve metabolitlerinin büyük miktarları dışkı ve idrar yoluyla da atılabilir. Sonuç olarak bu bileşikler su ve atık su arıtma tesislerine karışarak insanlar için sağlık tehlikesi oluşturur ve ayrıca atık su arıtımında biyolojik süreçlerde yer alan mikroorganizmaların büyümesini engeller. Littlefield vd. (1990). Gıdalarda sülfonamid kalıntılarının bulunması endişe vericidir çünkü bileşiklerden bazılarının kanserojen olduğu bilinmektedir. Haagsma vd. (1987) ve bunlar genellikle antibiyotik direnci geliştirme riskini artırır. Doerge vd. (1993), bu da benzer ilaçların terapötik kullanımını etkisiz hale getirir. Son dönemdeki sonuçlar, sülfametazinin olası bir tiroid kanseri olarak rol oynayabileceğini göstermiştir. Reimer vd. (1991). Gıda ve hayvan dokularındaki sülfonamid kalıntıları çok düşük miktarlarda

bulunabilir, ancak fiziksel olarak sağlık açısından zararlı olabileceklerdir. Malintan & Mohd (2006). Bu nedenle, bu durum bilim camiasının dikkatini çekmiştir.

Sentetik antimikrobiyal antibiyotik sınıfı olan sülfonamidler, geniş spektrumlu antibakteriyel etkilerinden dolayı insan ve veteriner hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Stowe (1965, s.457). Hayvancılıkta bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve onlemek ve üretim verimliliğini artırmak için sıklıkla kullanılırlar. Bununla birlikte, sülfonamidlerin artan kullanımı, yumurta, et ve süt gibi gıda ürünlerinde tüketiciler için risk oluşturabilecek ve potansiyel olarak artan antimikrobiyal direnç sorununa katkıda bulunabilecek ilaç kalıntılarının birikmesine ilişkin endişeleri artırmıştır. Titus & Mathew (2004). Avrupa Birliği ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi de dahil olmak üzere dünya çapındaki düzenleyici kurumlar, halk sağlığı güvenliğini sağlamak amacıyla gıda maddelerindeki sülfonamidler için katı maksimum kalıntı limitleri getirmiştir. Littlefield vd. (1990, s.157). Bu durum, bu kalıntıların varlığını izlemek için daha gelişmiş ve doğru analitik tekniklere olan ihtiyaı artırmıştır. (Doerge vd. 1993, s.1126; Haagsma vd. 1987, s.41).

Sülfonamidlerin analizi, farmasötik endüstride ve klinik araştırmalarda büyük bir öneme sahiptir. Sülfonamid ilaçlarının analizi için ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi-ktle spektrometrisi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi (LC) gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi (TLC), girişimlere açık olup kantitatif analiz için yetersizdir. (Reeves, 1999, s.127; Austin, 1990). Elektron iyonizasyonu (EI) ktle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmiş gaz kromatografisi ise hem duyarlı hem de seçici bir yöntemdir. Ancak, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız sülfonamidlerin analiz öncesinde trevlendirilmesini gerektirmektedir. HPLC, bu bileşiklerin doğruluğunu ve hassasiyetini sağlamak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Kolon seçiminden mobil faz bileşimine kadar doğru parametreler ile yapılan analizler, sülfonamidlerin etkinliğini ve saflığını en iyi şekilde belirlemeye olanak tanır. (Cannavan vd. 1996, s.121; Msagati vd. 2004).

2.5. Kantitatif Parametrelerle Karma Mod Mekanizmasının Tartışılması

Karma modlu HPLC'deki ayırma mekanizması, kantitatif yapı-tutma ilişkileri (QSRR'ler) ve çeşitli fizikokimyasal parametreler kullanılarak daha iyi anlaşılabilir ve optimize edilebilir. Yaşar Mumim vd. (2022). Anahtar parametreler, sırasıyla analitlerin bölünme katsayısını, dağılım katsayısını ve çözünürlüğünü temsil eden logP, logD ve

logS gibi logaritmik parametrelerdir. Bu parametreler, analitin sabit fazda tutulmasını yöneten hidrofobik ve iyonik etkileşimler hakkında önemli bilgiler sağlar. Spesifik olarak logP, analitlerin hidrofobikliğinin anlaşılmasını sağlarken logD, moleküllerin pH'a bağlı iyonizasyon durumunu yansıtır. Ek olarak, p (polarite), k (bölünme katsayısı) ve a (aktivite katsayısı) gibi diğer niceliksel parametreler, karmaşık bileşiklerin ayrılma davranışını daha iyi tahmin etmek ve kontrol etmek için kullanılmıştır. (Jandera vd. 2010; Jandera & Janás. 2017; Shamshir vd. 2020). Kromatografiler, bu parametreleri uygulayarak ayırma prosesinde ince ayar yapabilir, yöntemin seçiciliğini artırabilir ve karma modlu HPLC'de analitlerin çözünürlüğünü iyileştirebilir. Böyle bir yaklaşım, çeşitli fonksiyonel gruplara ve iyonizasyon durumlarına sahip bileşiklerin analiz edilmesi için çok önemlidir ve bu, onu özellikle birden fazla sülfonamidin bir arada bulunabileceği karmaşık gıda matrisleri için uygun kılar. Sülfonamidlerin tespiti ve miktarının belirlenmesine yönelik bir araç olarak karma modlu HPLC'nin sürekli geliştirilmesi, bunun gıda güvenliği otoriteleri tarafından belirlenen sıkı düzenleyici gereklilikleri karşılama potansiyelini vurgulamaktadır. Karmaşık matrislerde çeşitli analitleri bulundurma ve yüksek hassasiyeti koruma yeteneği göz önüne alındığında, bu kromatografik yaklaşımın, kontaminasyon risklerinin yüksek olduğu özellikle yumurta gibi gıdalardaki sülfonamid kalıntılarının rutin olarak izlenmesi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. (Kim vd. 2024; Won vd. 2011; Xu vd. 2013). Bu yöntemlerin daha fazla optimizasyonunun, tespit yeteneklerini geliştirmesi ve gıda güvenliği standartlarının küresel olarak karşılanmasını sağlaması muhtemeldir. Ancak literatürde sülfonamidler üzerine yapılan çalışmaların neredeyse tamamı geleneksel C-18 kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Karma modlu HPLC henüz gelişmekte olan bir alan olduğundan, karma modlu kolonlar piyasada çok azdır. Bu nedenle mevcut kolonların ayırma performanslarının ve özelliklerinin detaylı olarak incelenmesine ihtiyaç vardır. Karma mod etkileşim mekanizmasının anlaşılması daha uygun kolonların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Özellikle etkileşim mekanizmasının spekülatif yorumlardan ziyade QSRR parametreleri kullanılarak incelenmesi daha doğru bilgi sağlayacaktır.

Bu çalışmada, C12-diol yapısına sahip karma modlu bir kolon kullanarak, hem polar hem de polar olmayan özelliklerinin yanı sıra ortamın asitliğine karşı yüksek hassasiyet sergileyen bir bileşik sınıfı olan sekiz sülfonamidden oluşan bir karışımın ayrılması ve ayrılma sonuçlarından yararlanarak, QSRR parametreleri logD, logS ve pKa'yı kullanarak karma modlu ayırma mekanizmasının inceliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

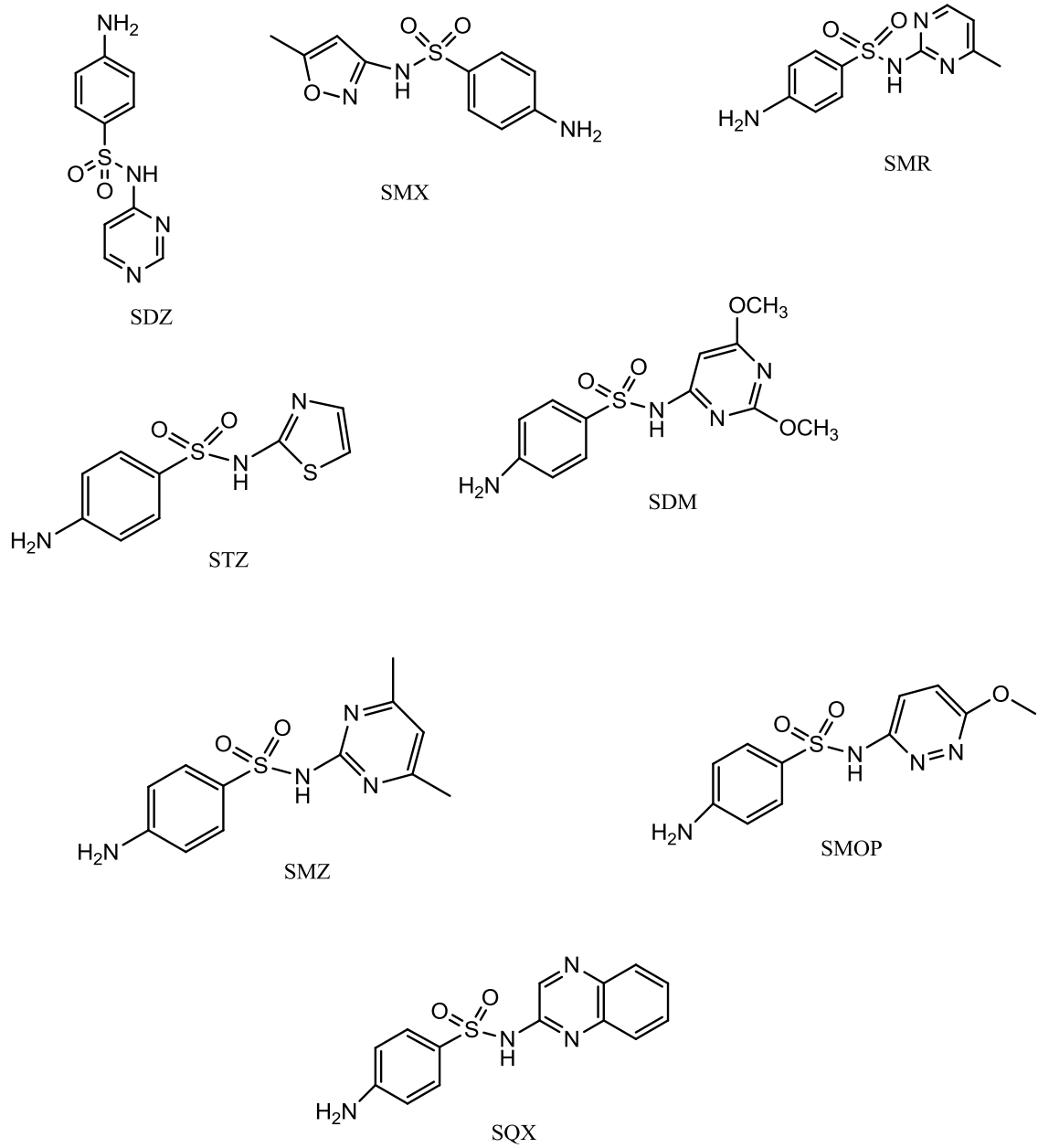
3. YÖNTEM

3.1. Malzemeler

Bir AcclaimTM karma modlu kolon HILIC-1 (250-4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher'dan (Waltham, Massachusetts, ABD) satın alınmıştır. Hareketli faz olarak HPLC için kullanılan asetonitril (MeCN), metanol (MeOH), etanol (EtOH) ve izopropanol (IPrOH) “HPLC grade” olup Merck'ten temin edildi. Bu çalışmada kullanılan tüm analitler (Şekil 9), diğer tüm reaktifler ve solventler Sigma-Aldrich veya Merck'ten alındı. Bu çalışmada kullanılan tüm sülfonamidler (sülfadiazin (SDZ), sülfametoksazol (SMX), sülfamerazin (SMR), sülfatiazol (STZ), sülfametazin (SMZ), sülfametoksipiridazin (SMOP), sülfadimetoksin (SDM) ve sülfakionoksalin (SQX)) (Şekil 3.1.) Sigma-Aldrich'ten elde edilmiştir. Deiyonize su, Millipore Milli-Q su sistemi kullanılarak elde edildi. (Merck, ABD) LogD, logS ve pKa değerleri ChemAxon Chemicalize yazılımı kullanılarak hesaplandı.

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 çözeltisi (1 mg mL⁻¹), asetonitril (MeCN) içinde hazırlandı ve tüm çözeltiler 4 °C'de saklandı. Analit başına 0,1 mg/mL'lik nihai konsantrasyona ulaşmak için su ile daha fazla seyreltme yapıldı. Sülfonamidlerin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 250 nm olarak tespit edildi. Diğer kromatografik koşullar ilgili yerlerde açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Sülfonamidlerin Yapısı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sekiz sülfonamidin kromatografik analizi, karma modlu bir kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Analitler SDZ, SMX, SMR, STZ, SMZ, SMOP, SDM ve SQX'tir (Şekil 3.1.). Mobil faz bileşiminin (EK9-EK25), pH'ın (EK1, EK2, EK3, EK4, EK5, EK6, EK7, EK8), tampon konsantrasyonunun (EK31, EK32, EK33, EK34, EK35), akış hızının (EK42, EK43, EK44, EK45, EK46) ve sıcaklığın (EK36, EK37, EK38, EK39, EK40, EK41) sülfonamidlerin kromatografik davranışı üzerindeki etkisi araştırıldı. Optimum ayırma koşulları, bir ACN/tampon (pH 6,5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 10/90 (v/v) çözeltisi, 1 mL/dakika akış hızı ve 250 nm dalga boyunda gradient elüsyon kullanılarak belirlendi. Bu koşullar altında sekiz sülfonamid 22 dakika içinde başarıyla ayrıldı (Şekil 4.1.). Bu sonuçlar, karma modlu yapılara sahip diğer sabit fazlardan elde edilenlerden daha iyidir. (Jovanović & Stojanović, 2013; Ovung & Bhattacharyya, 2021). Analitlerin C12-diol karma mod kolonu ile etkileşim mekanizmasını araştırmak için QSRR parametreleri (logD, logS ve pKa) hesaplandı (Tablo 4.1.). Kolonun karma mod özelliklerini bu kantitatif parametrelerle birlikte inceleyerek, sülfonamidlerin alıkonma ve elüsyon davranışları hakkında daha detaylı bilgi elde edilmiştir.

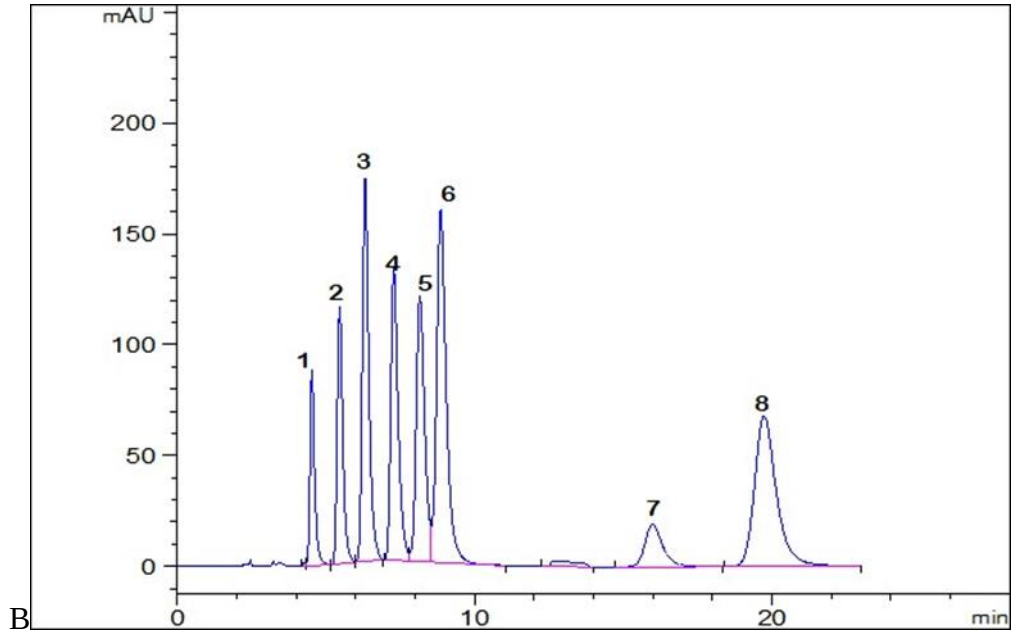
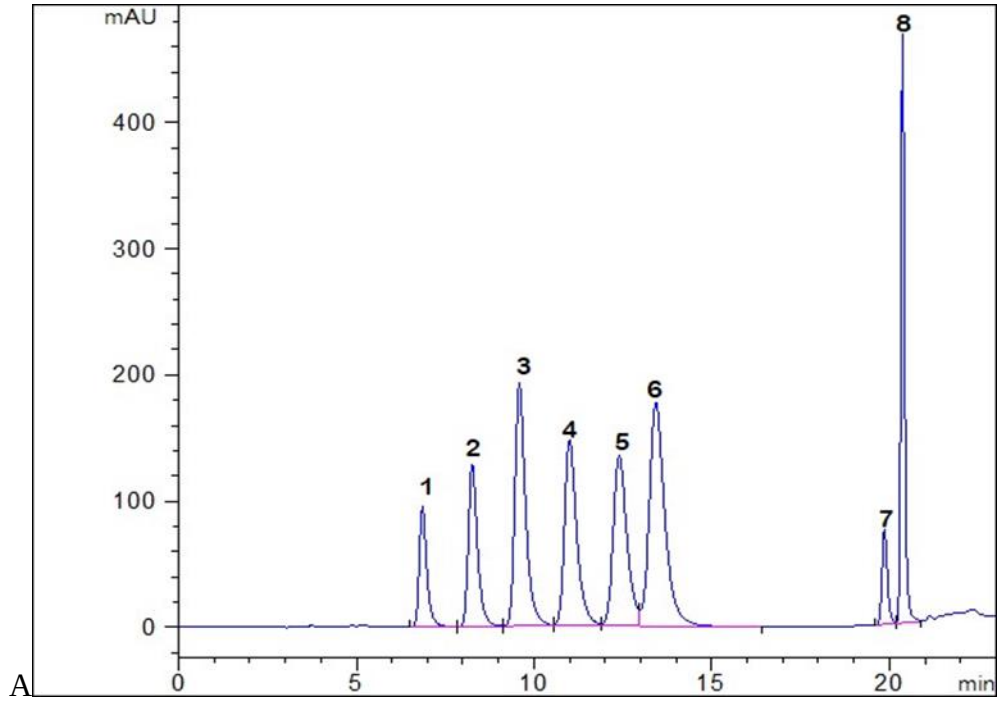
Tablo 4.1.'de listelenen sülfonamidlerin elüsyon sırası ile logD ve logS değerleri arasındaki karşılaştırma, sorbent ve analitler arasında karma mod etkileşimi olduğunu göstermektedir. Artan polarite ile birlikte alıkonma süresinin azaldığı klasik ters faz mekanizmasının aksine, gözlemlenen elüsyon sırası bu eğilimi kesinlikle takip etmemiştir. Örneğin, sülfonamidler arasında en düşük logD (0,24) ve en yüksek logS (-1,47) değerine sahip olan SMX, kolondan elüe edilen ikinci analit olmuştur. Benzer şekilde, ikinci en yüksek suda çözünürlüğe (logS = -1,83) ve dördüncü en yüksek hidrofilikliğe (logD = 0,36) sahip olan STZ, kolondan elüe edilen dördüncü analit olmuştur. Bu gözlemler, polaritenin analitlerin ayrılması ve tutulma davranışında sudaki çözünürlükten daha önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca, logD değeri 0,33 olan üçüncü en polar bileşik olan SMOP, sudaki düşük çözünürlüğü (logS = -2,77) nedeniyle kolondan altıncı sırada elüe edilmiştir, bu da bu durumda suda çözünürlüğün baskın olduğunu göstermektedir. Benzer bir karşılaştırma, Şekil 4.1. ve 4.3.'te gösterildiği gibi, tüm pH değerlerinde son olarak elüe edilen iki en hidrofobik bileşik olan SDM ve

SQX için yapılabilir. Bu sonuçlar ters faz mekanizmasıyla tutarlı olsa da, logD ve logS değerleri ilginç bir tutarsızlık göstermektedir. SDM suda düşük çözünürlüğe (logS = -3,44) sahipken, SQX yüksek hidrofobikliğe (logD = 1,40) sahiptir. Daha düşük bir logD değerine sahip olmasına rağmen, SQX, SDM'den daha sonra elüe edilmiştir. Bu bulgu, logD açısından ters faz mekanizmasıyla uyumludur ancak logS değerleri için gözlemlenen eğilimle çelişmektedir ve bu da sabit faz ile sülfonamidler arasındaki etkileşimde, apolar etkileşimlere ek olarak, hidrojen bağı, iyon-dipol ve iyon-iyon etkileşimleri gibi polar etkileşimlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Bazı bileşikler için hidrojen bağı baskındır (yüksek logS ve suda çözünürlük), diğerleri için ise yüksek polarite (düşük logD) polar etkileşimleri belirler. Benzer şekilde, apolar etkileşimler için, bazı bileşikler için yüksek hidrofobiklik (yüksek logD) baskındır, diğerleri için ise düşük logS (düşük suda çözünürlük) baskındır.

C12-diol kolonunda sülfonamidlerin kromatografik davranışı, karma mod etkileşim mekanizmasına bağlanmıştır. Hidrofobik zincir tarafından sağlanan apolar etkileşimlere ek olarak, diol grubu hidrojen bağı ve iyon-dipol etkileşimleri yoluyla tutulmaya katkıda bulunur.

Tablo 4.1. Bu çalışmada kullanılan sülfonamidlerin hesaplanan logD1, logS1 ve pKa değeri

HPLC elüsyon sırası	Analit	logD	logS	pKa1
1	SDZ	0,28	-2,38	6,99
2	SMX	0,24	-1,47	5,86
3	SMR	0,41	-2,54	6,99
4	STZ	0,36	-1,83	5,73
5	SMZ	0,54	-2,77	6,99
6	SMOP	0,33	-2,75	6,84
7	SDM	1,14	-3,44	6,91
8	SQX	1,40	-2,74	6,79



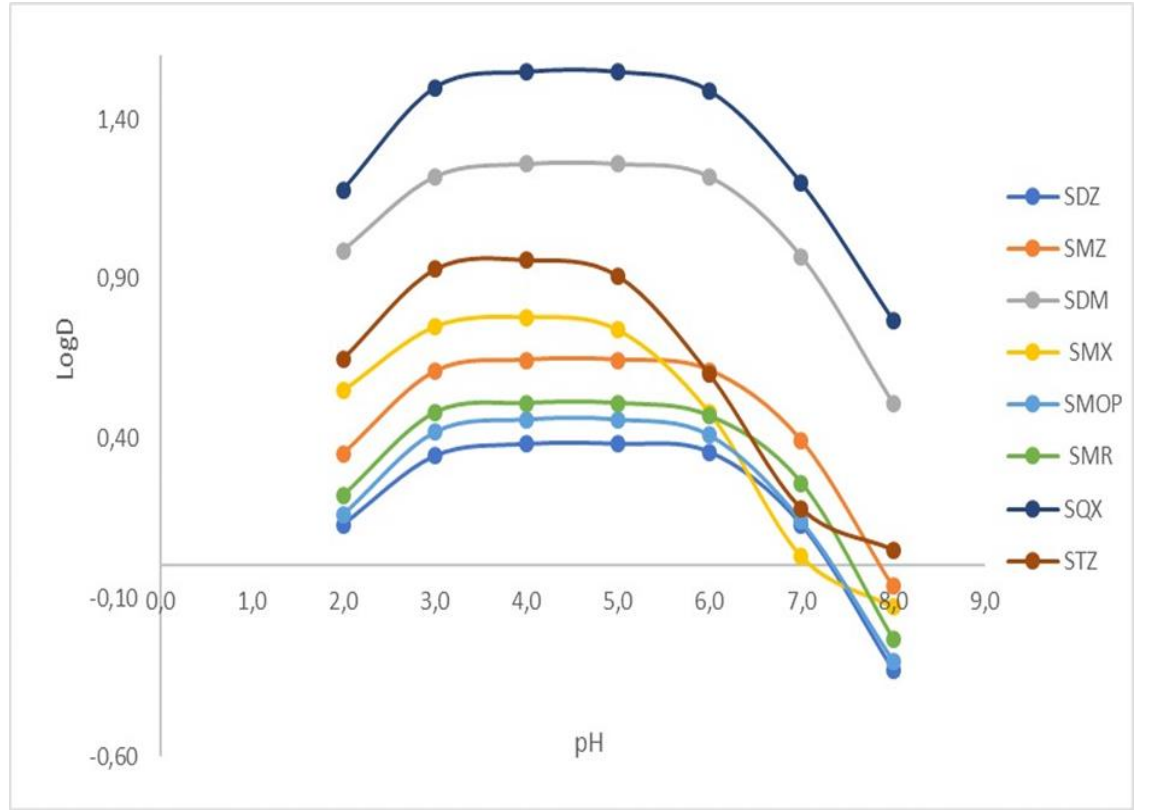
Şekil 4.1. Sekiz sülfonamidin ayrılması için optimum (A) gradyan ve (B) izokratik koşullar. Kromatografik Koşullar: (A) ACN/tampon (pH 6.5, 40 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10/90 (h/h)); 0–14 dak, 40/60; 14–20 dak., akış hızı: 1 mL/dak; 0–14 dak, 1–1.5 mL/dak; 14–20 dak; sıcaklık: 15 °C; enjeksiyon hacmi: 10 mL/100 ppm; dalga boyu: 250 nm. (B) ACN/tampon (pH 6.5, 40 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10/90 (h/h)), akış hızı: 1.5 mL/dak, sıcaklık: 15 °C, enjeksiyon hacmi: 10 μL /100 ppm, dalga boyu: 250 nm. Analitler: SDZ, SMX, SMR, STZ, SMZ, SMOP, SDM ve SQX'tir.

