



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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİETANOLAMİN TÜREVİ YENİ BİR SABİT FAZIN SENTEZİ,
KARMA MOD HPLC UYGULAMALARI VE ETKİLEŞİM
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Meryem DOKDEMİR

Temmuz-2025

BATMAN

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

YÜKSEK LİSANS

**DİETANOLAMİN TÜREVİ YENİ BİR SABİT FAZIN SENTEZİ,
KARMA MOD HPLC UYGULAMALARI VE ETKİLEŞİM
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Meryem DOKDEMİR

**Danışman
Prof. Dr. Tarık ARAL**

Diğer Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tarık ARAL Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK

Temmuz-2025

BATMAN

TEZ KABUL VE ONAYI

Meryem DOKDEMİR tarafından hazırlanan “Dietanolamin Türevi Yeni Bir Sabit Fazın Sentezi, Karma Mod Hplc Uygulamaları ve Etkileşim Mekanizmasının İncelenmesi” adlı tez çalışması 07/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

.....

Danışman

Prof. Dr. Tarık ARAL

.....

Üye

Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Murat ÖTER
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 223Z036 proje numarası ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

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.

Meryem DOKDEMİR

Tarih: 07/07/2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

DIETANOLAMİN TÜREVİ YENİ BİR SABİT FAZIN SENTEZİ, KARMA MOD HPLC UYGULAMALARI VE ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Meryem DOKDEMİR

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarık ARAL

2025, 110 Sayfa

Karışık modlu kromatografi, analitler ve sabit faz arasındaki çoklu etkileşim mekanizmalarını entegre ederek çok yönlü bir ayırma yaklaşımı sunar. Geleneksel tek modlu tekniklerden farklı olarak, bu yöntem, tek bir kromatografik çalışma içinde hidroforik ve iyonik kısımlar gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahip bileşiklerin aynı anda ayrılmasına izin verir. Bu çalışmada, fonksiyonel ligand olarak dietanolamin kullanılarak yeni bir silika bazlı durağan faz sentezlenmiştir. Bu ligand, hidrofilik etkileşim (HILIC), ters faz (RPLC) ve iyon değişim (IEC) kromatografisini birleştiren karma modlu bir alıkonma mekanizması sağlayarak hem polar hem de polar olmayan özellikler sunar. Bu aşamanın alıkonma davranışı, logP, logD, logS ve pKa değerleri dahil olmak üzere nicel yapı-alıkonma ilişkisi (QSRR) parametreleri kullanılarak değerlendirildi. Sabit faz, birleştirme maddesi olarak [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan kullanılarak, basit ve uygun maliyetli bir prosedürle hazırlandı. Ligand yoğunluğunun etkisini değerlendirmek için, farklı karbon yüklerine sahip üç varyant sentezlendi ve standart HPLC kolonlarına paketlenildi. En etkili bileşimi belirlemek için performans testi yapıldı ve ardından kapsamlı kromatografik değerlendirmeler gerçekleştirildi. Sentezlenen fazların karakterizasyonu; element analizi, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve Brunauer–Emmett–Teller (BET) yüzey alanı ölçümleri kullanılarak yapıldı. Optimize edilmiş kolon, yüksek polar bileşiklerden güçlü hidroforik bileşiklere kadar geniş bir analit spektrumunda mükemmel performans gösterdi. On beş dakika içinde dokuz polar nükleobaz ve nükleosit analitinin temel ayrımı elde edildi. Ayrıca, alkilbenzenler (5 bileşik), poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) (4 bileşik), Sudan boyaları (7 bileşik), benzoik asitler (8 bileşik), fenoller (8 bileşik) ve anilinler (9 bileşik) dahil olmak üzere karmaşık karışımları verimli bir şekilde çözdü. Kolon, 49.000'i aşan yüksek bir teorik plaka sayısı (N/m) ve 1.00'e yakın bir pik asimetri faktörü sergiledi; bu da mükemmel kromatografik verimliliği ve pik şeklini gösteriyor. Etkileşim mekanizmasının detaylı olarak incelenmesi için HILIC fazındaki nükleobazlar/nükleositler ve RPLC/IEC fazındaki benzoik bölgeler için pH, mobil faz içeriği, sıcaklık, akış hızı, tampon konsantrasyonu gibi deneysel koşulların ayırma üzerine etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlar, çeşitli analit sınıflarını içeren kapsamlı analitik uygulamalar için geliştirilen karma modlu durağan fazın güçlü potansiyelini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: : Karışık modlu kromatografi, polar durağan fazlar, HILIC, ters faz, WAX, nükleobazlar ve nükleositler, PAH'lar, QSRR