4.1. Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerine pH'ın Etkisi

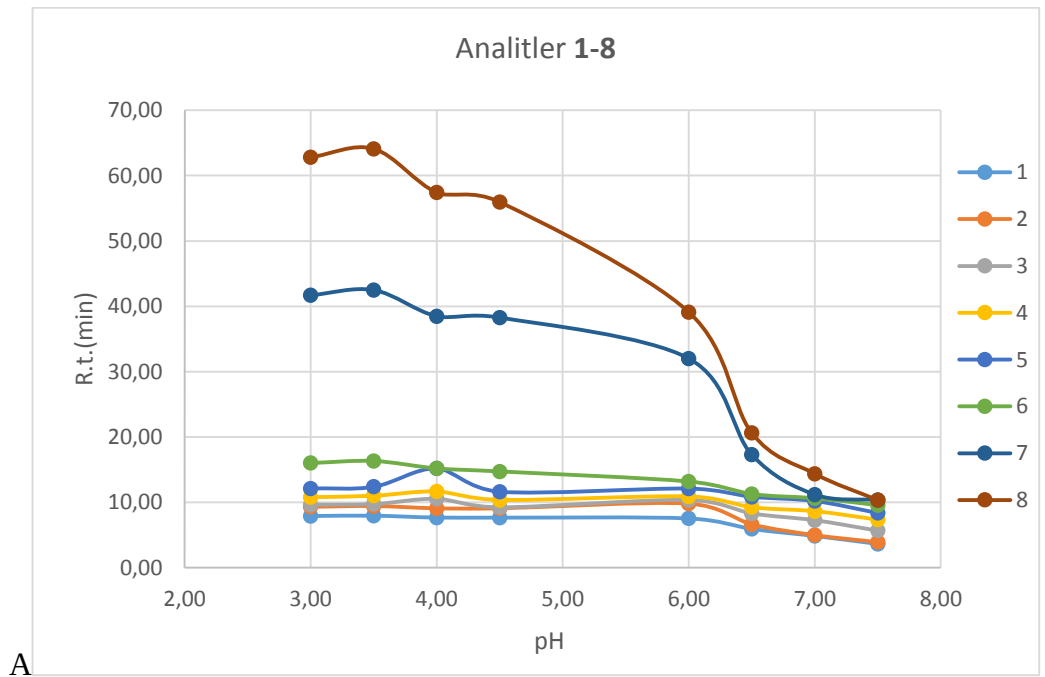
Sülfonamidlerin ayrılma ve alıkonma davranışları üzerine pH'nın etkisini araştırmak amacıyla, başlangıç mobil faz bileşimi olarak ACN/tampon (pH 3, 20 mM H_3PO_4 / KH_2PO_4 , 10/90 (h/h)) seçilerek pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum pH değerinin belirlenmesinin ardından, üç farklı pH seviyesinde (pH 3, 5 ve 6.5) ACN konsantrasyonu optimize edilmiştir. Sülfonamidlerin tutunması üzerinde pH değişiminin etkisini anlamak için, analitlerin polariteleri ve pH değişimlerinin bu polariteyi nasıl etkilediği hakkında ön bilgiye sahip olmak çok önemlidir. Tablo 4.1. incelenen sülfonamidlerin logD değerlerinde pH'nın bir fonksiyonu olarak gözlenen değişimi göstermektedir. Şekilde gösterildiği gibi, analitlerin hidrofobikliği pH 3-5 aralığında nispeten sabit kalmıştır. Ancak, pH 3'ün altında ve pH 5'in üzerinde, özellikle pH 6'nın üzerinde, tüm analitlerin polaritesi ve suda çözünürlüğü artmıştır (daha düşük logD ve daha yüksek logS değerleri), bu durum Şekil 4.1. A ve B'de gösterilmiştir. Analitlerin tutunma zamanlarında pH 3-5 aralığında önemli bir değişiklik gözlenmemekle birlikte, pH 5 veya 6'nın üzerinde tutunma zamanlarında bir azalma kaydedilmiştir. Tablo 4.1'de gösterildiği gibi, analitlerin pKa değerleri 5-7 aralığında yer almaktadır. pH 5-6'nın üzerinde suda çözünürlükteki artış ve buna bağlı olarak tutunma zamanlarındaki azalma, analitlerin anyonik formlarına geçişine bağlanmıştır.

Ancak, tüm analitlerin logD ve logS değerleri pH 5'in üzerinde aynı derecede etkilenmedi. SMX ve STZ, diğer analitlere kıyasla orta seviyede logD ve logS değerleri sergilemesine rağmen (SMX beşinci, STZ altıncı sırada), pH 7'de SMX en düşük logD değerini gösterirken, STZ dördüncü sırada yer aldı. Analitlerin hidrofobisi üzerindeki pH etkisine ilişkin bu farklı davranış, alıkonma zamanı-pH grafiğinde yansımamaktadır. Ters faz kromatografisinin klasik etkileşim mekanizmasına göre, polarite arttıkça analitlerin suda çözünürlüğü de artar ve bu da alıkonma zamanında azalmaya yol açar; böylece daha polar analitler apolar olanlara göre daha erken elüe olur. Ancak, mevcut durumda gözlemlenen davranış bu beklenenden sapmaktadır. Genel olarak, analitlerin alıkonma zamanları pH 6'nın üzerinde hidrofiliklik artışıyla azalmasına rağmen, SMX ve STZ'nin tutma zamanlarında logD'de paralel bir azalma gözlenmedi. LogD değerleri bu aralıkta oldukça benzer olmasına rağmen, optimum ayırmanın pH 6-7 aralığında gerçekleşmesi özellikle ilgi çekicidir. Bu sonuç, analitler anyonik formlarına geçtiğinde, iyon-dipol etkileşimleri gibi polar etkileşimlerin yoğunlaştığını ve apolar etkileşimlerin yanı sıra

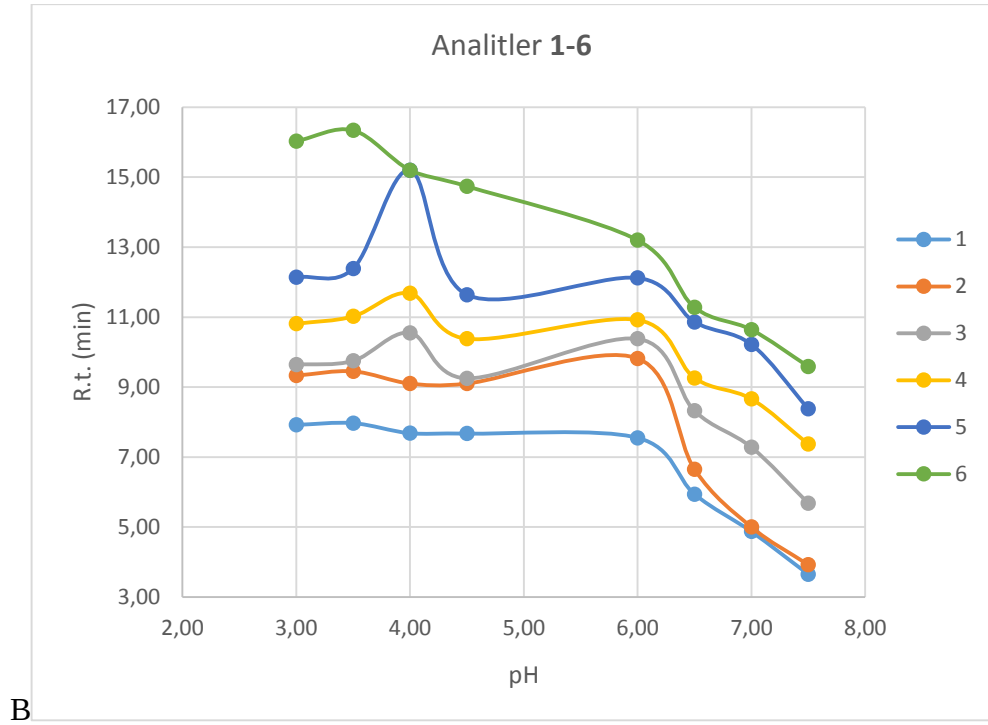
önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir. Bu karma modlu etkileşim mekanizması, pH 6.5'te elde edilen optimum ayırmadan sorumludur.



Şekil 4.2. pH'nın bir fonksiyonu olarak sekiz sülfonamidin LogD değerleri. Analitler: SDZ, SMX, SMR, STZ, SMZ, SMOP, SDM ve SQX'tir.



A

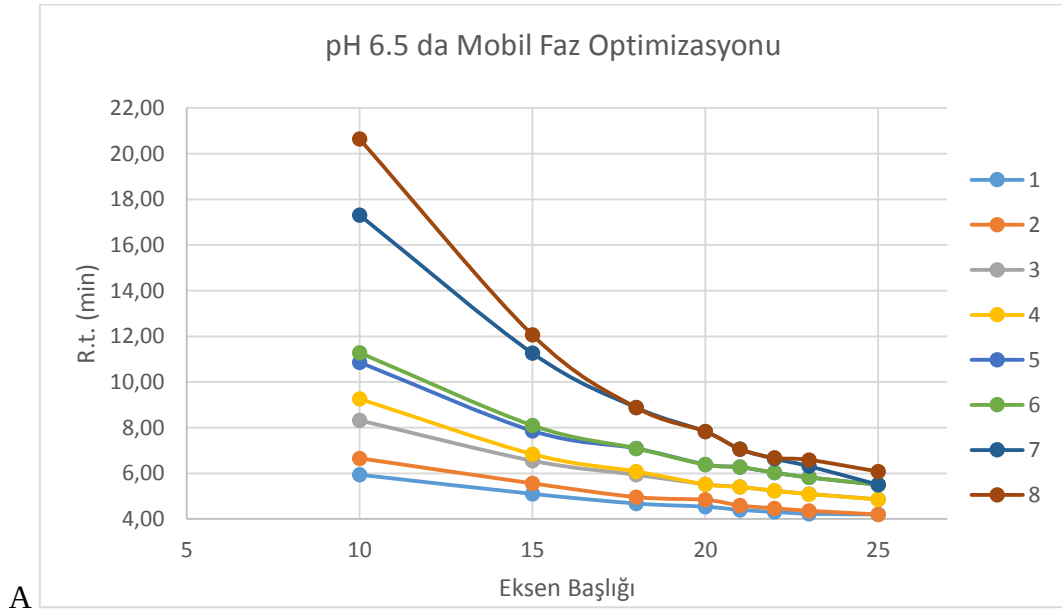


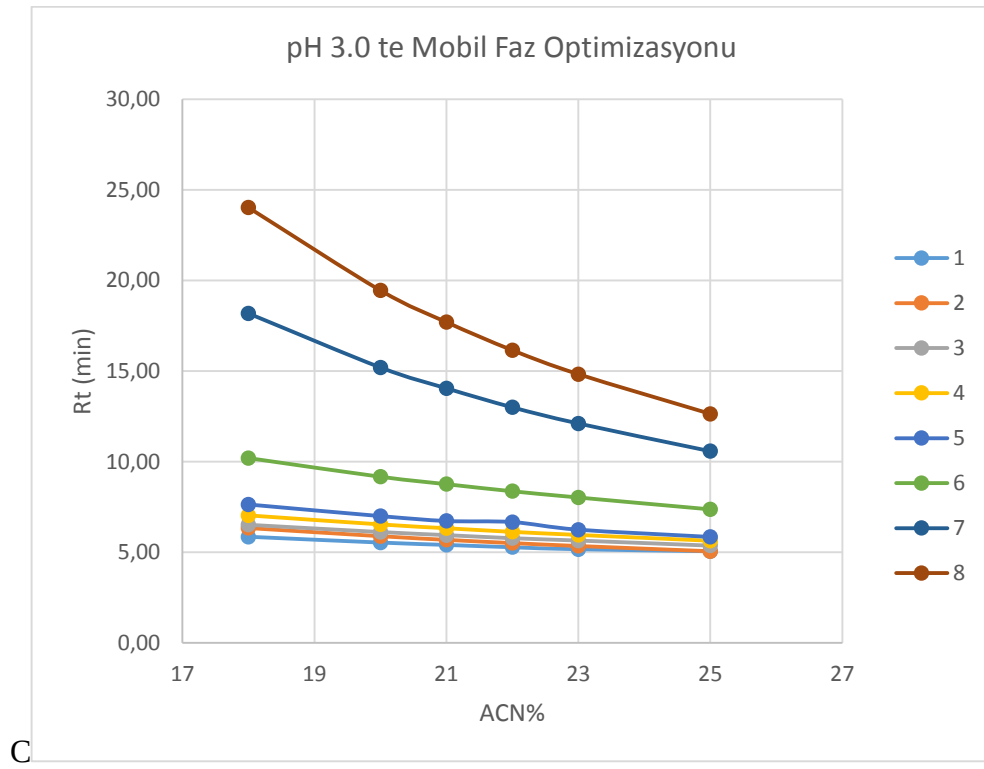
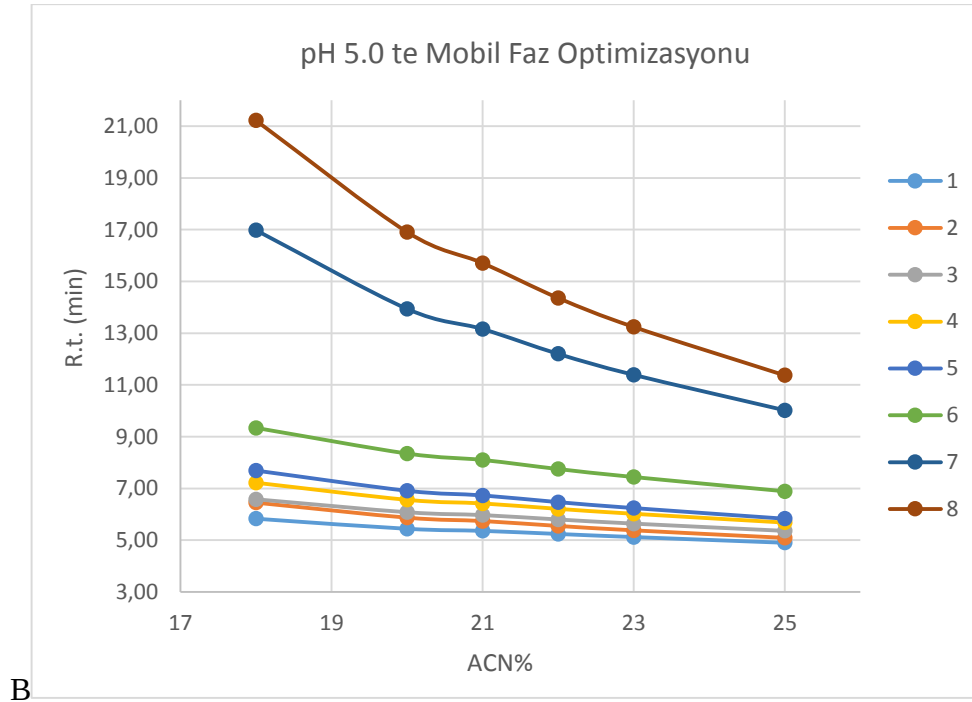
Şekil 4.3. pH'ın, C12-diol karma mod kolonu üzerindeki sülfonamidlerin (A) 1-8 ve (B) 1-6'nın alıkonma süresi (RT) üzerindeki etkisi. Kromatografik koşullar: ACN/tampon (pH 3, 20 mM H_3PO_4/KH_2PO_4 , 10/90 (h/h)), akış hızı: 1 mL/min, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 10 μ L/100 ppm, tespit dalga boyu: 250 nm. Analitler: SDZ, SMX, SMR, STZ, SMZ, SMOP, SDM ve SQX'tir.

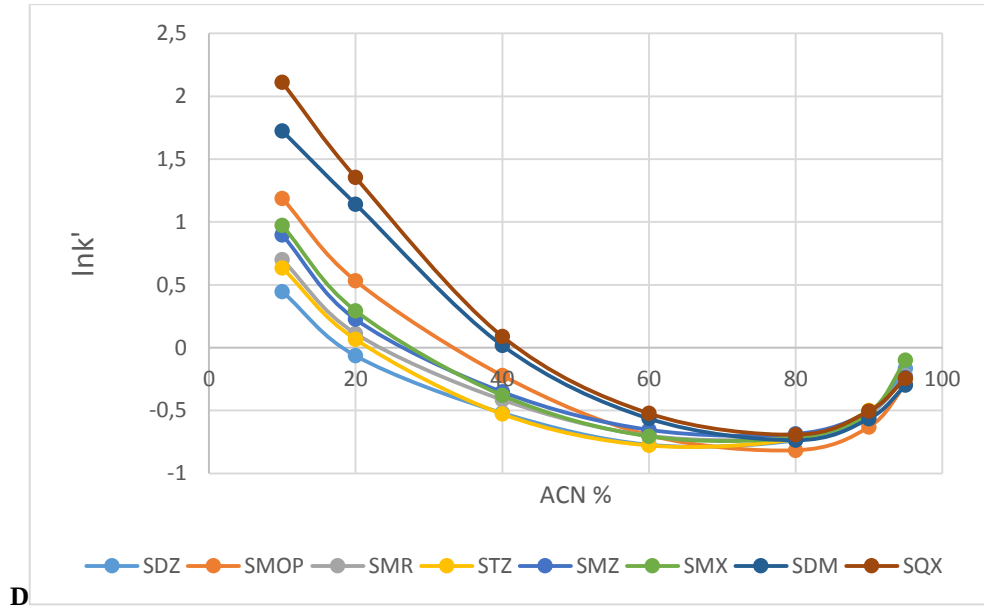
4.2. Mobil Faz Bileşiminin Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerine Etkisi

Optimum mobil faz bileşimini belirlemek için Su, ACN ve MeOH'nun ikili ve üçlü karışımları kullanıldı. Metil alkolün, hidrojen bağı oluşturabilme kapasitesi nedeniyle asetonitrile (ACN)den daha yüksek bir polariteye sahip olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, su/metil alkol karışımları, su/ACN karışımlarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir polariteye sahiptir. Sülfonamidler polar fonksiyonel gruplar içermelerine rağmen, genel olarak apolar karakterleri baskın olduğundan, çoğunlukla ters faz kromatografik davranış sergilerler. Bu, hem polar hem de apolar etkileşimlerin su/ACN karışımlarında, su/metil alkol karışımlarına göre daha belirgin olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, sülfonamidlerin daha az polar olan su/ACN mobil fazında, daha polar olan su/metil alkol mobil fazına kıyasla daha etkili bir şekilde ayrılacağı öngörülmektedir. Bu nedenle, optimum mobil faz oranını belirlemek için farklı ACN/su karışımları test edildi.

Analitlerin alıkonma davranışı üzerindeki mobil faz bileşimi etkisini daha iyi anlamak ve optimum koşulları belirlemek için, üç farklı pH seviyesinde (6.5, 5.0 ve 3.0) mobil faz optimizasyonu çalışıldı. Şekil 4.4.A-C'de, her pH değerinde sülfonamidlerin ayrılma ve alıkonma davranışları üzerine ACN oranının etkisi görülmektedir. pH 3.0 ve 5.0'da tüm analitlerin yüksek hidrofobisitesi nedeniyle, alıkonma zamanları da yüksektir. Bu çalışmada kullanılan deneysel koşullar altında, %18'in altındaki ACN (EK9, EK10) oranlarının analiz süresini önemli ölçüde arttırması nedeniyle, ACN optimizasyonu %18-%25 aralığında gerçekleştirildi. Ancak, pH 6.5'te, analitlerin sudaki çözünürlüğünün artması nedeniyle analiz süresi azalmıştır. Bu nedenle, pH 6.5'teki optimum ACN bileşimi %10 olarak kabul edilmiştir.







Şekil 4.4. Sulu tampondaki ACN içeriğinin (%ACN) (A) pH 6,5'te (20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 10/90) , (B) pH 5,0 (20 mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 18/82 (h/h)) ve (C) pH 3,0 (20 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 10/90 (h/h)) (D) Sudaki ACN içeriğinin (%ACN) $\ln k'$ 'ye karşı U Şape grafiği Koşullarında sülfonamidlerin C12-diol karma mod kolonundaki alıkonma süresi (RT).

Kromatografik koşullar: ACN/tampon, akış hızı: 1 mL/dak, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 10 mL/100 ppm, dalga boyu: 250 nm. Analitler: SDZ, SMX, SMR, STZ, SMZ, SMOP, SDM ve SQX'tir.

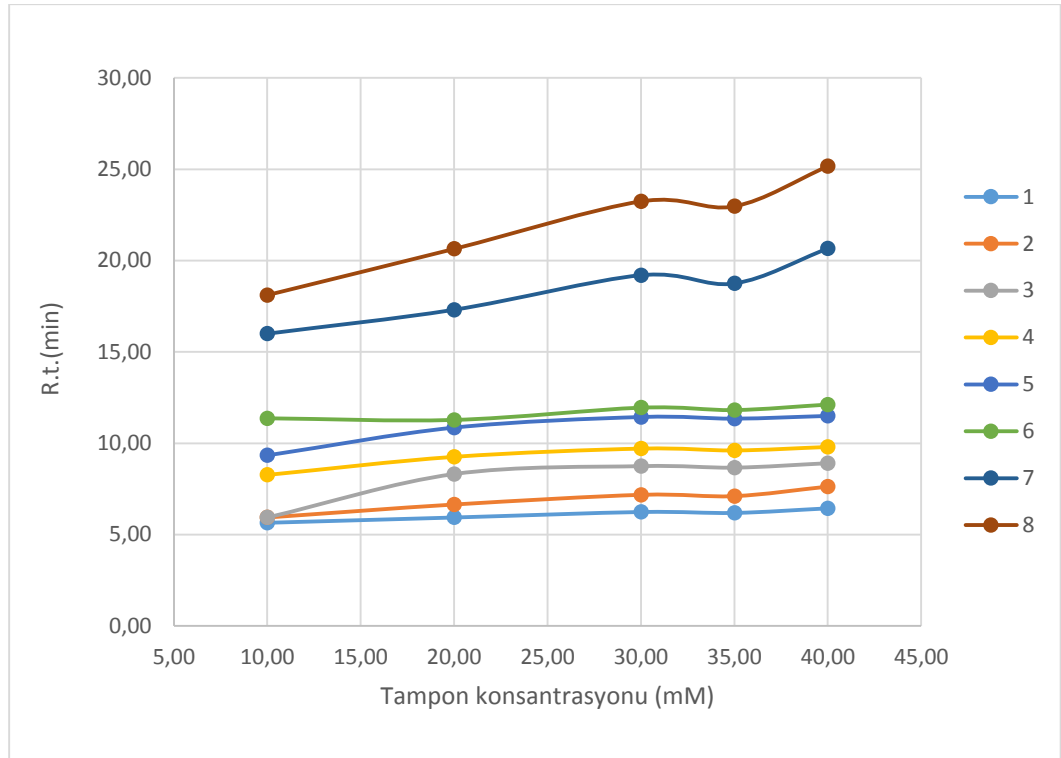
Şekil 4.4.'teki ilk üç grafikte görüldüğü gibi, tüm analitlerin alıkonma zamanları, üç pH değerinde de artan ACN oranı ile logaritmik olarak azalmıştır. Bu etki, pH 6.5'te özellikle belirgindir; burada analitlerin artan hidrofilikliği, ACN'ye duyarlılıklarını artırmıştır. ACN'nin analitlerin alıkonması üzerindeki etkisi, bu pH'da diğer pH değerlerine göre daha belirgin ve keskindir; özellikle bu grafikteki logaritmik ilişki daha belirgindir. Analitlerin hidrofilikliği daha yüksek pH değerlerinde artmasına ve etkileşim mekanizmasının karma modlu olmasına rağmen, bu analitlerin ACN'ye karşı davranışı ters faz mekanizmasıyla uyumludur.

Sulfonamidlerin C12-karma modlu kolonda alıkonma mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, tüm analitlerin hem ters faz hem de HILIC koşullarındaki alıkonma davranışı incelenmiştir. Suda % 10-90 oranında değişen asetonytril (ACN) hareketli fazı kullanılarak izokratik elüsyon gerçekleştirilmiştir. Her bir analitin tutulma faktörü (k') hesaplanarak, $\log k'$ değerleri % ACN'ye karşı grafiğe (Şekil 4.4.D) geçirilmiştir. Grafik, ters fazdan HILIC tutulmasına geçişi gösteren karakteristik bir U şekli sergilemiştir. Daha düşük ACN konsantrasyonlarında (%10-20), C12 sabit faz ile

hidrofobik etkileşimler nedeniyle güçlü tutulma gözlemlenmiştir. ACN oranı arttıkça, mobil fazın hidrofobik karakterinin azalmasıyla tutulma azalmıştır. Bununla birlikte, çok yüksek ACN konsantrasyonlarında (%80'den fazla), tutulmada hafif bir artış gözlemlenmiş olup, bu da HILIC etkileşimlerinin bir katkısını düşündürmektedir. Bu sonuçlar, sulfonamidlerin bu karma modlu sütunda tutulma davranışının, ters faz ve HILIC mekanizmalarının bir kombinasyonu tarafından kontrol edildiğini ve her bir mekanizmanın göreceli katkısının mobil fazın bileşimine bağlı olduğunu göstermektedir.

4.3. Tampon Konsantrasyonunun Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerindeki Etkisi

Sülfonamidlerin ayrılma ve alıkonması üzerine tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, optimum koşullar altında (pH 6.5, %10 ACN, 25 °C ve 1 mL/dk akış hızı), bir dizi $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ tampon çözeltisi (10, 20, 30, 35 ve 40 mM) kullanıldı. 10 mM tampon konsantrasyonu (EK31) tatmin edici bir ayırma sağlamazken, daha yüksek konsantrasyonlarda önemli farklılıklar gözlenmedi ve 40 mM (EK35) en iyi ayırma performansını verdi. Tampon konsantrasyonunun arttırılması, analitlerin alıkonma sürelerini önemli ölçüde değiştirmede. Ancak tampon konsantrasyonunun artmasıyla birlikte SDM ve SQX için alıkonma süresinde hafif bir artış gözlemlendi. Analit 5 ve 6'nın (sırasıyla SMZ ve SMOP) optimal ayrımının 40 mM'lik bir tampon konsantrasyonunda elde edildiği göz önüne alındığında, bu konsantrasyonun optimal olduğu kabul edildi ve sonraki akış hızı ve sıcaklık optimizasyonları için kullanıldı.

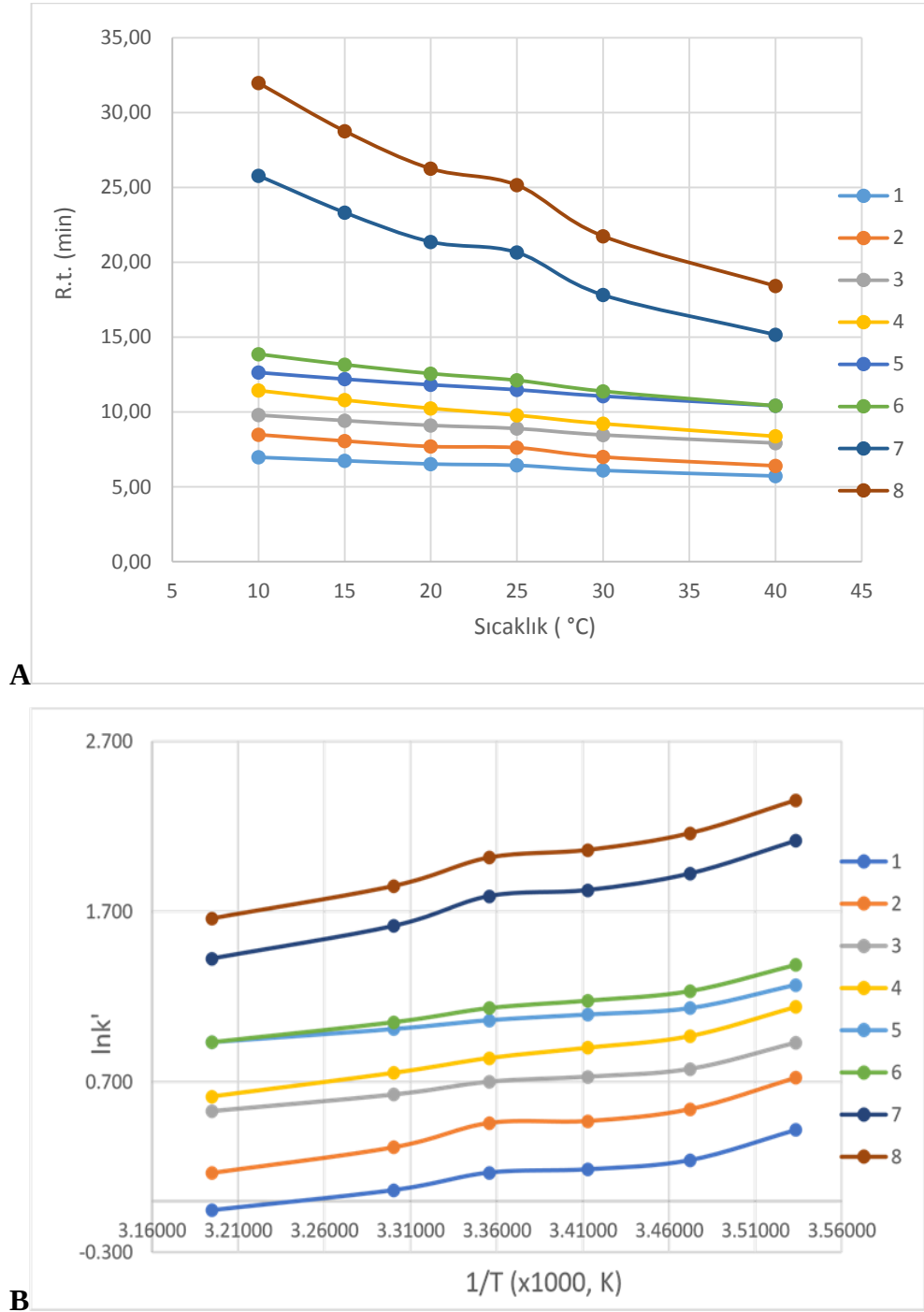


Şekil 4.5. Tampon konsantrasyonunun sülfonamidlerin C12-diol karma mod kolonunda alıkonma süresi üzerindeki etkisi Analitler: (1) (SDZ), (2) (SMX), (3) (SMR), (4) (STZ), (5) (SMZ), (6) (SMOP), (7) (SDM), (8) (SQX).

4.4. Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık, kromatografik ayırma süreçlerinde kritik bir parametre olarak önemli bir rol oynamaktadır. Ayrılma performansı, kullanılan yöntemin türüne, analitlerin kimyasal özelliklerine ve kolonun özelliklerine bağlı olarak sıcaklıkla doğrudan etkilenebilir. HPLC gibi sıvı kromatografi tekniklerinde, sıcaklık değişimi genellikle analitlerin kolon üzerindeki etkileşimlerini değiştirir ve bunun sonucunda ayrılma verimliliği ve çözünürlük üzerinde belirgin etkiler gözlemlenebilir. Y. Li vd. (2016).

Bu çalışmada, karma mod özelliğine sahip C12-DIOL mixed-mod kolonuyla çeşitli sulfonamidlerin ayrılması, farklı sıcaklık şartlarında incelenmiştir. Ayırma için optimum sıcaklığı belirlemek üzere, optimum koşullar altında (pH 6.5, %10 ACN, 40 mM tampon konsantrasyonu ve 1 mL/dk akış hızı), 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 °C sıcaklıklarda deneyler tekrarlandı. SMZ ve SMOP arasında en iyi baseline ayırmayı sağladığı için, optimum sıcaklık 15 °C (EK37) olarak belirlendi. Şekil 4.6. 'da gösterildiği gibi, analitlerin alıkonma zamanları sıcaklık artışıyla azalmıştır. Bu azalma kesinlikle doğrusal değil, logaritmik bir ilişki sergilemiştir.



Şekil 4.6. Sıcaklığın, sülfonamidlerin C12-diol karma mod kolonu üzerindeki (A) alıkonma süresi (R.T.) ve (B) $\ln k'$ ile $1/T$ (Van't Hoff denklemi) arasındaki ilişki üzerine etkisi. Analitler: (1) (SDZ), (2) (SMX), (3) (SMR), (4) (STZ), (5) (SMZ), (6) (SMOP), (7) (SDM), (8) (SQX).
 k' : kapasite faktörü

Van't Hoff denklemi, sıcaklığın kimyasal denge ve reaksiyon hızları üzerindeki etkisini niceliksel olarak değerlendirmenize olanak tanır. Bu denklem, bir kimyasal

reaksiyonun ya da ayrılma mekanizmasının sıcaklıkla nasıl değiştiğini gösterir ve entalpi değişimi üzerinden yorumlanabilir. Bu çalışmada sıcaklık artışı ile birlikte gözlemlenen ayırma etkinliği değişimlerini açıklamak için bu denklemi kullanılarak ayrılma süreçleri değerlendirildi. Bu amaçla sıcaklığın sülfonamid ilaçların HPLC ile ayrılmasına etkisini incelemek amacıyla kapasite faktörü (k') ile sıcaklık arasındaki ilişki incelendi (Şekil 4.6.B). k' analitlerin kolondaki kalma süresine ilişkin bir ölçüttür ve sıcaklık değişimleriyle birlikte bu değerlerin nasıl değiştiğini gözlemlemek, ayrılma mekanizması hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Elde edilen sonuçlar $\ln k'$ değerinin $1/T$ 'ye (sıcaklığın tersine) karşı çizilen grafikte değerlendirildi. Bu grafik üzerinden Van't Hoff denklemi kullanılarak entalpi değişimi (ΔH°) ve entropi değişimi (ΔS°) parametreleri hesaplandı (Tablo 4.2). Van't Hoff Denklemi, sıcaklık ile denge sabitleri k' arasındaki ilişkiyi açıklar ve bu denklemi kullanarak elde edilen termodinamik veriler, ayrılma mekanizması üzerine derinlemesine bir anlayış geliştirmemize olanak tanımaktadır.

Farklı sıcaklık koşulları altında yapılan analizler, termodinamik parametrelerin ayırma mekanizmasına önemli ölçüde etki ettiğini göstermiştir. Y. Li vd. (2016). Mixed-mod kolonlar, hem hidrofilik etkileşimler hem de hidrofobik etkileşimleri bir arada kullanarak ayırma sağlar. Sıcaklık değişiminin bu mekanizmalara etkisi, sistemin genel ayırma kapasitesini ve seçiciliğini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır.

Şekil 4.6.'de görüldüğü üzere, elde edilen grafik tamamen olmasa da doğrusala yakın bir ilişkiyi gösteriyor. Bu da Van't Hoff denklemine uygun olduğu anlamına gelir. Sıcaklık ile k' arasındaki bu doğrusala yakın ilişki analitlerin büyük ölçüde ters faz mekanizmasına göre etki ettiği, ancak hidrofilik etkileşimlerin de rol oynadığı anlamına gelmektedir. Grafiklerdeki doğrusallıktan küçük sapma hidrofilik etkileşimlerin rol oynamasının göstergesi olabilir. Her bir analite ait doğru eğiminin ve y eksenini kesme noktalarının farklı olması, farklı ΔH° ve ΔS° değerlerinin elde edilmesi (Tablo 4.2) her analitin kolonla etkileşiminin sıcaklık değişimine farklı cevap verdiğini gösterir. Bu da her analitin kolonla olan etkileşim özelliklerinin farklı olduğu anlamına gelir. Özellikle 7 ve 8 nolu eğrilerin eğimi diğerlerine göre çok daha dik iken 3 ve 5 nolu eğrilerin eğimi daha yatayıdır. Bu da, 7 ve 8 nolu bileşiklerin kapasite faktörü sıcaklığın değişiminden daha çok etkilendiği, 3 ve 5 no'lu analitlerin ise daha az etkilendiği anlamını taşır.

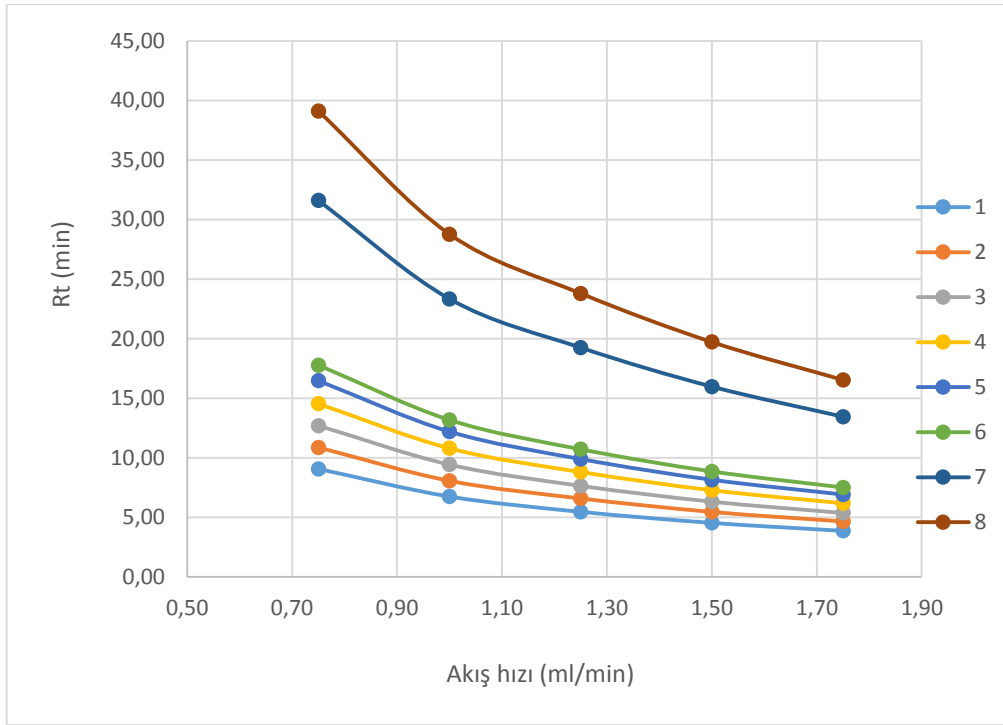
Tablo 4.2. Van't Hoff eşitliğinden elde edilen ΔH° ve ΔS° değerleri (Şekil 4.6 B)

HPLC elüsyon sırası	Analit	ΔH (kJ/molK)	ΔS (J/molK)
1	(SDZ)	-10,60	-34,00
2	(SMX)	-12,77	-39,44
3	(SMR)	-9,09	-24,75
4	(STZ)	-12,17	-33,92
5	(SMZ)	-7,59	-13,83
6	(SMOP)	-10,45	-25,73
7	(SDM)	-16,30	-38,24
8	(SQX)	-16,22	-39,99

Tablo 4.2’de görülen negatif ΔH° değerleri bağlanma olayının ekzotermik olduğunu göstermektedir. Bunun sonucu olarak sıcaklık arttıkça analitlerin kolon üzerindeki alıkonma eğilimleri azalmakta ve k' küçülmektedir. Negatif ΔS° değerleri ise etkileşim sırasında sistemin daha düzenli hale geldiğini göstermektedir. 2, 7 ve 8 no’lu analitlerin ΔS° negatiflik değeri daha yüksek iken 5 ve 6’nınki daha düşüktür. Bu da 2, 7 ve 8 nlu analitlerin kolon ile daha düzenli etkileşim yaptığı anlamına gelebilir. Nihayetinde bu çalışma sulfonamidlerin C12-Mixed-mod kolon ile etkileşimlerinde değişen sıcaklığın ayırma davranışlarını anlamada önemli bilgiler sunmaktadır. Değişen sıcaklık sulfonamidlerin mevcut kolon ile etkileşimlerinde önemli rol oynamakta analitlerin sıcaklığa karşı farklı davranışlar sergilediği anlaşılmaktadır. Bu verilen sulfonamidlerin farklı kolon kullanılarak analiz edilmesinde önemli bir ışık olacaktır.

4.5. Akış Hızının Sülfonamidlerin Ayrılması ve Alıkonması Üzerindeki Etkisi

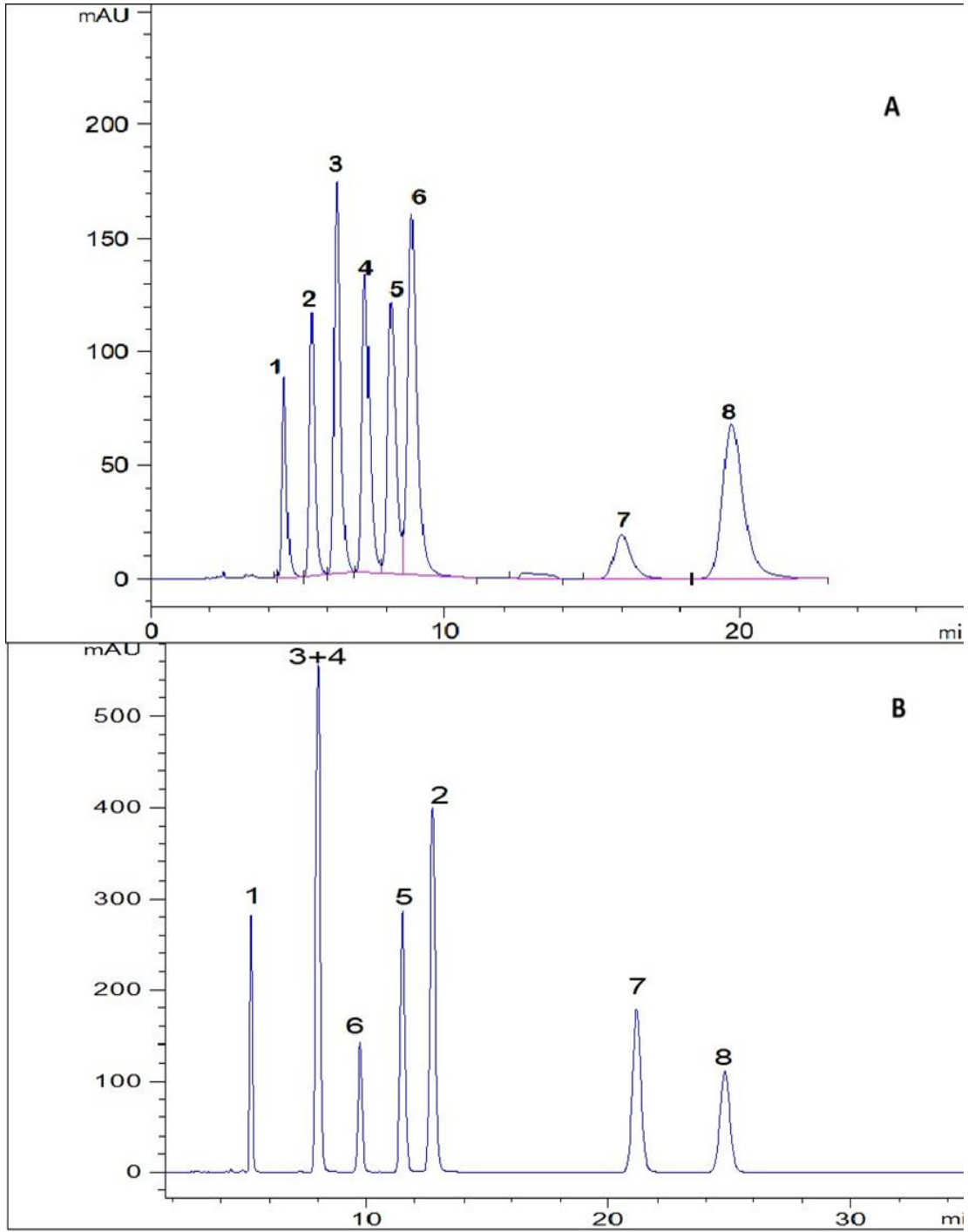
Optimum koşullar altında (pH 6.5, %10 ACN, 40 mM tampon ve 15 °C), 0.75, 1.0, 1.25, 1.50 ve 1.75 mL/dk akış hızlarında akış hızı optimizasyonu yapıldı. Şekil 8’de gösterildiği gibi, akış hızındaki artış, analit alıkonma zamanında logaritmik bir azalmaya neden olmuştur. Akış hızı azaldıkça analiz süresi artmasına rağmen, SMZ ve SMOP arasındaki ayırma seçiciliği önemli ölçüde değişmemektedir. Bu nedenle, daha kısa bir analiz süresi sağlayan 1.5 mL/dk (EK45) akış hızı, optimum akış hızı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.7. Akış hızının, sülfonamidlerin C12-diol kolonu üzerindeki alıkonma süresi (R.T.) üzerine etkisi. Analitler: (1) (SDZ), (2) (SMX), (3) (SMR), (4) (STZ), (5) (SMZ), (6) (SMOP), (7) (SDM), (8) (SQX).

4.6. C12 Karma Mod ve ODS C18 Sabit Fazların Karşılaştırılması

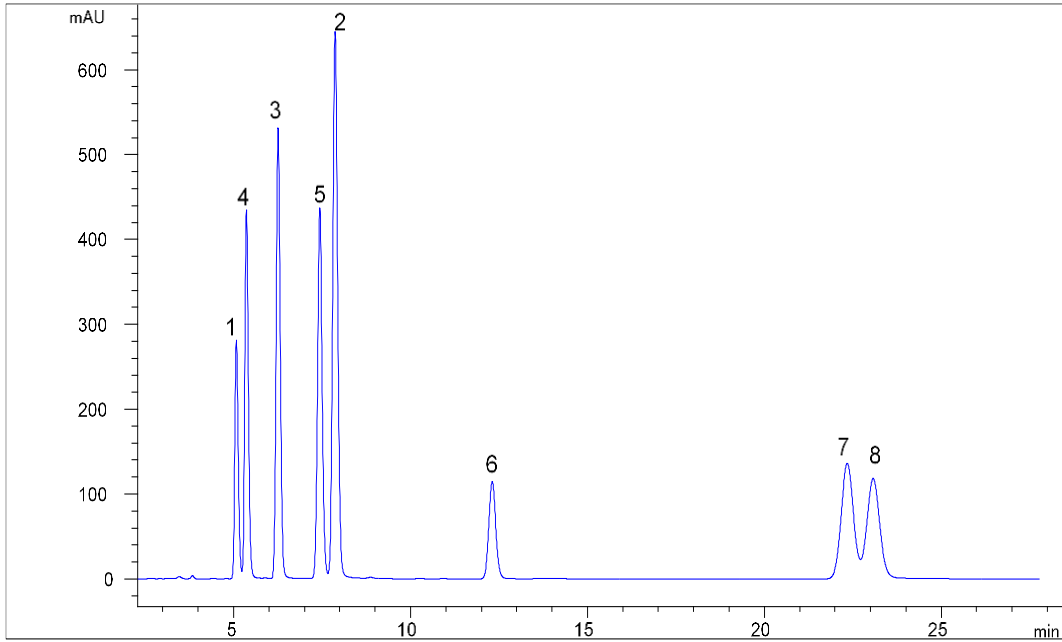
C12-mixed-mod kolonun ayırma performansını ve alıkonma davranışını daha iyi anlamak için sonuçlar ticari olarak temin edilen bir ODS-C18 kolon ile karşılaştırıldı. (Şekil 4.8.) Karşılaştırmanın sağlıklı olabilmesi için sekiz adet sülfonamid önce şekil 4.2’de verilen C12-mixed-mod kolon için optimize edilen şartlarda ODS C18 kolona verildi. Bu şartlarda 7 adet sülfonamidin ayrılması sağlanabilirken analiz süresi 26 dakika sürmüştür (Şekil 4.8. B). 7 adet sülfonamid bileşiği için harika pik keskinliği ve yüksek selektivite elde edilirken SMR ve STZ’nin ayrılması bu şartta sağlanamadı. Bu şart C12-mixed-mod kolonun optimum şartları olduğu için ayırma performansından ziyade analiz süresi ve alıkonma davranışlarının kıyaslanması önemlidir. SDZ (1) dışında tüm analitlerin ODS-C18 kolon üzerinde daha fazla tutunduğu görülmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, apolar karakterleri çok yüksek olan, çoğunlukla ters faz davranışı gösteren sülfonamidlerin ODS C18 üzerinde bir miktar daha fazla tutunması normal bir beklenen bir sonuçtur. pH 6.5 olan bu şartta iki kolon arasında önemli iki fark vardır: ODS-C18 çok daha keskin piklere sahipken C12-diol-mixed mod kolon ise sekiz analiti ayırabilmesi ile daha iyi bir selektiviteye sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.8. Şekil 4.6.A’da verilen koşullar altında Sekiz sülfonamidin ayrılmasında (A) C12diol-mixed mode ve (B) ODS C18’in karşılaştırması.

Ayrırma performanslarının daha adil ve sağlıklı olabilmesi için ayrırma şartları ODS-C18 kolon için de optimize edildi. pH 3 ile 7.5 arasında çeşitli şartlar (mobil faz oranı, tampon derişimi, vb) denenerek en iyi ayrırma şartı arandı. pH 5.0’da ACN/SU: 20/80 çözücü oranı ile 8 analitin ayrılması 25 dk içinde sağlanabildi (Şekil 4.9.). Bu şartta SDM (7) ve SQX (8) 22-24 dk aralığında hemen hemen bezlayn çizgisine yakın ayrırma

verdi. Analiz süresi 20 dakikata kısaltılmaya çalışıldığında 7 ile 8 ve 1 ile 4 iç içe geçmeye başlamıştır.