ABSTRACT

MASTER

SYNTHESIS OF A NOVEL DIETHANOLAMINE-DERIVED STATIONARY PHASE, MIXED-MODE HPLC APPLICATIONS, AND INVESTIGATION OF THE INTERACTION MECHANISM

Meryem DOKDEMİR

Batman University Graduate Education Institute

Chemistry Department of Science

Advisor: Prof. Dr. Tarık ARAL

2025, 110 Pages

Mixed-mode chromatography offers a versatile separation approach by integrating multiple interaction mechanisms between analytes and the stationary phase. Unlike traditional single-mode techniques, this method allows for the simultaneous separation of compounds with varying functional groups—such as hydrophobic and ionic moieties—within a single chromatographic run. In this study, a novel silica-based stationary phase was synthesized using diethanolamine as the functional ligand. This ligand introduces both polar and nonpolar characteristics, enabling a mixed-mode retention mechanism that combines hydrophilic interaction (HILIC), reversed-phase (RPLC), and ion-exchange (IEC) chromatography. The retention behaviour of this phase was assessed using quantitative structure-retention relationship (QSRR) parameters, including logP, logD, logS, and pKa values. The stationary phase was prepared through a straightforward and cost-efficient procedure, utilizing [2-(3,4-epoxycyclohexyl)ethyl]trimethoxysilane as the coupling agent. To evaluate the effect of ligand density, three variants with differing carbon loadings were synthesized and packed into standard HPLC columns. Performance testing was conducted to identify the most effective composition, followed by comprehensive chromatographic evaluations. Characterization of the synthesized phases was carried out using elemental analysis, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area measurements. The optimized column demonstrated excellent performance across a broad spectrum of analytes, from highly polar to strongly hydrophobic compounds. It achieved baseline separation of nine polar nucleobase and nucleoside analytes within 15 minutes. Furthermore, it efficiently resolved complex mixtures, including alkylbenzenes (5 compounds), polyaromatic hydrocarbons (PAHs) (4 compounds), Sudan dyes (7 compounds), benzoic acids (8 compounds), phenols (8 compounds) and anilines (9 compounds). The column exhibited a high theoretical plate number (N/m) exceeding 49000 and a peak asymmetry factor close to 1.00, indicating excellent chromatographic efficiency and peak shape. In order to examine the retention mechanism in detail, the effect of experimental conditions such as pH, mobile phase content, temperature, flow rate, buffer concentration on separation was studied for nucleobases/nucleosides in the HILIC phase and benzoic sites in the RPLC/IEC phase. These results highlight the strong potential of the developed mixed-mode stationary phase for comprehensive analytical applications involving diverse analyte classes.

Keywords: Mixed-mode chromatography, Polar stationary phases, HILIC, Reversed-phase, WAX, Nucleobases and nucleosides, PAHs, QSRR

ÖN SÖZ

Bu süreçte, yürütücülüğünü üstlendiği proje kapsamında bilgi birikimi, yol göstericiliği, tecrübesi ve her zaman hissettirdiği desteğiyle bana yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Tarık ARAL'a gönülden teşekkür ederim. Onun desteği, öğreticiliği, yol göstericiliği ve her daim cesaretlendiren yaklaşımı bu süreci benim için anlamlı kıldı.

HPLC çalışmalarında bilgi ve deneyimiyle bana her zaman destek olan, naif ve öğretici yönüyle sürecimi kolaylaştıran Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL hocama teşekkür ederim. Sentez ve analiz sonuçlarında süreç boyunca bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarına katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR ve Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK hocalarıma teşekkür ederim.

Bu süreçte, çalışma ortamındaki uyum ve iş birliği için sevgili laboratuvar arkadaşım Kübra TUNÇ'a teşekkür ederim.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, sabırları, sevgileri ve destekleriyle bana güç veren değerli aileme minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Ayrıca, bu çalışmayı mümkün kılan TÜBİTAK 1001 Projesi desteği için de teşekkür ederim.

Emeği geçen herkese içten şükranlarımla...