Şekil 4.9. ODS C18 kolon ile optimum koşullarda sülfonamidlerin ayrılması. ACN/Tampon (pH 5.0, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄, 20/80 (v/v)), Akış Hızı: 1.0 mL/min, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon Hacmi: 5 µL/100 ppm, Dalga Boyu: 260 nm. Analitler: (1) (SDZ), (2) (SMX), (3) (SMR), (4) (STZ), (5) (SMZ), (6) (SMOP), (7) (SDM), (8) (SQX).

Şekil 4.3 ve Tablo 4.1'deki verilere bakıldığında analitlerin logD sıralaması pH 6.5'de: 2<1<6<4<3<5<7<8 ve pH 5.0'da 1<6<3<5<2<4<7<8 şeklindedir. Bu sıralama soldan sağa doğru hidrofobisitenin arttığı sıralamadır. Her iki pH şartında da elüsyon sırası bu sıralamaya uymamaktadır. Oysaki ODS-C18 tek boyutlu etkileşim, sadece hidrofobik etkileşim yapan bir sabit fazdır. Elüsyon sıralaması ile hidrofobisitenin paralel olması beklenebilirdi. Ancak durum sonuçlar bunu göstermiyor. Bu durumun nedeni ACN'nin polar etkileşimlerinin göz ardı edilmesinden kaynaklı olduğu kanaatindeyiz. SU/ACN karışında ACN apolar çözücü olarak kabul edilir oysaki ACN'nin dipol momenti sudan çok daha yüksek olup daha polar bir bileşiktir. Haliyle yüksek non polar grupların yanı sıra polar sülfonamid grubu (amid NH) içeren sülfonamid bileşikler ile ACN arasında hidrofobik etkileşimlerin yanı sıra dipol-dipol ve iyon-dipol gibi etkileşimlerin de olması yüksek olasıdır. Analitler zaten ACN ile hidrofobik etkileşim yapıyorken aynı anda polar etkileşimleri de yapması ortamı daha kararlı kılacaktır. Kısacası analitler su ile sadece hidrofilik etkileşim yapabiliyorken ACN ile hem hidrofilik hem hidrofobik etkileşimleri beraber yapabilmektedir. Muhtemelen bu nedenledir ki logD sıralaması ile elüsyon sıralaması birbirine paralel değildir.

Sonuç olarak her iki kolon kıyaslandığında ODS-C18 ile çok daha iyi pik keskinliği elde edilirken C12-DİOL-mixed-mod kolon sekiz analiti 20 dakikada ayırmakla daha iyi selektivite göstermiştir. Polar gruplar içeren HILIC ve mixed-mod tip kolonlar çoklu ve karmaşık polar etkileşimlerden dolayı geleneksel C18 kolonlarla kıyaslandığında pik keskinliklerinde bir miktar düşüş olması genellikle gözlenen bir durumdur. Mixed-mod alanındaki tüm çalışmalar selektivitenin yanı sıra mükemmel etkinlikte kolonlar elde etme amacını taşımaktadır. Bu nedenle mixed-mod ayırma ve etkileşim mekanizmasının araştırılması, incelenmesi gelecekte daha iyi, daha etkin ve daha dayanıklı kolonların geliştirilmesi için büyük önem taşır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar de buna büyük katkı sağlayacaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Analitik örneklerin artan karmaşıklığı ve tek bir kromatografi kolonunu kullanarak verimli ayırma isteği, araştırmacıları karma modlu kromatografinin gelişimine yönlendirmiştir. Alan önemli bir büyüme göstermesine rağmen, uygun sabit fazların ticari olarak temin edilebilirliği sınırlıdır. Bu çalışma, sülfonamidleri model analitler olarak kullanarak, ticari olarak temin edilebilen bir C12-diol karma modlu sabit fazın ayırma performansı ve altta yatan mekanizmalarını araştırmıştır. Hem hidrofobik hem de hidrofilik fonksiyonelliğe sahip olan ve pH'ya bağlı davranış sergileyen bu analitler, karma modlu sistemlerdeki karmaşık etkileşimleri incelemek için uygun bir platform sağlar. Sekiz sülfonamidin ayırımı, 20 dakika içinde hem izokratik hem de gradyan elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiş ve tutunma davranışı, QSRR parametreleri olan logP, logD ve pKa ile ilişkilendirilmiştir. pH, mobil faz bileşimi, tampon konsantrasyonu, akış hızı ve sıcaklığın analitlerin ayrılma ve alıkonması üzerine etkileri incelenmiştir.

5.1 Sonuçlar

Sonuçlar ticari bir ODS-C18 kolonla kıyaslanmıştır. ODS-C18 ile daha iyi pik keskinlikleri elde edilirken C12-DİOL-mixed-mod kolon daha iyi selektivite göstermiştir. Polar gruplar içeren HILIC ve mixed-mod tip kolonlar çoklu ve karmaşık polar etkileşimlerden dolayı geleneksel C18 kolonlarla kıyaslandığında pik keskinliklerinde bir miktar düşüş olması genellikle gözlenen bir durumdur. Mixed-mod alanındaki tüm çalışmalar selektivitenin yanı sıra mükemmel etkinlikte kolonlar elde etme amacını taşımaktadır. Bu nedenle mixed-mod ayırma ve etkileşim mekanizmasının araştırılması, incelenmesi gelecekte daha iyi, daha etkin ve daha dayanıklı kolonların geliştirilmesi için büyük önem taşır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da buna büyük katkı sağlayacaktır.

5.2 Öneriler

Sonuçlar, sabit fazın, HILIC ve ters faz modlarının unsurlarını birleştiren hibrit bir mekanizma ile çalıştığını göstermektedir. Sülfonamidlerin HPLC ayrılması için karma

modlu kolonun kullanımı, analitik araştırma için önemli bir metodolojik gelişme sunar. Ters faz ve iyon değişimi etkileşimlerini entegre ederek, bu yaklaşım son derece seçici ve hassas ayırımlar sağlar. Sülfonamidlerin geniş polarite aralığı ve kimyasal çeşitliliği göz önüne alındığında, bu yöntem, benzer fizikokimyasal özelliklere sahip diğer analitlere de, geniş bir uygulama alanı sunar. Ayrıca, ilaç, gıda güvenliği ve çevresel izlemede düzenleyici uyumluluk ve kalite kontrol için sağlam ve güvenilir bir analitik çerçeve sağlar. Bu çalışma, karma modlu kromatografinin çok yönlülüğünü vurgulayarak, yenilikçi ayırma stratejilerinin geliştirilmesine ve modern kromatografi tekniklerinin analitik kapasitelerinin artırılmasına katkıda bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Abraham, M. H., Ibrahim, A. & Zissimos, A. M., (2004). Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *J. Chromatogr.* 1037, 29–47.
- Amran, M.B. , Aminah, S. , Rusli, H. & Buchari, B. (2020). Bentonite-based functional material as preconcentration system for determination of chromium species in water by flow injection analysis technique. *Heliyon*, 6, e04051. [CrossRef] [PubMed]
- Aral, H. , Aral, T. , Ziyadano ̇gulları, B. & Ziyadano ̇gulları, R. (2013). Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones. *Talanta*, 116, 155–163. [CrossRef]
- Aral, T. , Aral, H. , Ziyadano ̇gulları, B. & Ziyadano ̇gulları, R. (2015). Synthesis of a mixedmodel stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta*, 131, 64–73. [CrossRef]
- AUSTIN R. L., CHARLES R. S. & STEVEN A. B. (1990).), Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk *Journal Qf Chromatography*, 502 (1990) 87—94.
- Bai, Q. , Liu, Y. , Wang, Y. , Zhao, K. , Yang, F. , Liu, J. , Shen, J. & Zhao, Q. (2018). Protein separation using a novel silica-based RPLC/IEC mixed-mode stationary phase modified with N-methylimidazolium ionic liquid. *Talanta*, 185, 89–97. [CrossRef]
- Bo, C. , Li, Y. , Liu, B. , Jia, Z. , Dai & X. , Gong, (2021). B. Grafting copolymer brushes on polyhedral oligomeric silsesquioxanes silsesquioxanedeckorated silica stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1659, 462627. [CrossRef][PubMed]
- Bouvier, E.S. & Koza, S.M. (2014). Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.* 63, 85–94. [CrossRef]
- Busby, K.N. , Fulzele, A. , Zhang, D. , Bennett, E.J. & Devaraj, N.K. (2020). Enzymatic RNA Biotinylation for Affinity Purification and Identification of RNA–Protein Interactions. *ACS Chem. Biol.*, 15, 2247–2258. [CrossRef]
- Cannavan, A., Hewitt, S.A., Blanchflower, W.J. & Kennedy, D.G. (2004). *Analyst* 121 (1996) 1457. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.038>.
- Capasso, C. & Supuran, C.T. (2014). Sulfa and trimethoprim-like drugs-antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 29, 379–387. [CrossRef] [PubMed]

- Carta, F. , Scozzafava, A. & Supuran, C.T. (2012). Sulfonamides: A patent review (2008–2012). *Expert Opin. Ther. Pat.* 22, 747–758. [CrossRef] [PubMed]
- Carta, F. & Supuran, C.T. (2013). Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: A patent and literature review (2005–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2013, 23, 681–691. [CrossRef][PubMed]
- Carta, F. , Supuran, C.T. & Scozzafava, A. (2014) Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med. Chem.* 6, 1149–1165. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, M. & Chen, L. (2018). A novel high hydrothermal stability amino- functionalized stationary phase prepared by a vapour deposition method. *Anal. Methods*, 10, 1538–1546.
- Chen, J. , Xu, N. , Guo, P. , Wang, B. , Zhang, J. , Xie, S. & Yuan, L.A. (2021). Chiral metalorganic framework core-shell microspheres composite for high-performance liquid chromatography enantioseparation. *J. Sep. Sci.* 44, 3976–3985. [CrossRef] [PubMed]
- Chu, Z., Zhang, L.& Zhang, W. (2018). 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*, 1036, 179–186.[CrossRef] [PubMed]
- Chu, X., Sasaki, T., Aono, A., Kudo, Y., Tanaka, K.& Fuse, Y. (2021). Thermal desorption gas chromatography-mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric fine particulate matter. *J. Chromatogr.* 1655, 462494. [CrossRef]
- Cong, H., Xing, J., Ding, X., Zhang, S., Shen, Y.& Yu, B. (2020). Preparation of porous sulfonated poly(styrene-divinylbenzene) microspheres and its application in hydrophilic and chiral separation. *Talanta*, 210, 120586. [CrossRef]
- Dong, C.D., Chen C.F.& Chen, C.W. (2012). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Industrial Harbor Sediments by GC-MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 2175–2188. [CrossRef] [PubMed]
- Dost, K., Jones, D.C. & Davidson, G. (2000). *Analyst* 125 (2000) 1243. [3] D.D. Holland, S.E. Katz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 784.
- D.R. Doerge, S.& Bajic, S. Lowes, (1993). *Rapid Commun. Mass spectrom* 7 1126.
- Eldin, M.S.M., Rahman, S.A.& El Fawal, G.F (2020). Novel immobilized Cu²⁺-aminated poly (methyl methacrylate) grafted cellophane membranes for affinity separation of HisTag chitinase. *Polym. Bull.* 77, 135–151. [CrossRef].
- Fernández-Navarro, J., Torres-Lapasió, J.R.; Ruiz-Angel, M.-J.&García-ÁlvarezCoque, M. (2022). Silanol suppressing potency of alkylimidazolium ionic liquids on C18

- stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2012, 1232, 166–175. [CrossRef] *Molecules*, 27, 907 20 of 20.
- Fu, Y., Borrull, F., Fontanals, N. & Marcé-Recasens, R.M (2020). Comparison of polysaccharide-based and protein-based chiral liquid chromatography columns for enantioseparation of drugs. *Chirality*, 32, 876–884. [CrossRef]
- Gezici, O. & Bayrakci, M. (2015) Calixarene-engineered surfaces and separation science. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 83, 1– 18.
- Guo, D., Lou, C., Zhang, P., Zhang, J., Wang, N., Wu, S. & Zhu, Y. (2016). Polystyrene-divinylbenzene-glycidyl methacrylate stationary phase grafted with poly (amidoamine) dendrimers for ion chromatography. *J. Chromatogr.* 1456, 113–122. [CrossRef]
- Haagsma, N., Pluijmarker, G.J., Aerts, M.M.L. & Beek, W.M.J., (1987). *Biomed. Chromatogr.* 2 41.
- Halfpenny, A. P. & Brown, P. R. (1986). Mixed-mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and nonionic nucleic-acid constituents. *Chromatographia*, 21, 317–320.
- Hanai, T. (2019). Fundamental Properties of Packing Materials for Liquid Chromatography. *Separations*, 6, 2. [CrossRef]
- He, S., He, Y., Cheng, L., Wu, Y. & Ke, Y. (2018). Novel chiral ionic liquids stationary phases for the enantiomer separation of chiral acid by high-performance liquid chromatography. *Chirality*, 30, 670–679. [CrossRef] [PubMed]
- Ho, T. D., Zhang, C., Hantao, L. W. & Anderson, J. L. (2014). Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives. *Anal. Chem.* 86, 262– 285.
- Hong, T. T., Yang, X., Xu, Y. J. & Ji, Y. B. (2016). Recent advances in the preparation and application of monolithic capillary columns in separation science. *Anal. Chim. Acta* 2016, 931, 1–24.
- Horak, J. & Lämmerhofer, M. (2019). Stereoselective separation of underivatized and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatized amino acids using zwitterionic quinine and quinidine type stationary phases by liquid chromatography– High-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1596, 69–78. [CrossRef]
- Hou, Y., Lu, J., Wei, D., Lv, Y., He, H., Wang, C. & He, L. (2021). Establishment of substance P modified affinity chromatography for specific detection and enrichment of Mas-related G protein-coupled receptor X2. *J. Chromatogr.* 1659, 462633. [CrossRef] [PubMed].
- Hovhannisyan, R.H. & Carstens, R.P. (2009). Affinity chromatography using 20 fluorosubstituted RNAs for detection of RNA-protein interactions in RNase-rich or RNase-treated extracts. *BioTechniques*, 46, 95–98. [CrossRef]

- Hrobošová, K., Moravčík, J., Lehotay, J. & Armstrong, D.W. (2015). Determination of methionine enantiomers by HPLC on the cyclofructan chiral stationary phase. *Anal. Methods*, 7, 4577–4582. [CrossRef]
- Hu, K., Zhang, W. F., Yang, H. X., Cui, Y. X., Zhang, J. Y., Zhao, W. J., Yu, A. & Zhang, S. S. (2016). Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography. *Talanta*, 152, 392–400.
- Huang, T., Zhang, W., Lei, X., Chen, H., Lin, C. & Wu, X. (2021). 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. (2021). DNA affinity purification sequencing and transcriptional profiling reveal new aspects of nitrogen regulation in a filamentous fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2009501118. [CrossRef] [PubMed]
- Janco, M., Iv, J.N.A., Bouvier, E.S.P. & Morrison, D. (2013). Ultra-high performance size exclusion chromatography of synthetic polymers: Demonstration of capability. *J. Sep. Sci.* 36, 2718–2727. [CrossRef]
- Jandera P., Hájek T., Škeříková V. & Soukup J. (2010). Dual Hydrophilic Interaction-RP 588 Retention Mechanism on Polar Columns: Structural Correlations and Implementation 589 for 2-D Separations on a Single Column, *Journal of Separation Science*. 33, 590 no. 6–7, 841–52. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900678>. 591.
- Jandera P. & Janás P. (2017). Recent Advances in Stationary Phases and Understanding of 592 Retention in Hydrophilic Interaction Chromatography. A Review, *Analytica Chimica Acta*. 967, 12–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.060>. 594
- Jen, J.F., Lee, H.L., & Lee, B. J. (1998). *Chromatogr. A* 793. 378.
- Jiang, Q., Zhao, W. J., Qiu, H. D. & Zhang, S. S. (2016). Silica-based phenyl and octyl bifunctional imidazolium as a new mixed-mode stationary phase for reversed phase and anion-exchange chromatography. *Chromatographia* 2016, 79, 1437–1443.
- Ji, B., Yi, G., Gui, Y., Zhang, J., Long, W., You, M., Xia, Z. & Fu, Q. (2021). 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*, 13, 41075–41083. [CrossRef]
- Jin, G., Ding, J., Zhou, Y., Xia, D., Guo, Z. & Liang, X. (2021). Synthesis and chromatographic evaluation of pyrazinedicarboxylic anhydride bonded stationary phase. *J. Chromatogr.* 1638, 461825. [CrossRef].
- Jovanović M. & Stojanović B. J. (2013). Thorough Investigation of the Retention Mechanisms 604 and Retention Behavior of Amides and Sulfonamides on Amino

- Column in 605 Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*. 606,1301, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.034>
- Kawamura, I., Mijiddorj, B., Kayano, Y., Matsuo, Y., Ozawa, Y., Ueda, K. & Sato, H. (2020). Separation of D-amino acid-containing peptide phenylsepin using 3,30-phenyl-1,10binaphthyl-18-crown-6-ether columns. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteom.* 1868, 140429. [CrossRef]
- Kim Y. R., Park S., Kim J. Y., Choi J. D. & Moon G. I. (2024). Simultaneous Determination of 490 31 Sulfonamide Residues in Various Livestock Matrices Using Liquid 491 Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Applied Biological Chemistry*. 492 67, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00864-z>.
- Kothencz, R., Nagy, R., Bartha, L., Tóth, J. & Vágó, Á. (2018). Analysis of the interaction between polymer and surfactant in aqueous solutions for chemical-enhanced oil recovery. *Part. Sci. Technol.* 36, 887–890. [CrossRef]
- Li, C., Di, B., Hao, W. Q., Yan, F. & Su, M. X. (2011). Aminopropyl- functionalized ethanebridged periodic mesoporous organosilica spheres: preparation and application in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1218, 408–415.
- Li, S., Li, Z., Zhang, F., Geng, H. & Yang, B. A (2020). polymer-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 26, 120927. [CrossRef]
- Li, Y., Zhu, N., Chen, T., Wei M. & Y. Ma (2016). Stationary phase based on β -cyclodextrin and Poly(Nisopropylacrylamide) for HILIC and RPLC, *Chromatographia* 79, 29–36.
- Lin, H., Ou, J., Zhang, Z., Dong, J., Wu, M. & Zou, H. (2012). Facile Preparation of Zwitterionic Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary Column with an Improved “One-Pot” Approach for Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography (HILIC). *Anal. Chem.* 84, 2721–2728. [CrossRef] [PubMed]
- Lin, H., Ou, J., Liu, Z., Wang, H., Dong, J. & Zou, H. (2015). Facile construction of macroporous hybrid monoliths via thiol-methacrylate Michael addition click reaction for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1379, 34–42. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, S. J., Zhou, F., Xiao, X. H., Zhao, L., Liu, X. & Jiang, S. X. (2004). Surface confined ionic liquid – a new stationary phase for the separation of ephedrine in highperformance liquid chromatography. *Chin. Chem. Lett.* 15, 1060–1062.
- Littlefield, N.A., Sheldon, W.D., Allen, R. & Gaylor, D.W. (1990). *Food Sci. Toxicol.* 28. 157.
- Lu, H.-L., Lin, D.-Q., Zhang, Q.-L. & Yao, S.-J. (2017). Evaluation on adsorption selectivity of immunoglobulin G with 2-mercapto-1-methyl-imidazole-based hydrophobic chargeinduction resins. *Biochem. Eng. J.*, 119, 34–41. [CrossRef]

- Lung, S.-C.C. & Liu, C.-H. (2015). Fast analysis of 29 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs with ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry. *Sci. Rep.* 5, 12992. [CrossRef]
- Malintan, N.T.& Mohd, M.A (2006). Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.005>.
- Mallik, A.K., Noguchi, H., Han, Y., Kuwahara, Y., Takafuji, M.& Ihara, H. (2018). Enhancement of Thermal Stability and Selectivity by Introducing Aminotriazine Comonomer to Poly(Octadecyl Acrylate)-Grafted Silica as Chromatography Matrix. *Separations*, 5, 15. [CrossRef]
- Mallik, A.K., Noguchi, H., Rahman, M.M., Takafuji, M. & Ihara, H. (2018). Facile preparation of an alternating copolymer-based high molecular shape-selective organic phase for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1555, 53–61. [CrossRef]
- Msagati, T.A.M. & Nindi, M.M. (2004). Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *TALANTA* 1016/10 87-88 [152] C.M. Stowe, in: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, L.M. Jones (Ed.), Iowa University Press, Ames IA, 1965, p. 457. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801048>.
- Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A. & Supuran, C.T. (2013). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: A patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, 705–716. [CrossRef] [PubMed]
- Maya, F. & Svec, F. A (2014). new approach to the preparation of large surface area poly(styrene-co-divinylbenzene) monoliths via knitting of loose chains using external crosslinkers and application of these monolithic columns for separation of small molecules. *Polymer* 2014, 55, 340–346. [CrossRef]
- Mermat, N., Ferroukhi, O., Peulon-Agasse, V., Bayle, J.P., Guermouche, M.H. & Cardinael, P. (2020). Original Mesogenic Citronellol-Based Stationary Phase for Both Normal- and Reversed-Phase HPLC Modes: Properties and Applications. *Chromatographia* 83,1495–1508. [CrossRef]
- Mokhtari, B., Pourabdollah, K. & Dalali, N., (2011). Analytical applications of calixarenes from 2005 up-to-date. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 69, 1–55.
- Mokhtari, B., Pourabdollah, K. & Dalali, N. (2011). Applications of nano- baskets of calixarenes in chromatography. *Chromatographia*, 73, 829–847.
- Monti, S.M., Supuran, C.T. & De Simone, G. (2013). Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: A patent review (2008–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, 737– 749. [CrossRef] [PubMed]

- Moravcová, D. & Planeta, J. (2018). Monolithic Silica Capillary Columns with Improved Retention and Selectivity for Amino Acids. *Separations*, 5, 48. [CrossRef]
- Naghdi, E., Fakhari, A.R., Baca, M. & De Malsche, W. (2020). Simultaneous enantioseparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by a one-dimensional liquid chromatography technique using a dynamically coated chiral porous silicon pillar array column. *J. Chromatogr.* 1615, 460752. [CrossRef] [PubMed]
- Neri, D. & Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 767–777. [CrossRef] [PubMed]
- Nguyen, L.A., He, H. & Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: An overview. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS*, 2, 85. [PubMed]
- Onopiuk, A., Kołodziejczak, K., Marcinkowska-Lesiak, M. & Poltorak, A. (2022). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using different extraction methods and HPLC-FLD detection in smoked and grilled meat products. *Food Chem.* 373, 131506. [CrossRef]
- Ovung A. & Bhattacharyya J. (2021). Sulfonamide Drugs: Structure, Antibacterial Property, 576 Toxicity, and Biophysical Interactions, *Biophysical Reviews*. 13, no. 2, 259–577 72. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>.
- Penezić, A., Gašparović, B., Stipanicev, D. & Nelson, A. (2014). In-situ electrochemical method for detecting freely dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environ. Chem.* 11, 173–180. [CrossRef]
- Peng, K., Wang, Q., Chen, W.; Xia, D., Zhou, Z., Wang, Y., Jiang, Z. & Wu, F. (2016). Phosphatidic acid-functionalized monolithic stationary phase for reversed-phase/cation-exchange mixed mode chromatography. *RSC Adv.* 6, 100891–100898. [CrossRef]
- Perez-Moral, N., Plankeele, J.-M., Domoney, C. & Warren, F.J. (2018). 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.* 196, 422–426. [CrossRef] [PubMed]
- Pittler, E., Grawatsch, N., Paul, D.; Gübitz, G. & Schmid, M.G. (2009). Enantioseparation of amino acids, α -hydroxy acids, and dipeptides by ligand-exchange CEC using silicabased chiral stationary phases. *Electrophoresis*, 30, 2897–2904. [CrossRef]
- Radai, Z., Kiss, N. Z. & Keglevich, G. (2018). An overview of the applications of ionic liquids as catalysts and additives in organic chemical reactions. *Curr. Org. Chem.* 22, 533–556.
- Reimer, G.J. & Suarez, A. (1991) *J. Chromatogr.* 555 315.
- Ren, X. J., Zhang, K. L., Gao, D., Fu, Q. F., Zeng, J., Zhou, D., Wang, L. J. & Xia, Z. N. (2018). Mixed-mode liquid chromatography with a stationary phase

- cofunctionalized with ionic liquid embedded C18 and an aryl sulfonate group. *J. Chromatogr.* 1564, 137–144.
- Riguero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C.; Wang, S.-C. & O'Connor, E. (2020). Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *J. Chromatogr.* 1629, 461505. [CrossRef]
- Rusli, H., Putri, R.M. & Alni (2022). Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. *Molecules*, 27, 907. <https://doi.org/10.3390/molecules27030907>.
- Sanagi, M.M. & See, H.H. (2005). High Temperature Liquid Chromatography on a Poly(Styrene-Divinylbenzene) Stationary Phase. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28, 3065–3076. [CrossRef]
- Sathitnaitham, S., Suttangkakul, A., Wonnapijit, P., McQueen-Mason, S.J. & Vuttipongchaikij, S. (2021). Gel-permeation chromatography–enzyme-linked immunosorbent assay method for systematic mass distribution profiling of plant cell wall matrix polysaccharides. *Plant J.* 106, 1776–1790. [CrossRef] [PubMed]
- Scozzafava, A., Owa, T., Mastrolorenzo, A. & Supuran, C.T. (2003). Anticancer and antiviral sulfonamides. *Curr. Med. Chem.* 10, 925–953. [CrossRef] [PubMed]
- Scozzafava, A., Carta, F. & Supuran, C.T. (2013). Secondary and tertiary sulfonamides: review *Ther. Pat.* 23, 203–213. [CrossRef] [PubMed]
- Scozzafava, A., Supuran, C.T. & Carta, F. (2013). Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: A literature and patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, 725–735. [CrossRef] [PubMed]
- Shamshir A., Dinh N. P., Jonsson T., Sparrman T. & Irgum K. (2020). Probing the Retention Mechanism of Small Hydrophilic Molecules in Hydrophilic Interaction Chromatography Using Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of Chromatography A.* 1623, 461130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461130>.
- Shen, A., Li, X.; Dong, X., Wei, J., Guo, Z. & Liang, X. (2013). Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography. *J. Chromatogr.* 1314, 63–69. [CrossRef]
- Singh, R., Yadav, A., Chopra, A., Christopher, J. & Kapur, G.S. (2019). Comparison of five different HPLC columns with different particle sizes, lengths and make for the optimization of seven polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) analysis. *SN Appl. Sci.* 1, 313. [CrossRef]
- Sliwka-Kaszynska, M. (2007). Calixarenes as stationary phases in high performance liquid chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 37, 211–224.

- Soukupová, K., Krafková, E., Suchánková, J. & Tesařová, E. (2005). Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins. *J. Chromatogr.* 1087, 104–111. [CrossRef] [PubMed]
- Stevenson, P.G., Soliven, A., Dennis, G.R.; Gritti, F., Guiochon, G. & Shalliker, R.A. (2010). π -Selective stationary phases: (III) Influence of the propyl phenyl ligand density on the aromatic and methylene selectivity of aromatic compounds in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1217, 5377–5383. [CrossRef]
- Sun, X., Li, J. & Xu, L. (2018). Synthesis of penetrable poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) microsphere and its HPLC application in protein separation. *Talanta* 185, 182–190. [CrossRef] [PubMed]
- Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 168–181. [CrossRef] [PubMed]
- Supuran, C.T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 27, 759–772. [CrossRef] [PubMed]
- Supuran, C.T. (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 31, 345–360. [CrossRef] [PubMed]
- Supuran, C.T. (2017). Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 61–88. [CrossRef] [PubMed]
- Supuran, C.T. (2017). Special Issue: Sulfonamides: *Molecules*, 1642/22(1) <https://doi.org/10.3390/molecules22101642>.
- Sykora, D., Vozka, J. & Tesařová, E. (2016). Chromatographic methods enabling the characterization of stationary phases and retention prediction in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J. Sep. Sci.* 39, 115–131.
- Sýkora, D., Řezanka, P., Záruba, K. & Král, V. (2018). Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases: *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE* 19/1, 90-98 <https://doi.org/10.1002/jssc.20180104881>.
- Taskin, O.S., Aksu, A., Cetintasoglu, M.E., Korkmaz, N.E., Torlak, C. & Caglar, N.B. (2018). Preparation of analytical columns and HPLC silica-based C18 packing material synthesis from non-toxic silica source. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 41, 583–587. [CrossRef]
- Titus A.M.M. & Mathew M.N. (2004). Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta* 64 (2004) 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.038>.

- Wang, Q., Ye, M., Xu, L. & Shi, Z.-G. A (2015). Reversed-phase/hydrophilic interaction mixedmode C18-Diol stationary phase for multiple applications. *Anal. Chim. Acta*, 888, 182–190. [CrossRef]
- Wang, T., Yang, H., Qiu, R. & Huang, S. (2016). Synthesis of novel chiral imidazolium stationary phases and their enantioseparation evaluation by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 944, 70–77. [CrossRef]
- Wang, S.-W., Hsu, K.-H., Huang, S.-C.; Tseng, S.-H., Wang, D.-Y. & Cheng, H.-F. (2019). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cosmetic products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Drug Anal.* 27, 815–824. [CrossRef]
- Wang, Z., Lei, F.-H., Li, W., Li, P.-F., Wang, T., Qin, L.-T., Cheng, G.-G., Sun, Y., E, Y.-Y. & Xie, W.-B. (2019). Preparation of rosin-based polymer microspheres as a stationary phase in high-performance liquid chromatography to separate polycyclic aromatic hydrocarbons and alkaloids. *e-Polymers*, 19, 290–296. [CrossRef]
- Wanga, C., Zhanga, L., Lia, X., Yua, A. & Zhangb, S. (2020). Controlled fabrication of coreshell silica@chiral metal-organic framework for significant improvement chromatographic separation of enantiomers. *Talanta*, 218, 121155. [CrossRef] [PubMed]
- Wilkes, J. S. & Zaworotko, M. J., (1992). Air and water stable 1-ethyl- 3-methylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* 965–967.
- Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L. & Supuran, C.T. (2006). The sulfamide motif in the design of enzyme inhibitors. *Expert Opin. Ther. Pat.* 16, 27–47. [CrossRef] [PubMed]
- Won S. Y., Lee C. H., Chang H. S., Kim S. O., Lee S. H. & Kim D. S. (2011). Monitoring of 600 14 Sulfonamide Antibiotic Residues in Marine Products Using HPLC-PDA and LC-601 MS/MS, *Food Control.* 22, no. 7, 1101–07. 602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.005>.
- Wu, Q., Hou, X., Lv, H., Li, H., Zhao, L.; & Qiu, H. (2021). Synthesis of octadecylaminederived carbon dots and application in reversed phase/hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1656, 462548. [CrossRef] [PubMed]
- V.B. Reeves, (2017). *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 127. (Claudiu T. Supuran Dipartimento Neurofarba, Sezione di Scienze Farmaceutiche e Nutraceutiche, Università degli Studi di Firenze, Via Ugo Schiff 6, I-50019.
- Vitha, M. & Carr, P. W., (2006). The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *J. Chromatogr.* 1126, 143–194.
- Yan, Z., Zheng, J., Chen, J., Tong, P., Lu, M., Lin, Z. & Zhang, L. (2014). Preparation and evaluation of silica-UIO-66 composite as liquid chromatographic stationary

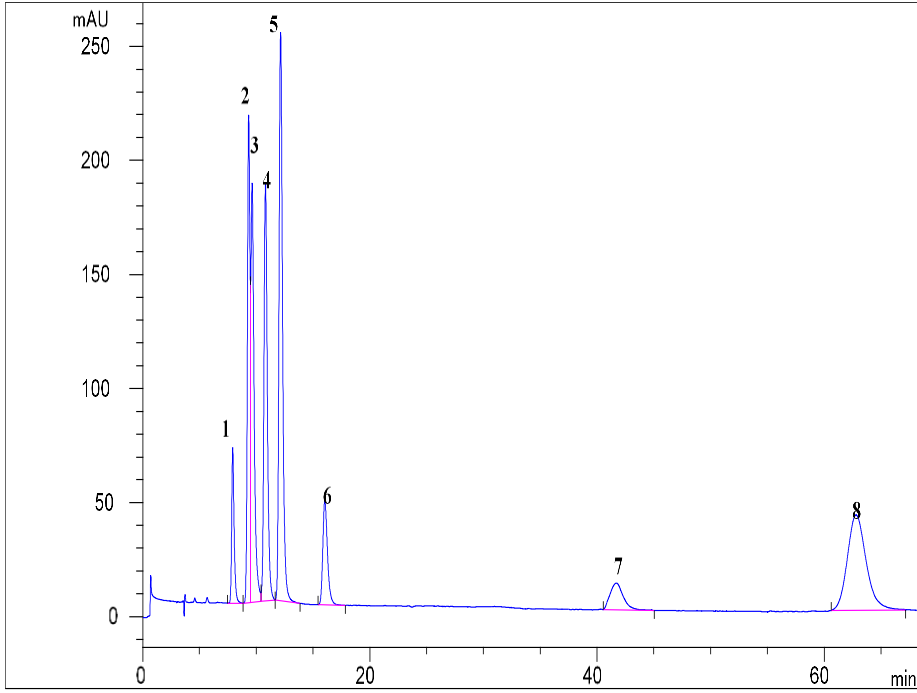
- phase for fast and efficient separation. *J. Chromatogr.* 1366, 45–53. [CrossRef] [PubMed]
- Yang, B. B., Liu, H. M., Chen, J., Guan, M. & Qiu, H. D. (2016). Preparation and evaluation of 2-methylimidazolium-functionalized silica as a mixed-mode stationary phase for hydrophilic interaction and anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 1468, 79–85.
- Yaşar Mumim M., Aral H., Sunkur M. & Aral T. (2022). A New Mixed-Mode Stationary Phase Derived from [2-(3,4-Epoxy cyclohexyl)Ethyl]Trimethoxysilane as a Coupling Reagent and Its RPLC/HILIC/IEC Applications, *ChemistrySelect*, 7, no. 44. 544. <https://doi.org/10.1002/slct.202204069>.
- Yu, R., Hu, W., Lin, G., Xiao, Q., Zheng, J. & Lin, Z. (2015). One-pot synthesis of polymer monolithic column by combination of free radical polymerization and azide–alkyne cycloaddition “click” reaction and its application in capillary liquid chromatography. 5, 9828–9836. [CrossRef]
- Yu, J., Armstrong, D.W. & Ryoo, J.J. (2018). Synthesis of new C3 symmetric amino acid- and aminoalcohol-containing chiral stationary phases and application to HPLC enantioseparations. *Chirality*, 30, 74–84. [CrossRef]
- Zeng, R., Jin, B.-K., Yang, Z.-H., Guan, R. & Quan, C. (2019). Preparation of a modified crosslinked chitosan/polyvinyl alcohol blended affinity membrane for purification of His-tagged protein. *J. Appl. Polym. Sci.* 136, 47347. [CrossRef]
- Zhang, R., Li, Q., Gao, Y., Li, J., Huang, Y., Song, C., Zhou, W., Ma, G. & Su, Z. (2014). Hydrophilic modification of superporous resins with poly(ethylenimine) for high-throughput proteins ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 1343, 109–118. [CrossRef][PubMed]
- Zhang, M. L., Liang, X. J., Jiang, S. X. & Qiu, H. D. (2014). Preparation and applications of surface-confined ionic-liquid stationary phases for liquid chromatography. *TracTrends Anal. Chem.* 53, 60–72.
- Zhang, F., Sun, Y., Tian, D. M., Shin, W. S., Kim, J. S. & Li, H. B. (2016). Selective molecular recognition on calixarene-functionalized 3D surfaces. *Chem. Commun.* 52, 12685–12693.
- Zhang, L., Dai, Q., Qiao, X. Q., Yu, C. Y., Qin, X. Y. & Yan, H. Y. (2016). Mixed-mode chromatographic stationary phases: recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *TracTrends Anal. Chem.* 82, 143–163.
- Zhao, W., Zhang, C., Yan, Z., Zhou, Y., Li, J., Xie, Y., Bai, L., Jiang, L. & Li, F. Preparation (2017). 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*, 12, e0178513. [CrossRef]
- Zhao, P., Zhao, J., Lei, S., Guo, X. & Zhao, L. (2018). Simultaneous enantiomeric analysis of eight pesticides in soils and river sediments by chiral liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 204, 210–219. [CrossRef]
- Zhao, Y., Zeng, J., You, J., Duan, Y., Li, Y., Liu, C., Liu, Z., Yang, L., Shen, Q. & Li, Z. A (2020). Sol–gel Method for Preparing Poly (NIsopropyl Acrylamide) Hybrid Column and Its Application in Small Molecular Analysis Using Capillary Liquid Chromatography. *Chromatographia* 2020, 83, 985–992. [CrossRef]
- Zheng, Q., He, Y., Ma, W., Wu, Y., Chen, Z., Wang, R., Tong, W. & Lin, Z. (2021). Facile synthesis of spherical covalent organic frameworks as stationary phases for shortcolumn liquid chromatography. *Chem. Commun.* 57, 7501–7504. [CrossRef]
- Zong, R., Wang, X., Yin, H., Li, Z., Huang, C., Xiang, Y. & Ye, N. (2021). Capillary coated with three-dimensional covalent organic frameworks for separation of fluoroquinolones by open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr.* 1656, 462549. [CrossRef]
- Xiong, C., Yuan, J., Wang, Z., Wang, S., Yuan, C. & Wang, L. (2018). Preparation and evaluation of a hydrophilic interaction and cationexchange chromatography stationary phase modified with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *J. Chromatogr.* 1546, 56–65. [CrossRef] [PubMed]
- Xu Y., Ding J., Chen H., Zhao Q., Hou J., Yan J., Wang H., Ding L. & Ren N. (2013). Fast 485 Determination of Sulfonamides from Egg Samples Using Magnetic Multiwalled 486 Carbon Nanotubes as Adsorbents Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass 487 Spectrometry, *Food Chemistry*. 140, no. 1–2, 83–90. 488 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.078>. 48919
- Qiao, L., Wang, S., Li, H.; Shan, Y., Dou, A., Shi, X. & Xu, G. A (2014). novel surfaceconfined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography. *J. Chromatogr.* 1360, 240–247. [CrossRef][PubMed]
- Qiao, L. Z., Lv, W. J., Chang, M. M., Shi, X. Z. & Xu, G. W., (2018). Surface-bonded amidefunctionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatogra- phy. *J. Chromatogr.* 1559, 141–148.
- Qiu, X., Liu, Y., Zhao, T., Zuo, L., Ma, X. & Shan, G. (2022). 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.* 208,114458. [CrossRef]

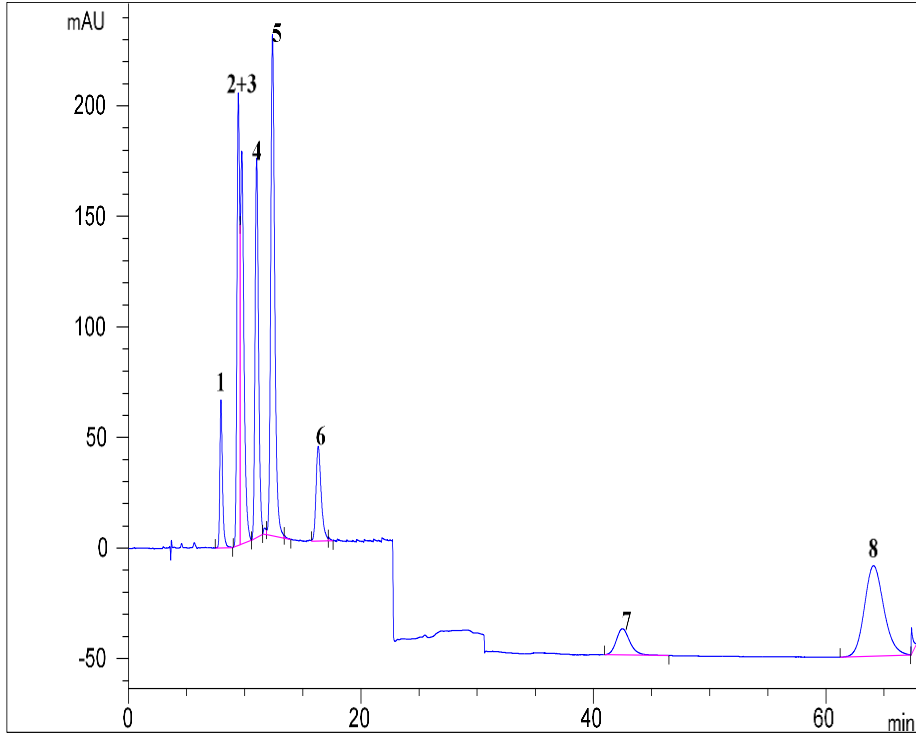
EKLER

1. pH Optimizasyonu

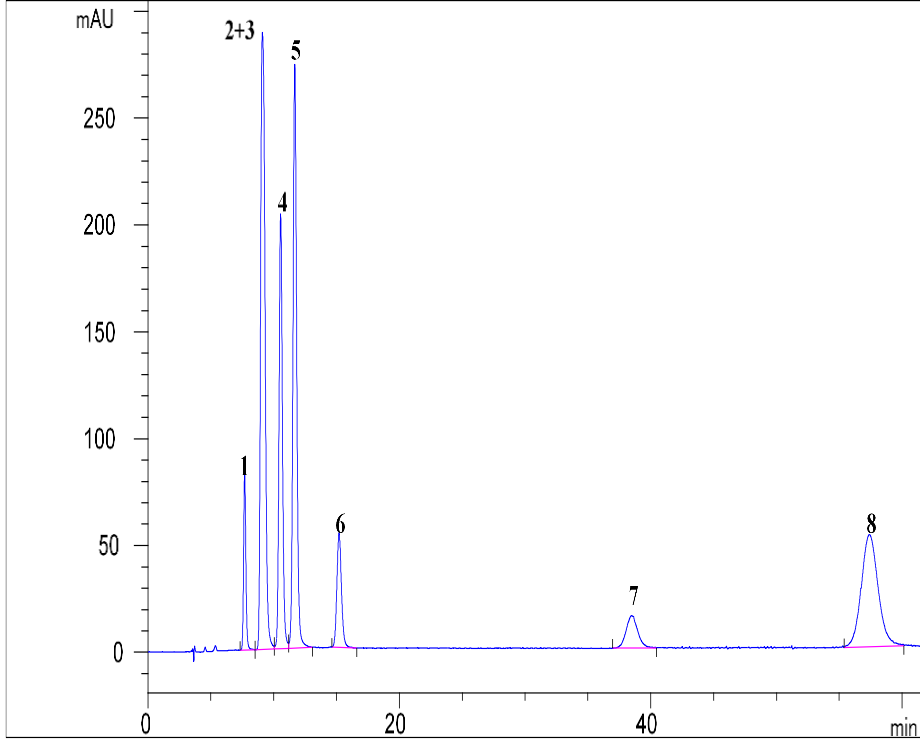
EK-1 İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON(pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 10 /90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C ,Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: Sulfadiazine(SDZ), 2: Sulfamethoxazole(SMX), 3: Sulfamerazine(SMR), 4: Sulfathiazole(STZ), 5: Sulfamethazine(SMZ), 6: Sulfamethoxypyridazine(SMOP), 7: Sulfadimethoxine(SDM), 8: Sulfaquinoxaline(SQX).



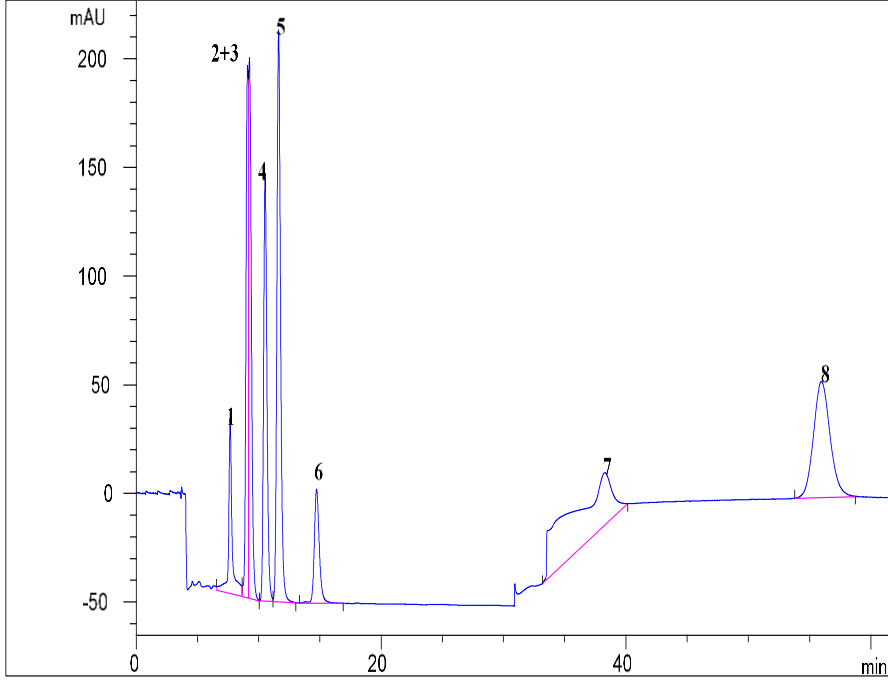
EK-2 İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3.5, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: Sulfadiazine(SDZ), 2: Sulfamethoxazole(SMX), 3: Sulfamerazine(SMR), 4: Sulfathiazole(STZ), 5: Sulfamethazine(SMZ), 6: Sulfamethoxypyridazine(SMOP),7:Sulfadimethoxine(SDM),8: Sulfaquinoxaline(SQX).



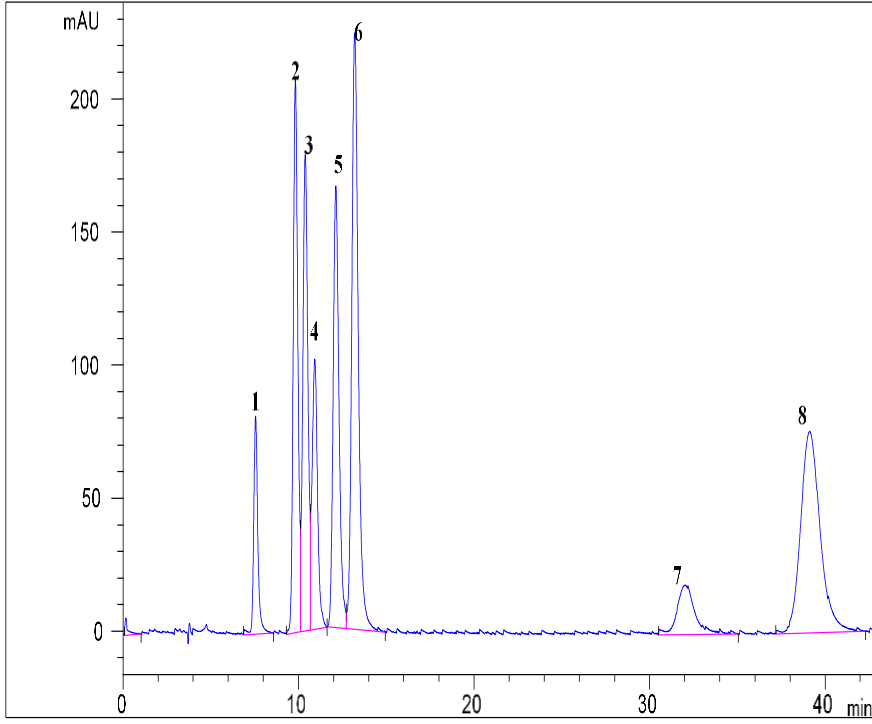
EK3. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 4, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



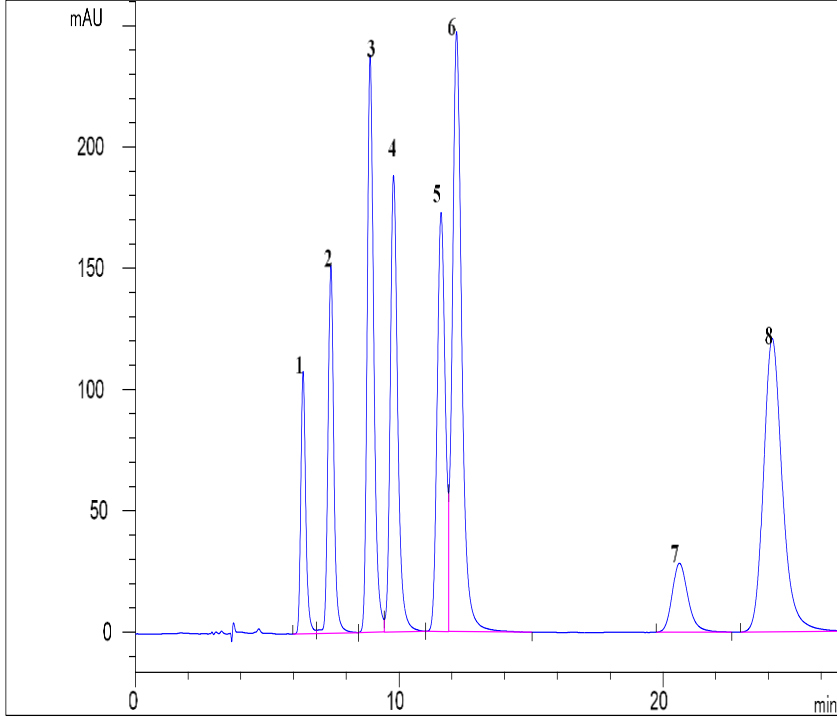
EK4. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 4.5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



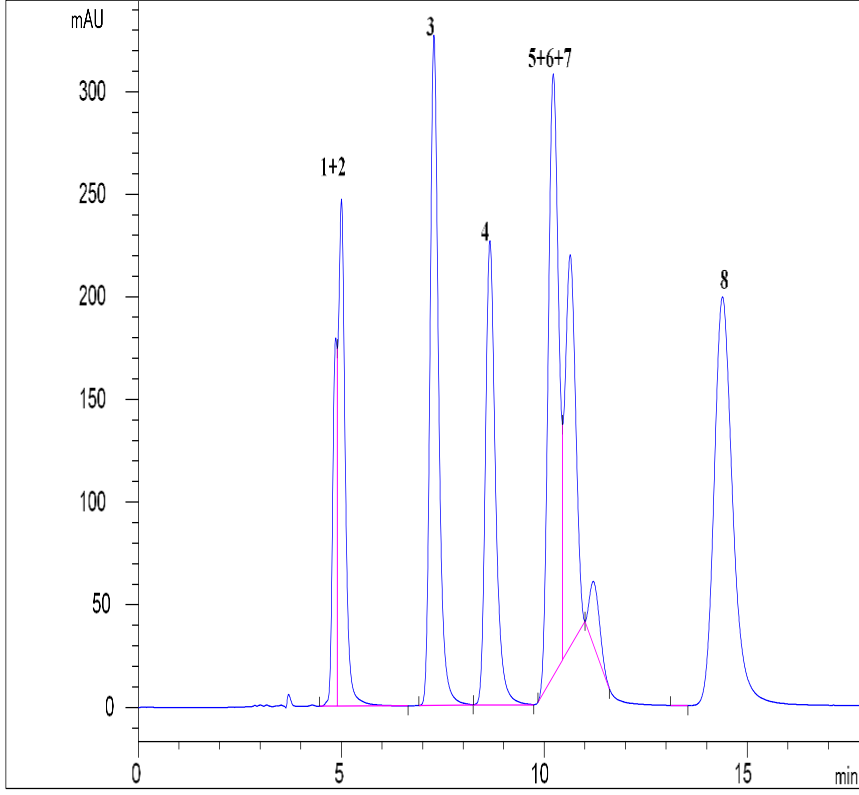
EK5. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



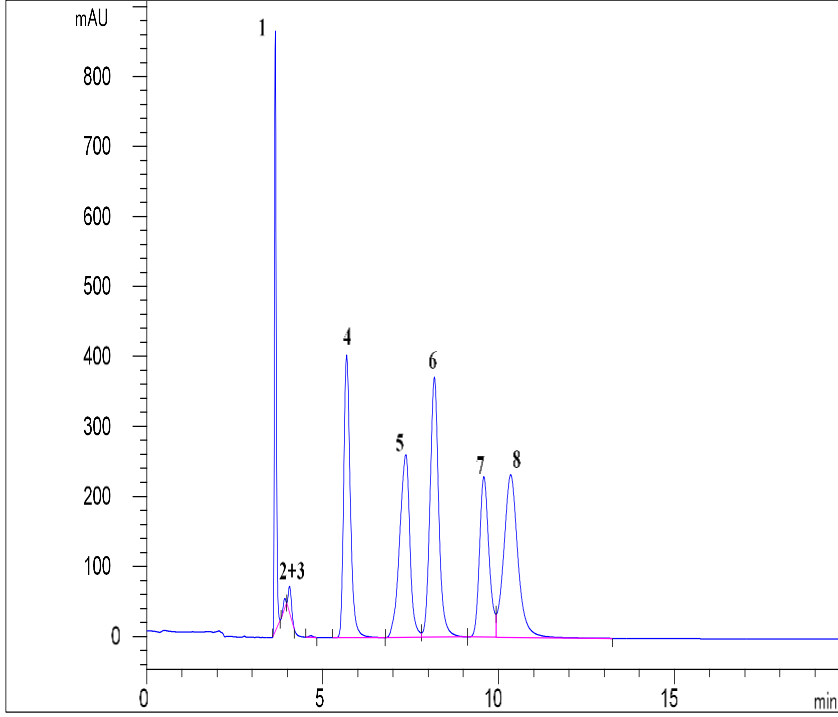
EK6. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK7. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 7, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

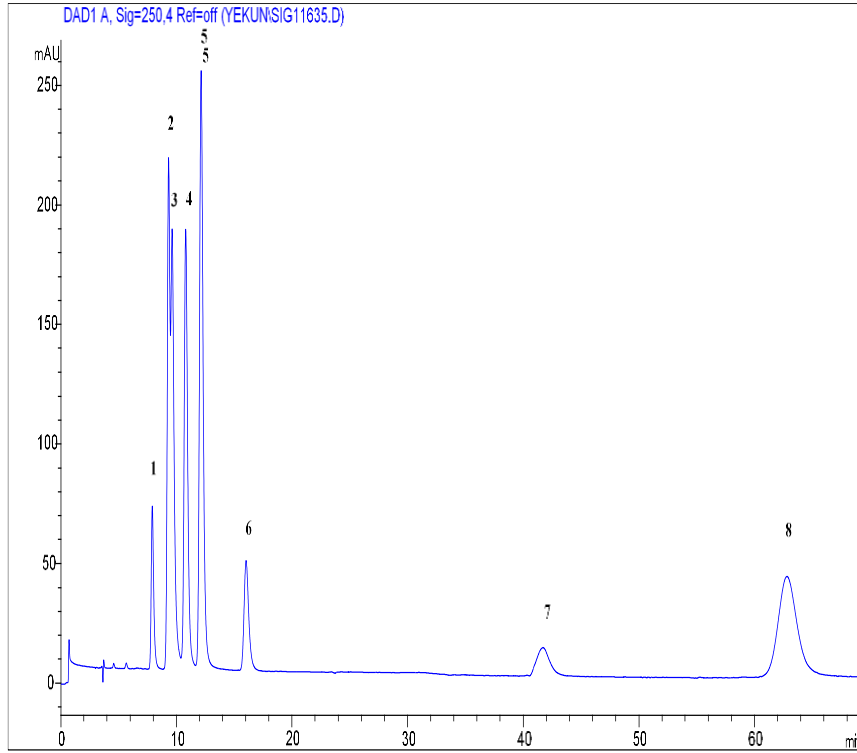


EK8. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 7.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



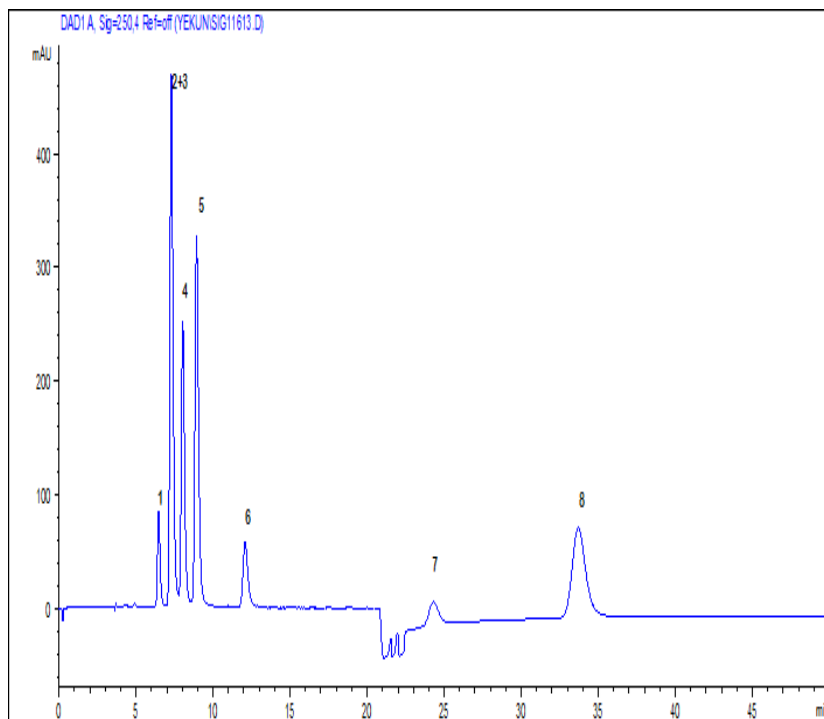
2. pH 3.0'TE HAREKETLİ FAZ BİLEŞİMİN OPTİMİZASYONU

EK9. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

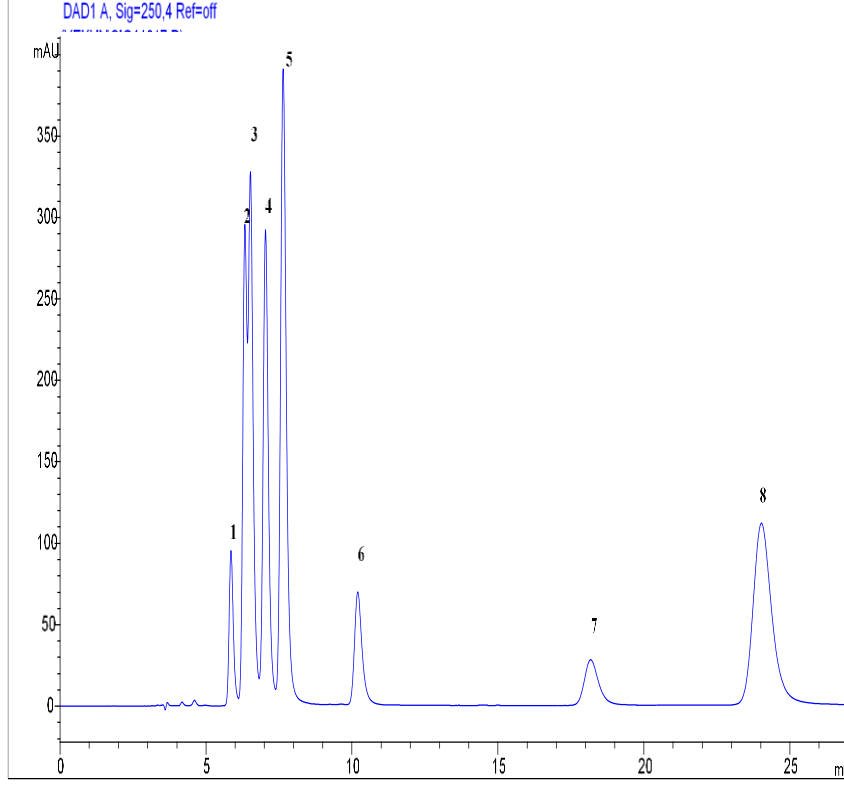


Ek10. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 15/85, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm.

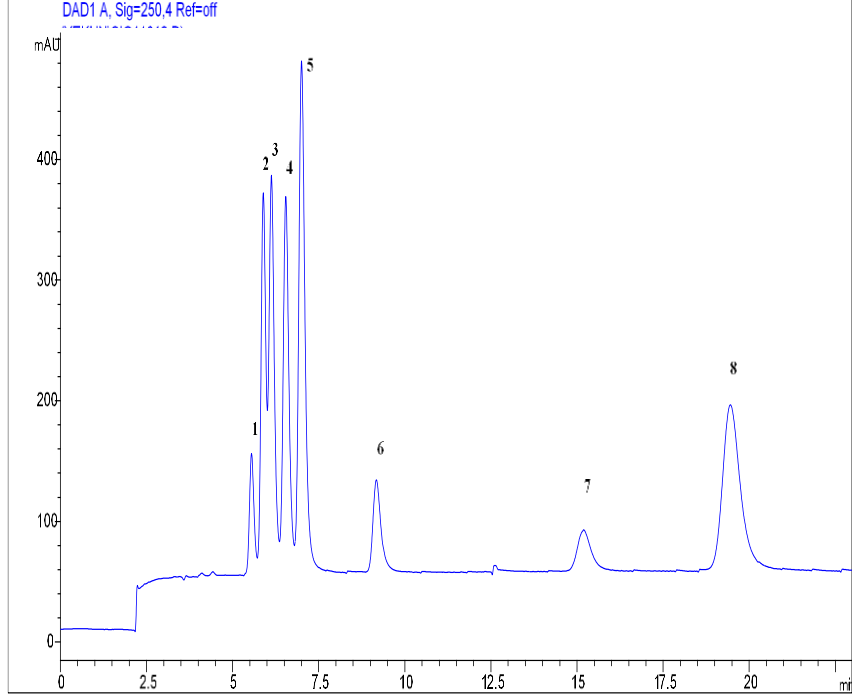
Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



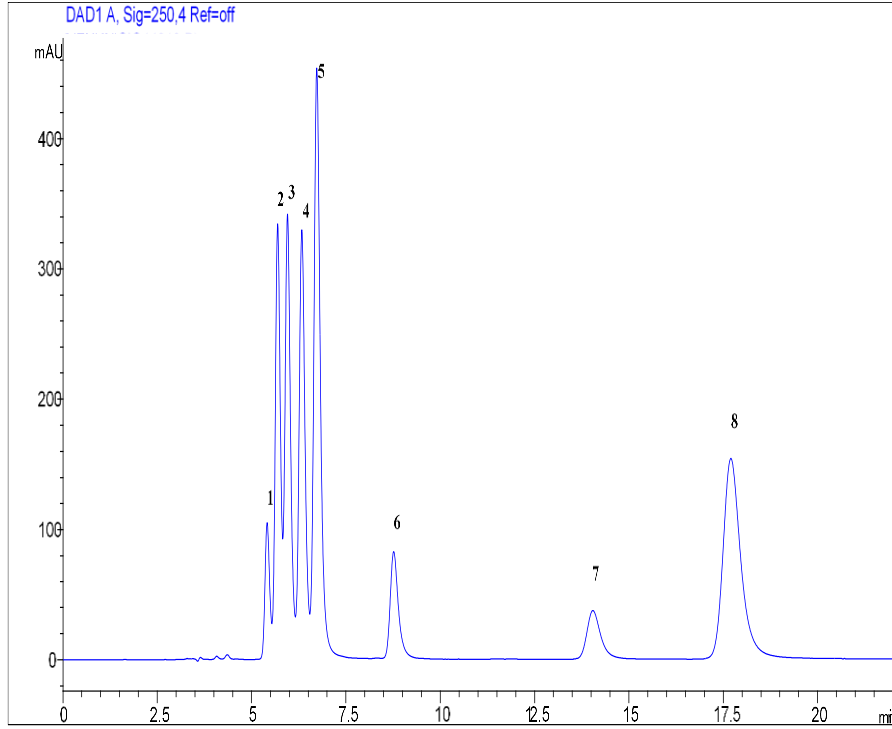
EK11. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON(pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 18/82, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX)



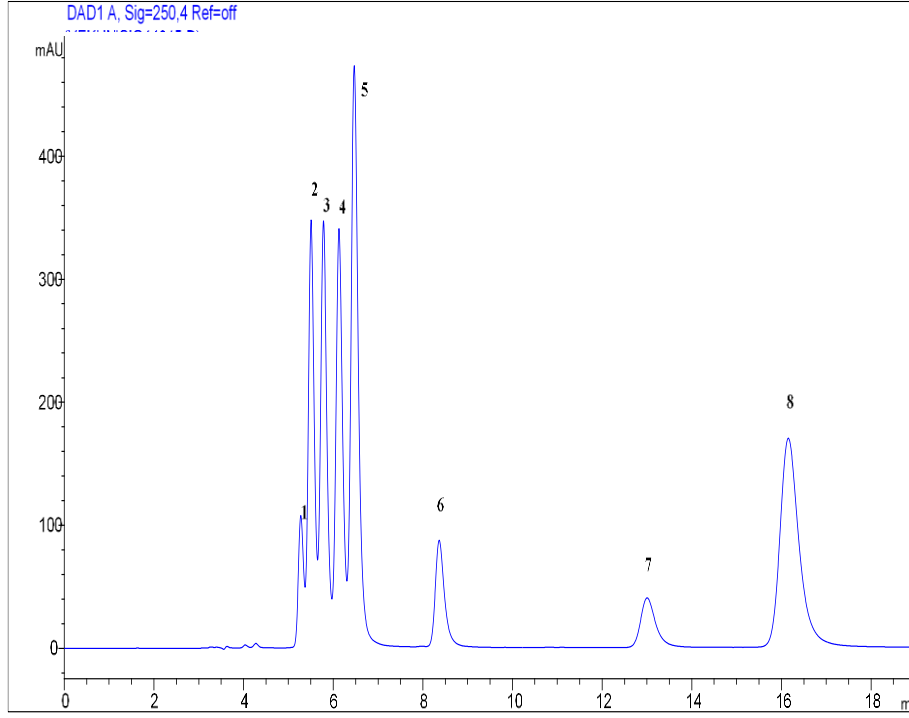
EK12. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 20/80, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



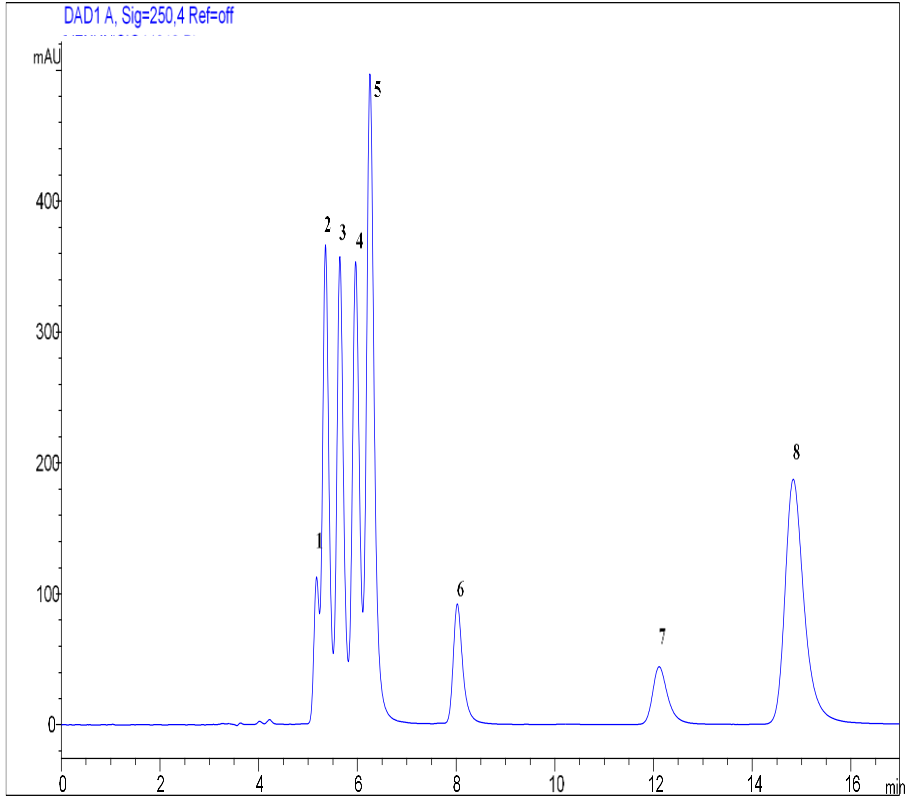
EK13. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 21/79, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



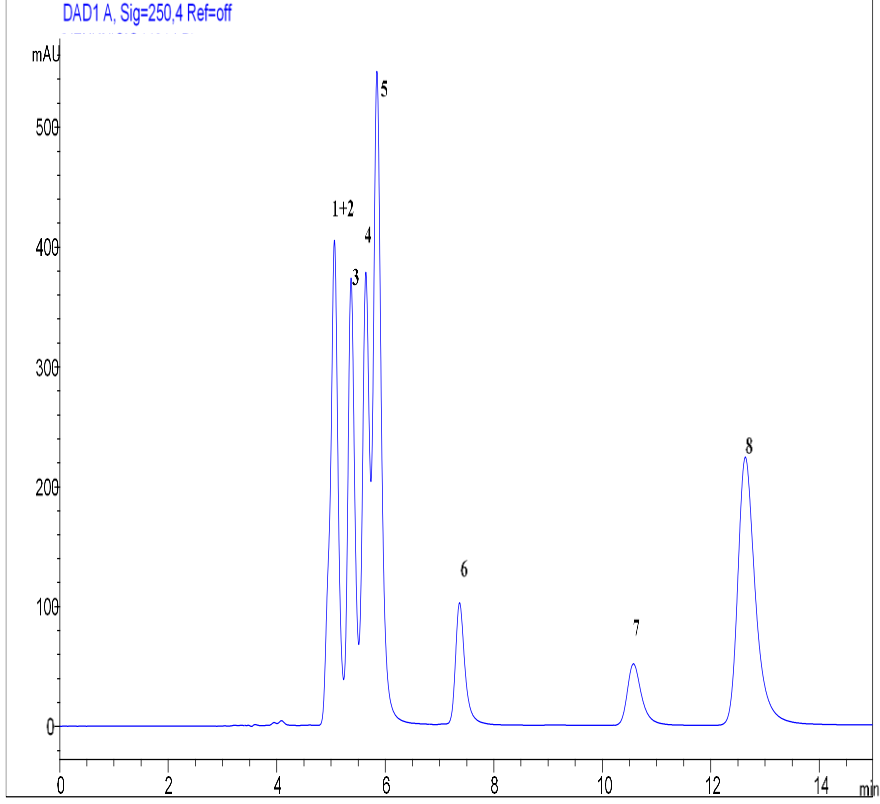
EK14. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 22/78, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK15. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 23/77, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

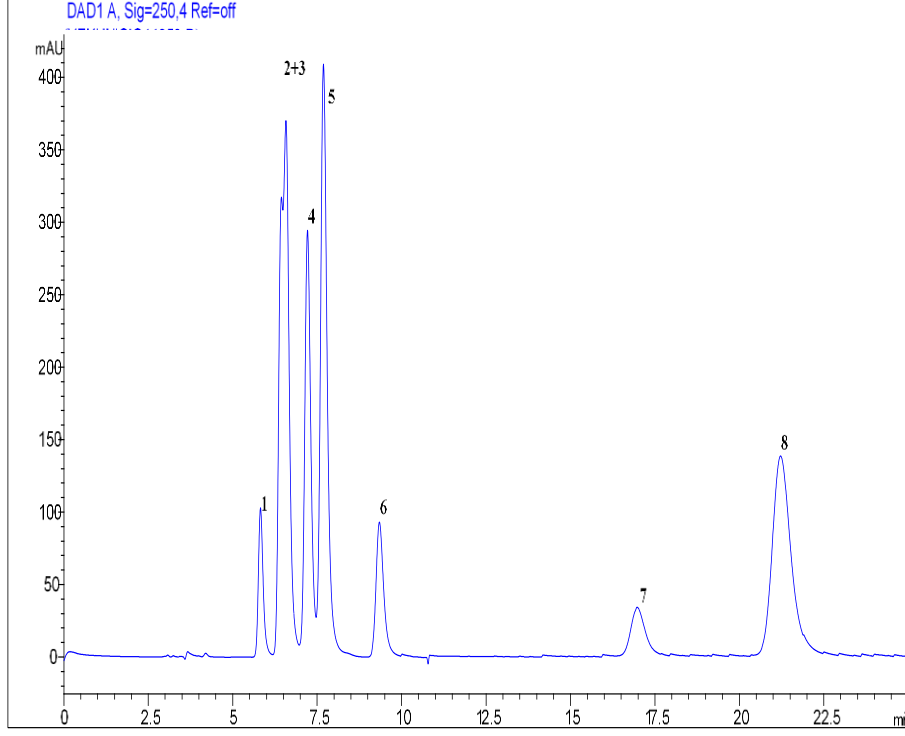


EK16. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 3, 20 mM H₃PO₄/KH₂PO₄): 25/75, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

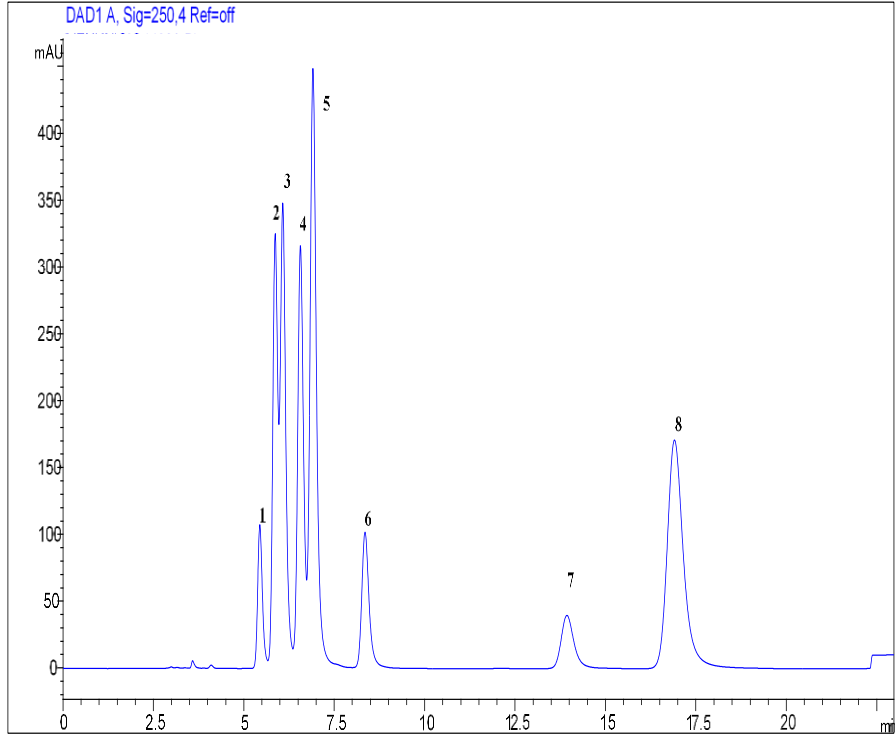


3. pH 5.0'TE HAREKETLİ FAZ BİLEŞİMİN OPTİMİZASYONU

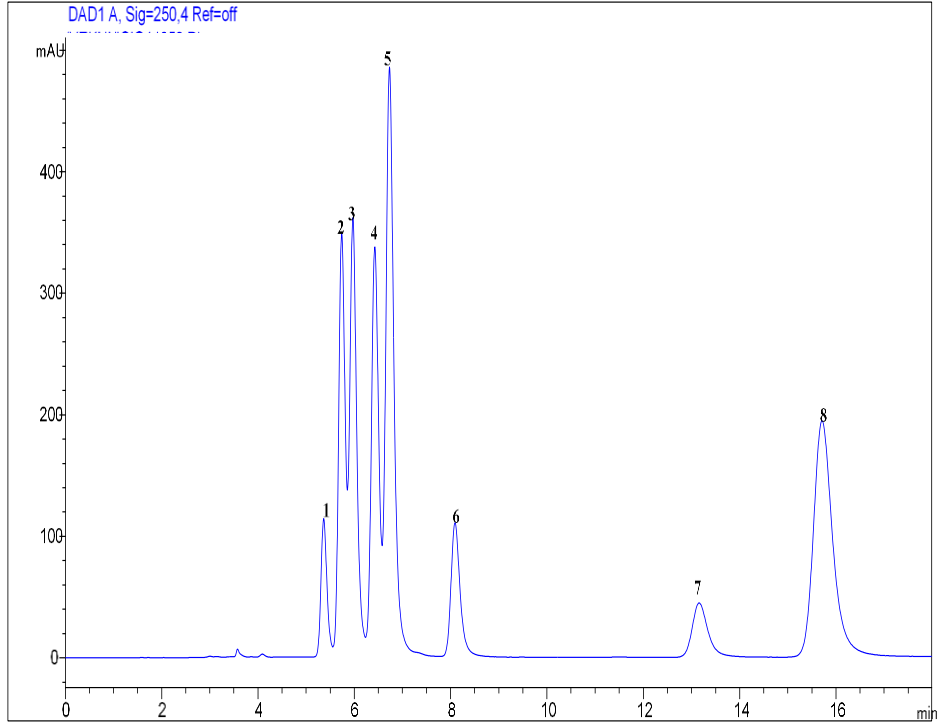
EK17. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH:5, 20mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 18/82, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



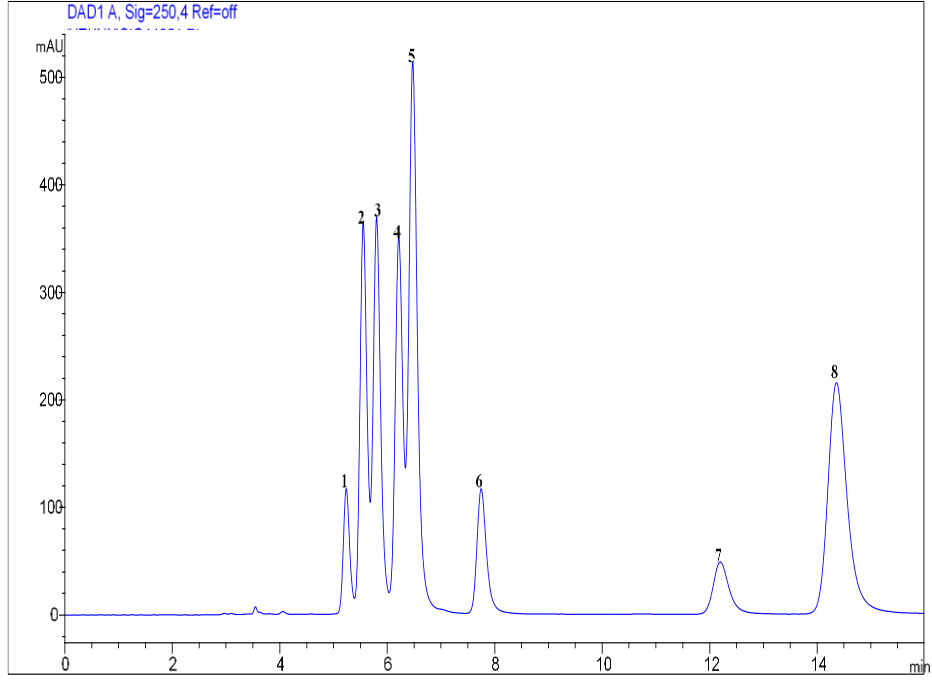
EK18. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 20/80, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



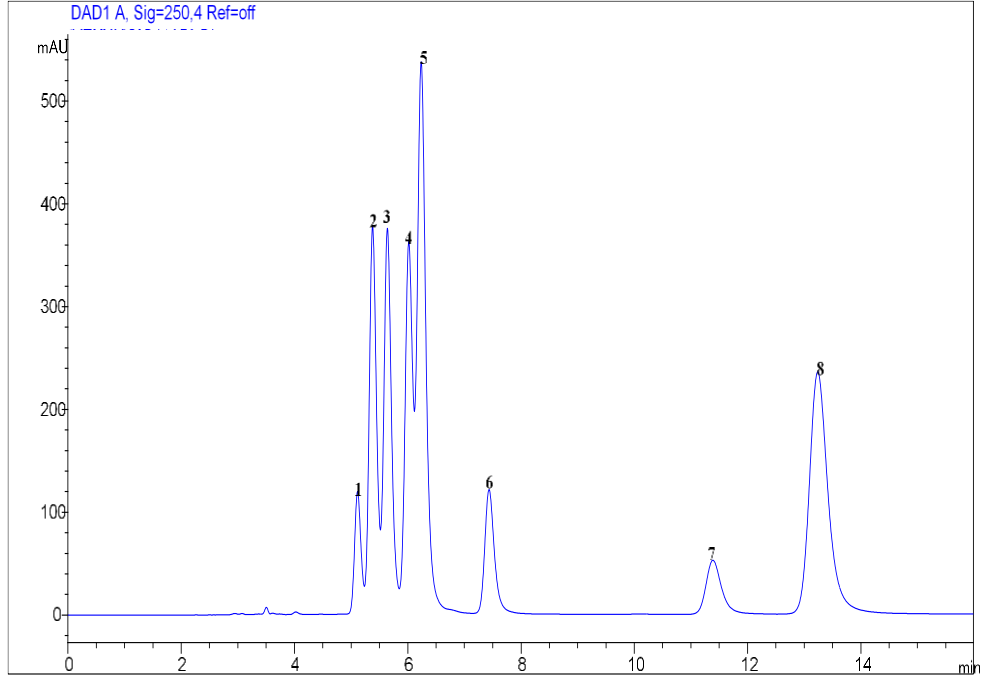
EK19. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 21/79, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



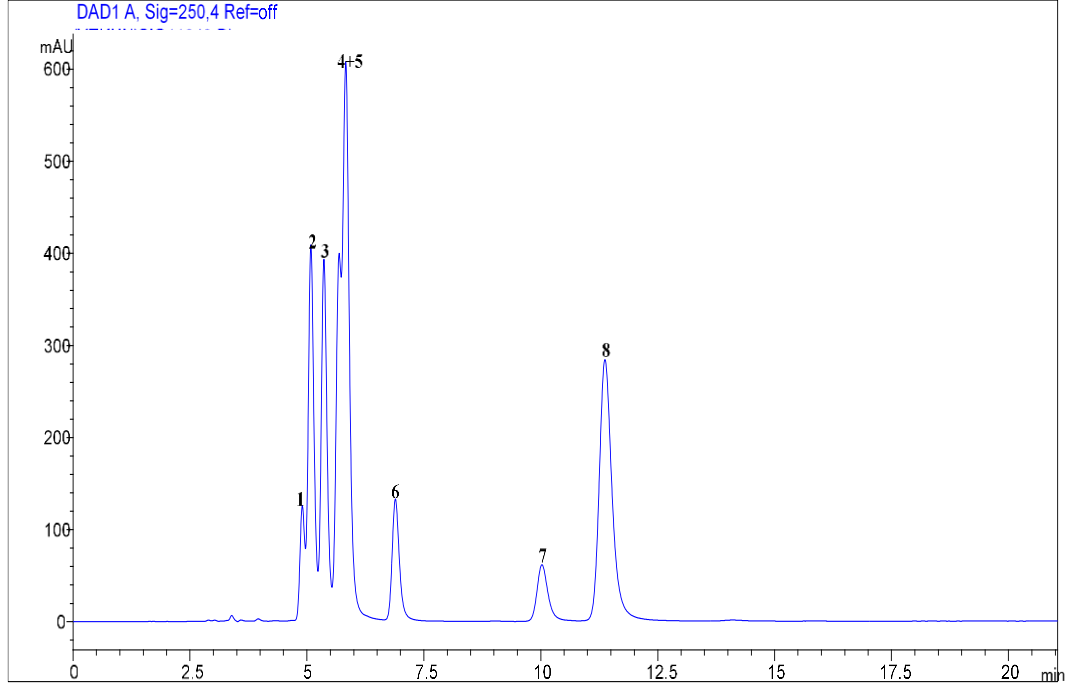
EK20. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 22/78, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK21. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 23/77, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

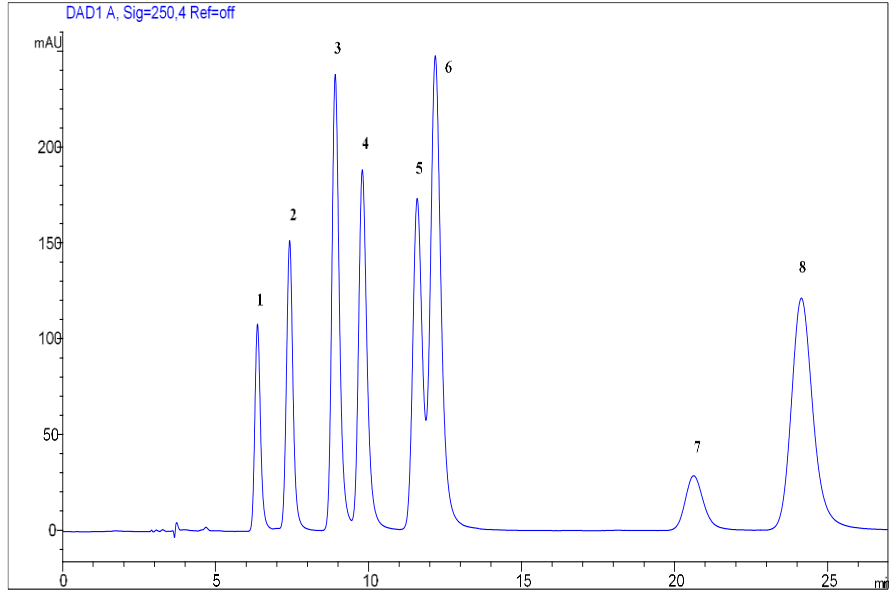


EK22. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 5, 20 mM CH₃COOH/CH₃COONH₄): 25/75, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

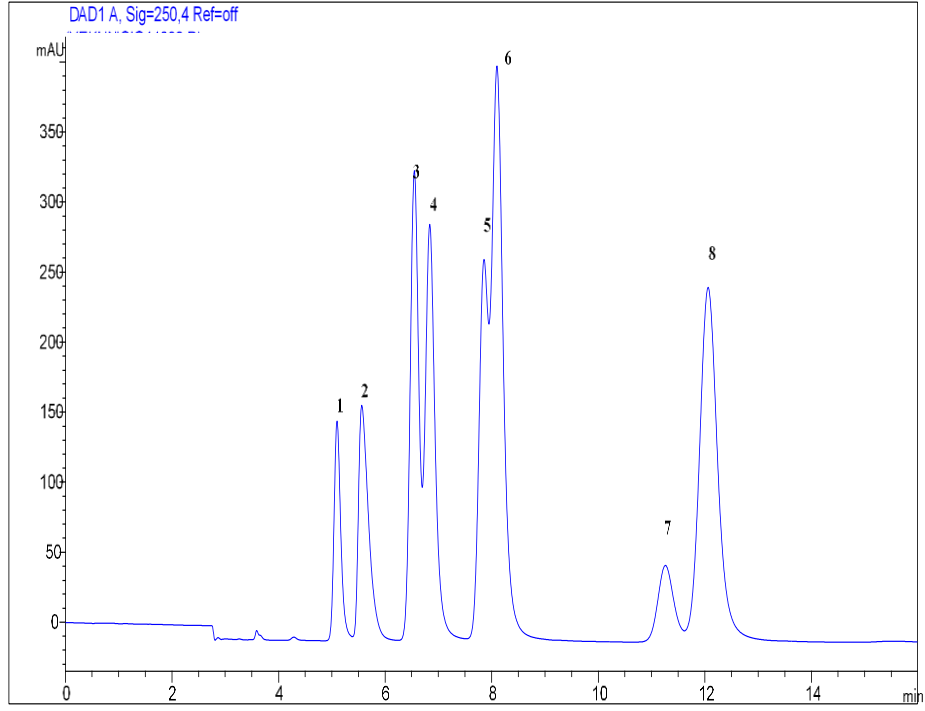


4. pH 6.5'te Hareketli Faz Bileşiminin Optimizasyonu

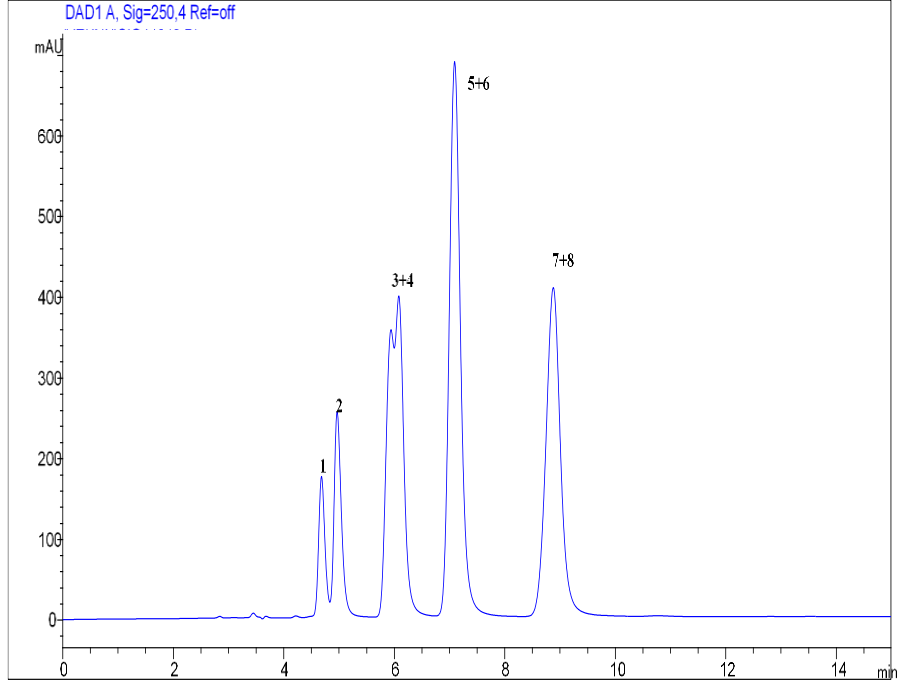
EK23. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON(pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



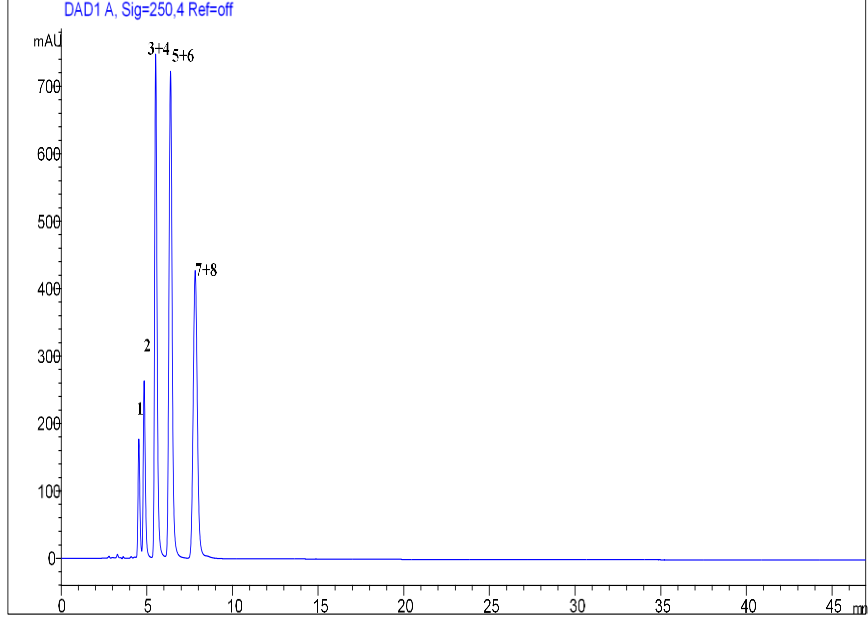
EK24. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 15/85, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



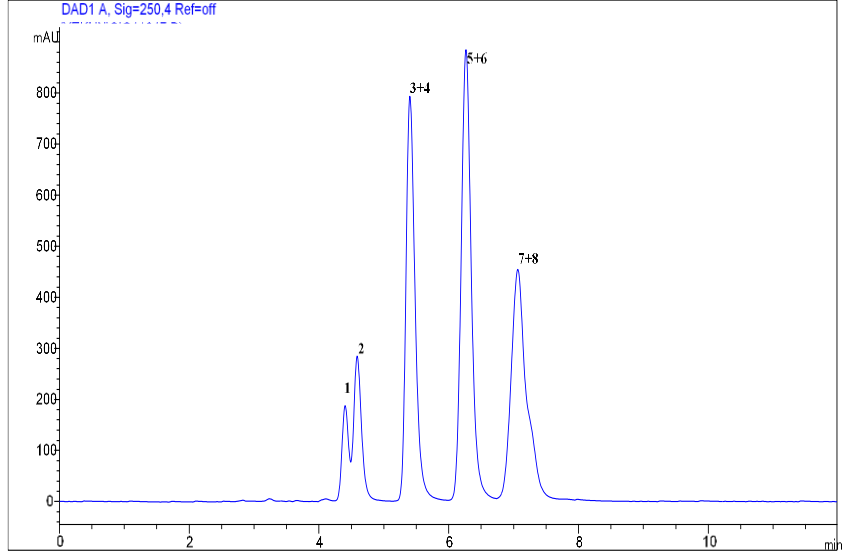
EK25. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 18/82, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



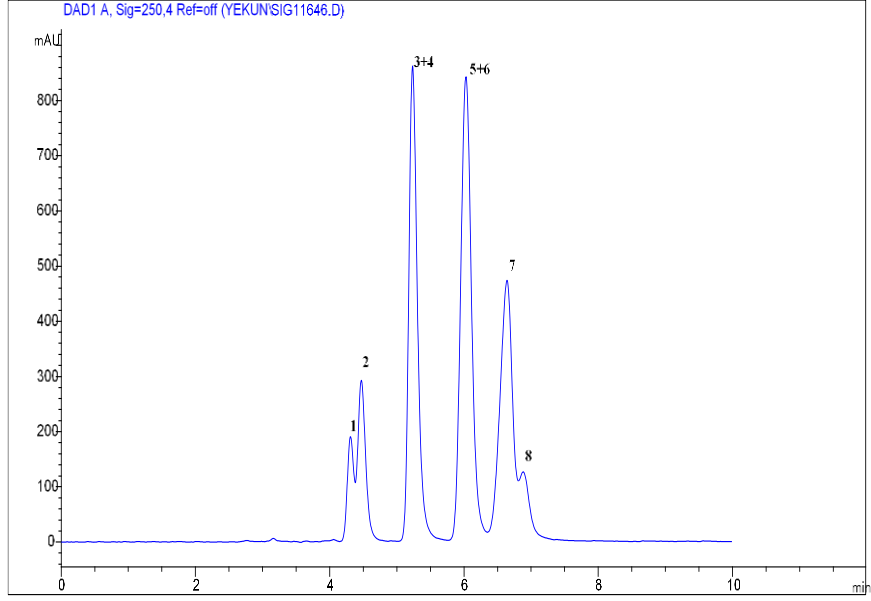
EK26. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 20/80, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



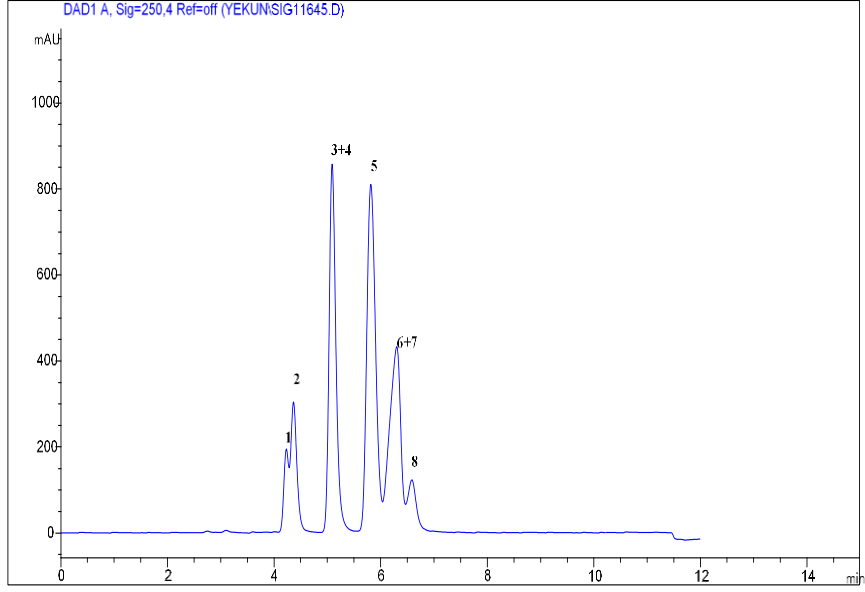
EK27. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 21/79, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



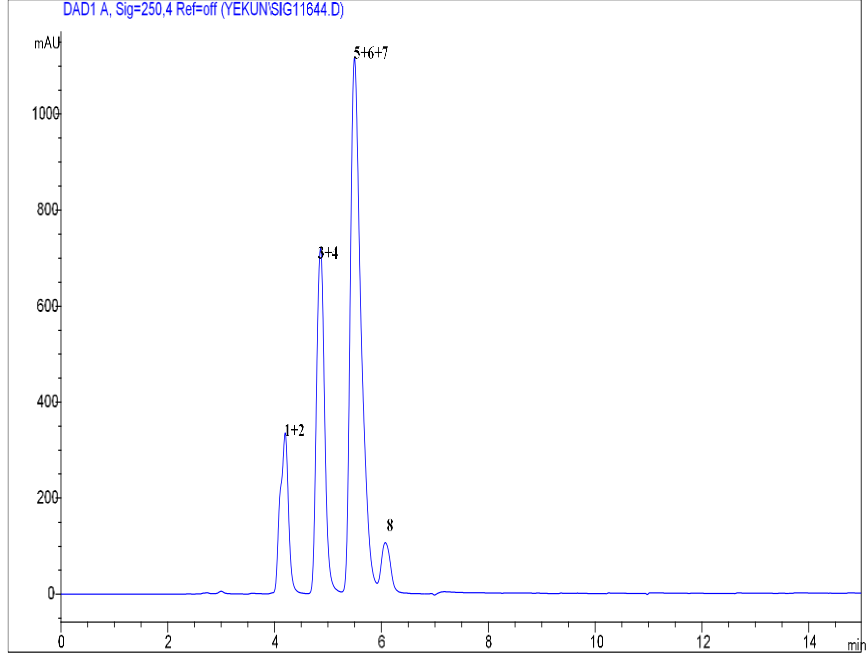
EK28. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 22/78, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK29. İzokratik elüsyon: ACN / TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 23/77, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

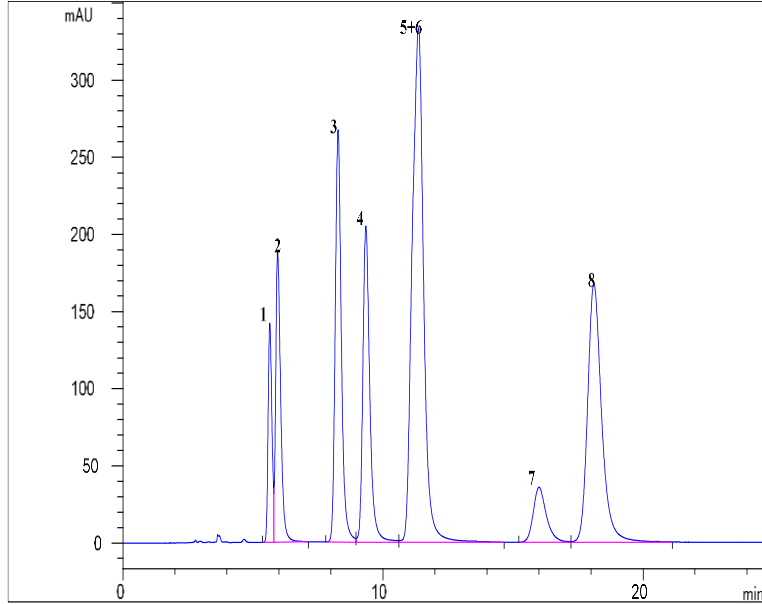


EK30. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 25/75, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

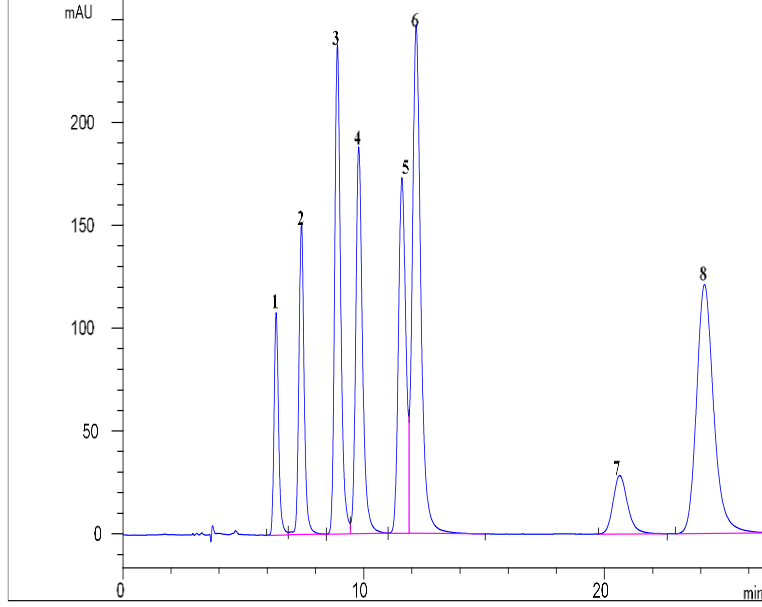


5. Tampon konsantrasyonu Optimizasyonu

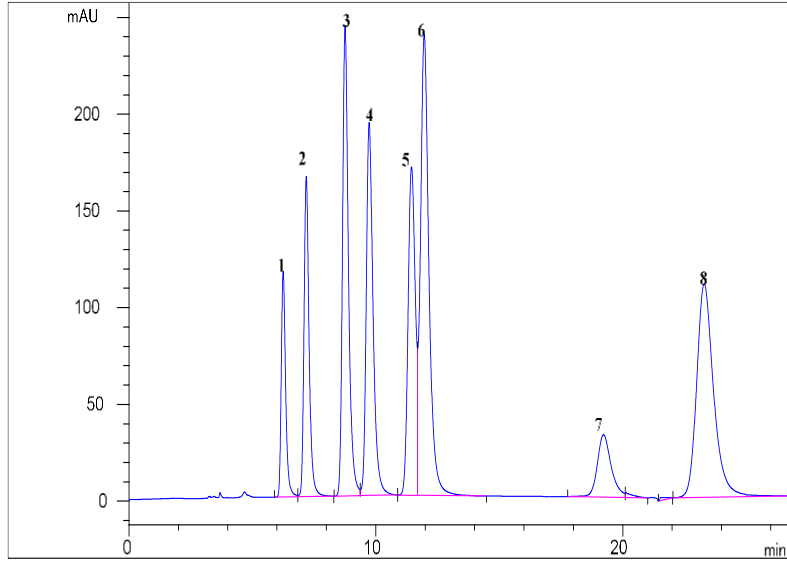
EK31. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



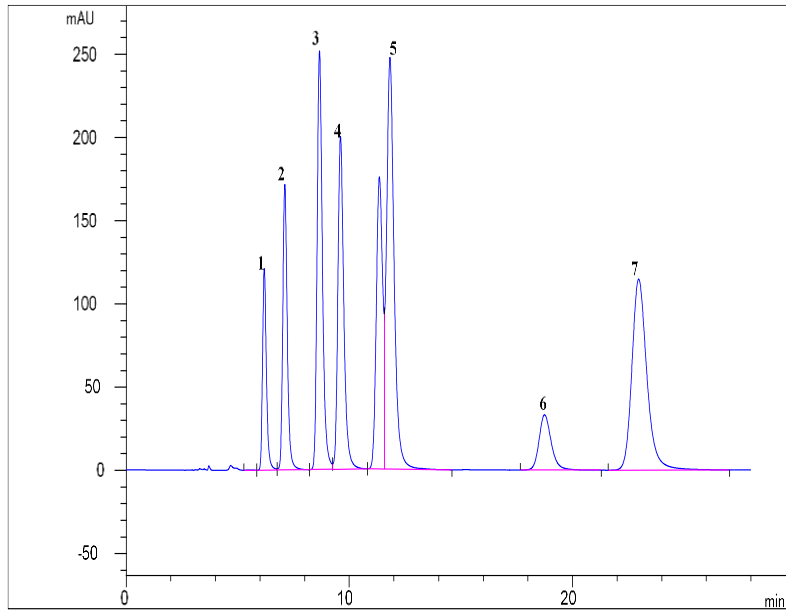
EK32. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



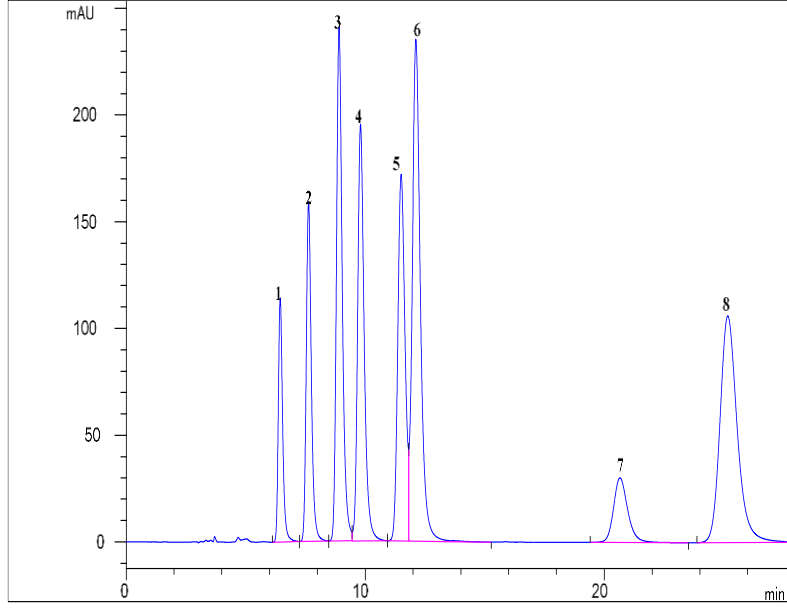
EK33. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 30 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK34. İzokratik elüsyon: ACN / TAMPON (pH: 6.5, 35 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

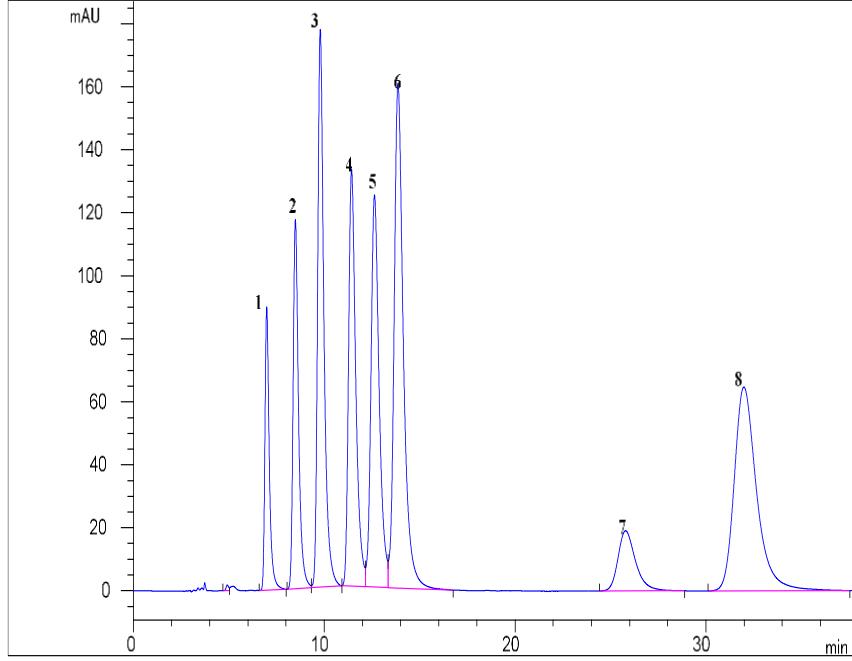


EK35. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

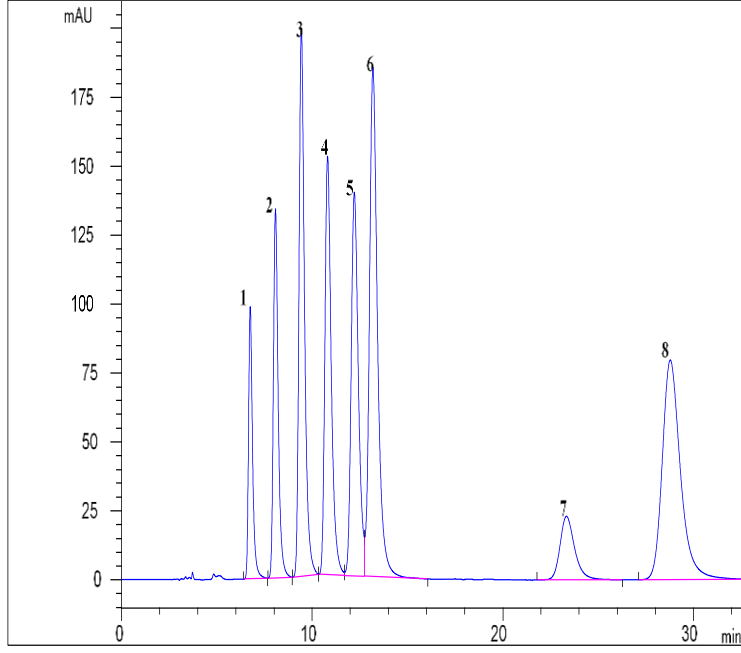


6. Sıcaklık Optimizasyonu

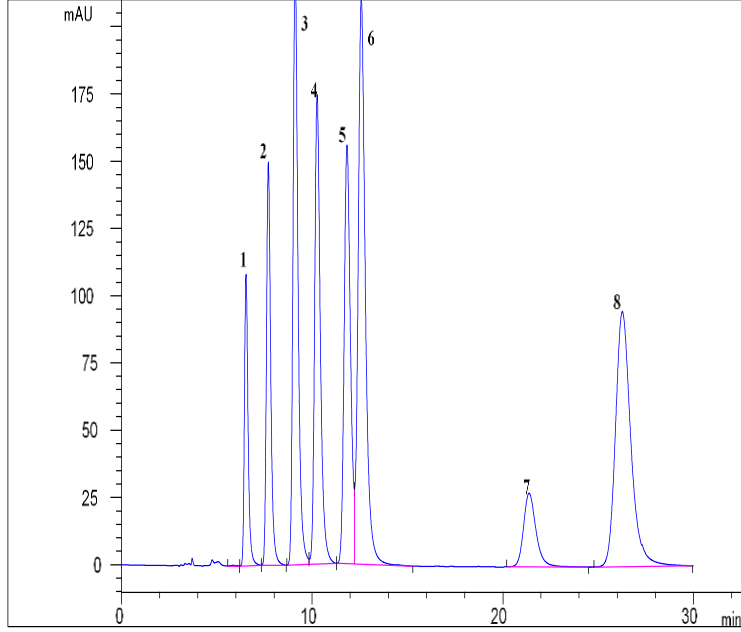
EK36. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON(pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 10 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



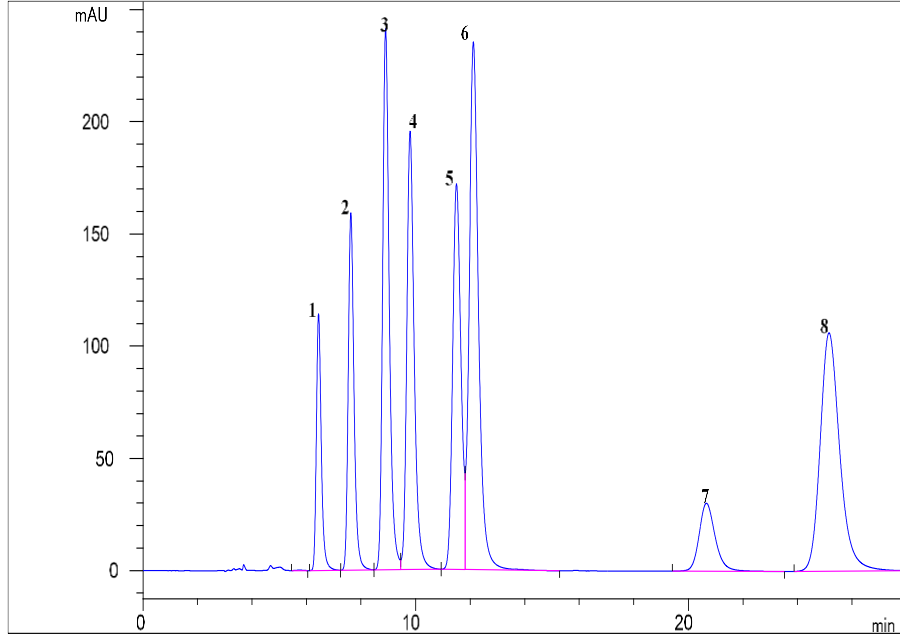
EK37. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



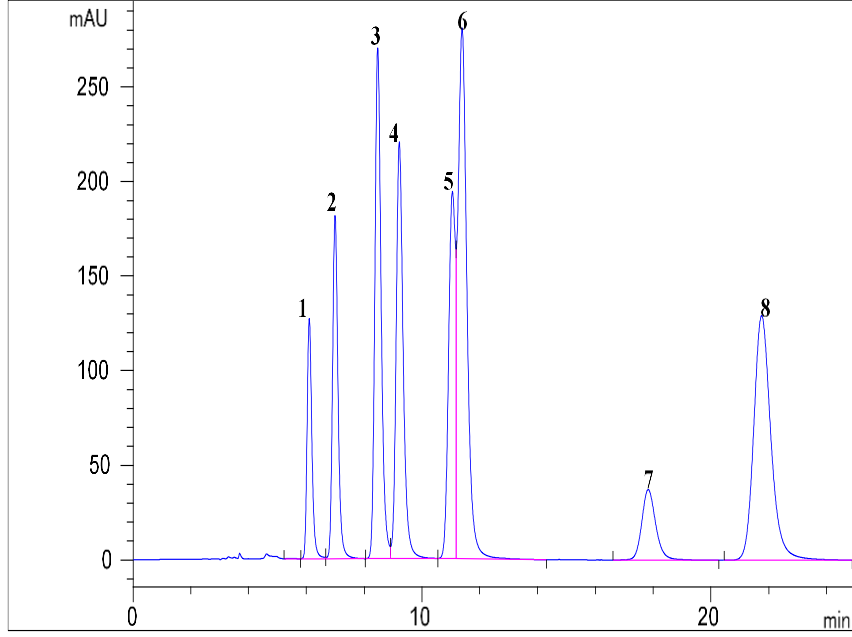
EK38. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON(pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 20 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



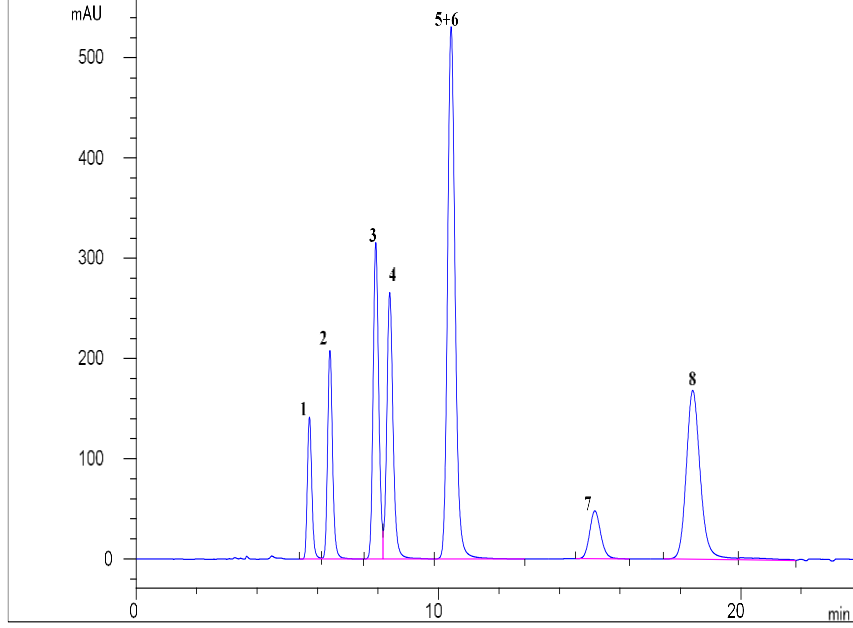
EK39. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK40. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 30 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

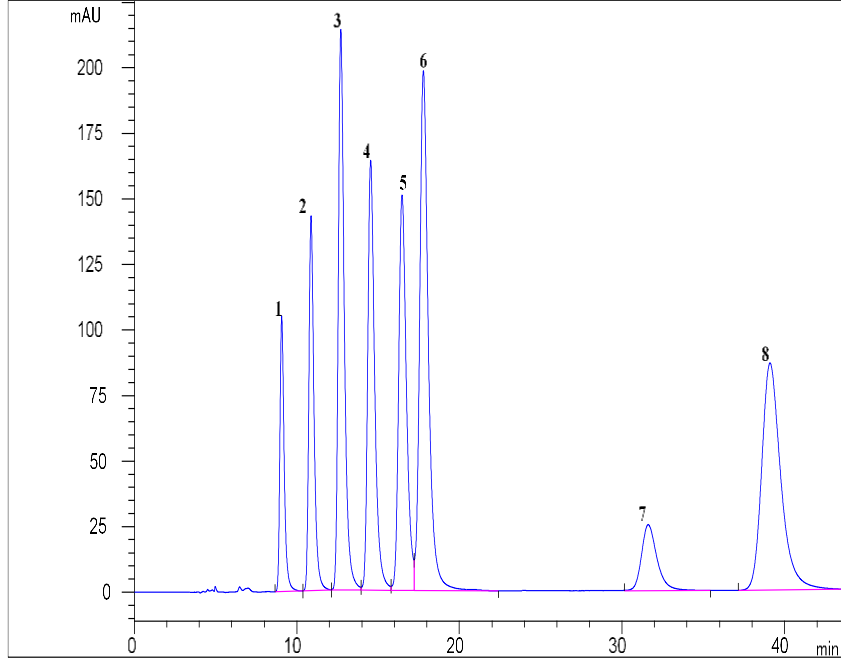


EK41. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık: 40 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

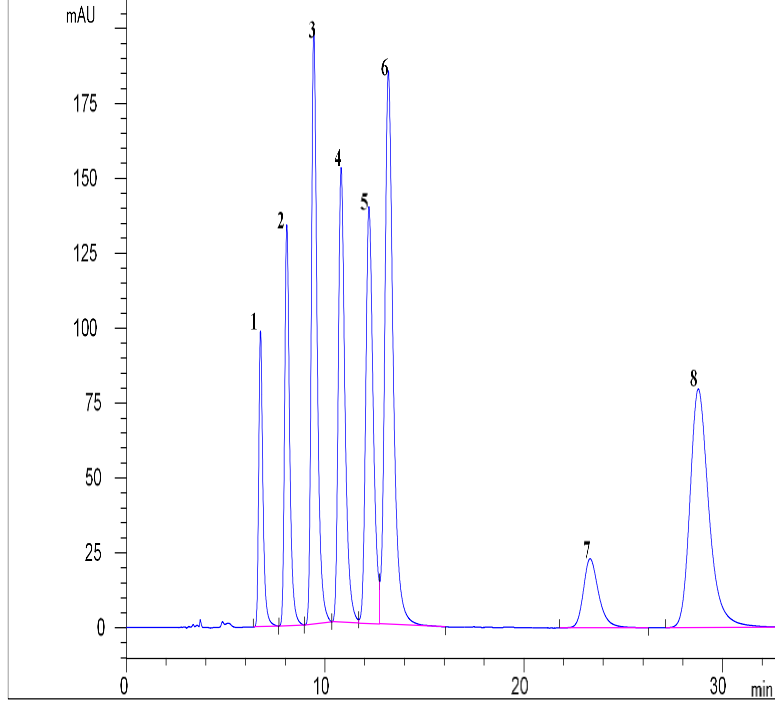


7. Akış Hızı Optimizasyonu

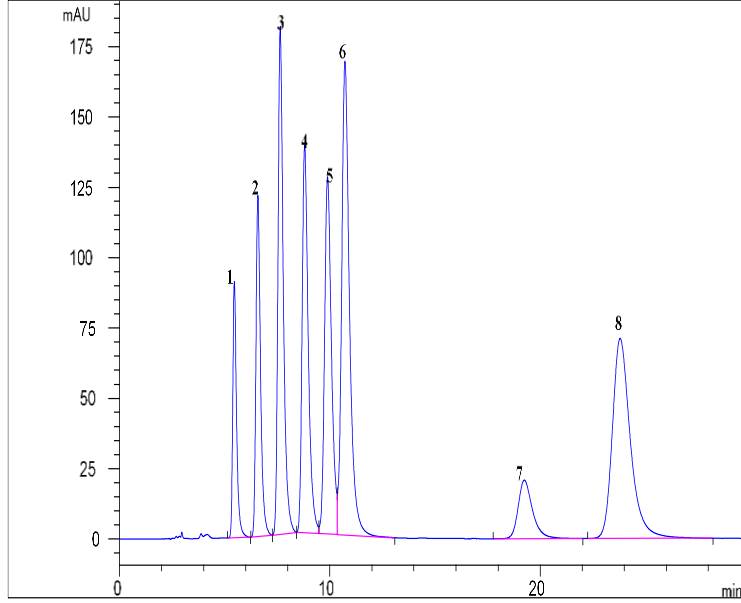
EK42. İzokratik elüsyon: ACN/TAMPON (pH: 6.5, 40 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$): 10/90, Akış Hızı: 0.75 mL/dk, Sıcaklık.: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 μL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



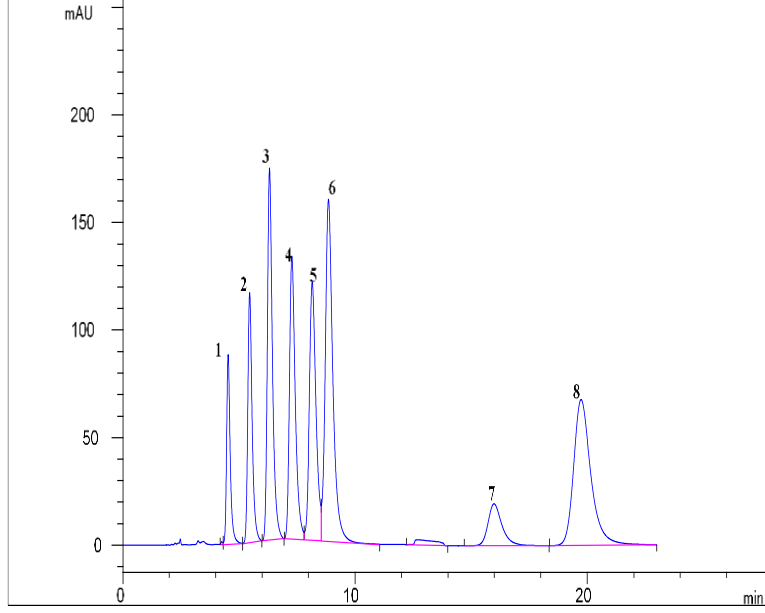
EK43. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1mL/dk, Sıcaklık.: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK44. İzokratik elüsyon: ACN in buffer (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, akış hızı: 1.25mL/dk, Sıcaklık.: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3: (SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6:(SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK45. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON(pH: 6.5, 40 Mm KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1.5mL/dk, Sıcaklık.: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3:(SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).



EK46. İzokratik elüsyon: ACN /TAMPON (pH: 6.5, 40 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄): 10/90, Akış Hızı: 1.75mL/dk, Sıcaklık.: 15 °C, Enjeksiyon hacmi: 10 µL /100 ppm, Dalga boyu: 250 nm. Analitler: 1: (SDZ), 2: (SMX), 3: (SMR), 4: (STZ), 5: (SMZ), 6: (SMOP), 7: (SDM), 8: (SQX).