Meryem DOKDEMİR
BATMAN-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖN SÖZ	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Kromatografinin Temel Yapısı, Gelişimi ve Ayırma Prensibi	1
1.2. HPLC’de Ayırma Mekanizması ve Kromatogram Yorumlama	2
1.2.1. Ayırma modları.....	6
1.2.1.1. Ters faz kromatografisi (RP-HPLC)	6
1.2.1.2. Normal faz kromatografisi	7
1.2.1.3. İyon değişim kromatografisi (IEC).....	8
1.2.1.4. Hidrofilik etkileşimli kromatografisi (HILIC)	8
1.2.1.5. Karma mod (mixed-mode) kromatografisi.....	9
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	11
2.1. Karma Mod Kromatografisi (Mixed Mode Chromatography, MMC)	11
2.1.1. Karma Mod Sabit Fazların Gelişimi Ve Kullanımı	11
2.1.1.1. Karma mod sabit fazların sentezinde kullanılan yaklaşımlar	11
2.1.1.2. Terminal fonksiyonlu reaktiflerle ön modifikasyon yöntemi	12
2.1.1.3. Silika yüzeyinin ptms ile modifikasyonu sonrası aşılama	12
2.1.1.4. Mps yüzey modifikasyonu ve tıklama tabanlı polimerizasyon	12
2.1.2. Karma Mod Sabit Fazların Yapısal Özellikleri	13
2.1.2.1. Parçacık tabanlı karma mod sabit faz sistemleri.....	14
2.1.2.2. RPLC/HILIC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi.....	14
2.1.2.3. RPLC/IEC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi	16
2.1.2.4. HILIC/IEC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi	17
2.1.2.5. Çoklu modlarda çalışabilen karma sabit fazların geliştirilmesi.....	18
2.2. Karma Modlu Sıvı Kromatografisi İçin Geliştirilen Sabit Faz Türleri.....	19
2.2.1. Silika bazlı karma modlu sabit fazların sınıflandırılması	19
2.2.2. Polimerik karışık modlu sabit fazlar	24
2.2.3. Hibrit karma modlu sabit fazlar	27
2.2.4. Monolitik karma modlu durağan fazlar	29
2.3. HILIC Sabit Fazlarının Geliştirilmesindeki İlerlemeler	32
2.3.1. Silika jeli ve kimyasal olarak bağlanmış silika tabanlı sabit fazlar	32
2.3.2. Amino asit ve amid bağlı sabit fazlar	33
2.3.3. Peptit ve siklopeptit fonksiyonlu sabit fazlar.....	33
2.3.4. Zwitteriyonik ve karışık modlu silika tabanlı sabit fazlar	35
2.3.5. Polimer kaplı ve polimerik yapıda sabit fazlar	37

3. YÖNTEM	44
3.1. Malzemeler	44
3.2. Enstrümanlar	44
3.3. HPLC Koşulları	45
3.4. Kromatografik Kolonun Paketlenmesi	45
3.5. Yeni Durağan Fazın Sentezleri	46
3.6. QSRR Değerlerinin Ve Kromatografik Parametrelerin Hesaplanması	46
3.7. Sentezler.....	46
3.8. Silika Üzerindeki Karbon Yükünün Optimizasyonu	49
3.9. Karakterizasyonlar	52
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	55
4.1. HPLC Değerlendirmeleri	55
4.1.1. HILIC koşulları altında nükleobazların HPLC değerlendirmesi	55
4.1.1.1. Mobil faz içeriğinin etkisi.....	60
4.1.1.2. Akış hızının etkisi	61
4.1.1.3. Sıcaklığın etkisi.....	62
4.1.1.4. Tampon konsantrasyonunun etkisi	64
4.1.1.5. pH'ın etkisi	65
4.1.2. Alkilbenzenler, PAH'lar ve Sudan Boyaların HPLC değerlendirmesi	68
4.1.3. Fenollerin HPLC değerlendirmesi	73
4.1.4. Anilinlerin HPLC değerlendirmesi	77
4.1.5. Benzoik asitlerin HPLC değerlendirmesi	80
4.1.5.1. Mobil içeriğin etkisi.....	83
4.1.5.2. Sıcaklığın etkisi.....	84
4.1.5.3. Tampon konsantrasyonunun etkisi	85
4.1.5.4. pH'ın etkisi	86
4.1.6. Tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	89
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	91
5.1 Sonuçlar	91
5.2 Öneriler	92
KAYNAKLAR	94
EKLER	111

ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Silika bazlı karma modlu sabit fazların sınıflandırılması.....	21
Tablo 2.2: Polimerik karışık modlu sabit fazlar.....	25
Tablo 2.3: Hibrit karma modlu sabit fazlar.....	28
Tablo 2.4: Monolitik karma modlu durağan fazlar.....	30
Tablo 3.1: Hazırlanan durağan fazların temel bileşimi.....	53
Tablo 3.2: DEA-Mix SP'nin BET yüzey karakterizasyonu.....	53
Tablo 4.1: "Van't Hoff denkleminde elde edilen ΔH° ve ΔS° değerleri.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Kromatografik ayırma ve dedeksiyon sürecini şematik olarak gösterimi.....	3
Şekil 1.2 :Sabit faz- analit etkileşim türleri.....	4
Şekil 2.1: Sistin (Sil-(cys) ₂) ve sistein (Sil-cys) bağlı silika sabit fazının yapıları.....	33
Şekil 2.2: Aynı amino asit dizilimine sahip (-alanin-alanin-alanin-glutamik asit) doğrusal peptit(1-pep) ve siklopeptit (c-pep) fazlarının yapıları.....	34
Şekil 2.3: Bacillus subtilis tarafından üretilen döngüsel heptapeptit yapısındaki biyosüpfaktan surfaktin bağlı silikanın yapısı	34
Şekil 2.4: Zwitteriyonik amino-fosfat bağlı silika sabit fazının yapısı.....	35
Şekil 2.5: Glutatyon bazlı karışık modlu HILIC/katyon değişim mekanizmasına sahip bağlı silika sabit fazı	36
Şekil 2.6: Thiol-Click-COOH bağlı silika sabit fazının yapısı	36
Şekil 2.7: Aromatik dörtlü amonyum iyonları içeren dallanmış birimlerin tekrarıyla oluşturulmuş dendritik polimer sabit fazının yapısı.....	38
Şekil 2.8: Di-katyonik iyonik sıvılara dayalı silika bağlı sabit fazların yapısı.....	40
Şekil 2.9: Farklı uzunluklarda bağlı zincirler içeren di-katyonik iyonik sıvıların bağlandığı silik asabit fazları.....	40
Şekil 2.10: L-laktat anyonu ile birlikte imidazolyum içeren C8-silika sabit fazının yapış.....	40
Şekil 3.1: Yeni karma modlu sabit fazın sentezi.....	48
Şekil 3.2:SPA-C için alkilbenzen karışımının ilk test kromatogramı ve analiz koşullar.....	50
Şekil 3.3:SPA-C sabit fazı kullanılarak nükleobaz ve nükleozit karışımına ait ilk test kromatogramı ve uygulanan kromatografik koşullar.....	51
Şekil 3.4: SP1A-C'nin FTIR spektrumu	52
Şekil 4.1: Bu çalışmada incelenen nükleobazların/nükleositlerin yapıları.....	55
Şekil 4.2: DEA-Mix SP ile nükleobazların/nükleositlerin bazı analitleri için önerilen etkileşim mekanizması.....	57
Şekil 4.3: DEA-Mix SP üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin iki farklı optimum koşul altında ayrılması.....	59
Şekil 4.4: Bu çalışmada incelenen apolar bileşiklerin (alkilbenzenler ve PAH'lar) yapılar.....	68
Şekil 4.5: Bu çalışmada incelenen Sudan boyalarının yapıları.....	69
Şekil 4.6: DEA-MixSP sabit fazı üzerinde alkil benzenlerin ayrımı.....	70
Şekil 4.7: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde PAH'ların ayrımı.....	71
Şekil 4.8: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde Sudan boyalarının ayrımı.....	72
Şekil 4.9: Bu çalışmada incelenen substitüe fenol bileşiklerinin yapıları.....	73
Şekil 4.10: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde türev fenollerin ayrımı.....	74
Şekil 4.11: Bu çalışmada incelenen substitüe anilinlerin yapıları.....	77
Şekil 4.12: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde türev anilinlerin ayrımı.....	78
Şekil 4.13: Bu çalışmada incelenen benzoik asitlerin yapıları.....	80
Şekil 4.14: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde benzoik asit türevlerinin optimum koşullarda ayırım.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEX: Anyon Değişim Kromatografisi (Anion Exchange Chromatography)
CEX: Cation Exchange Chromatography (Kasyon Değişim Kromatografisi)
DAB: 2,4-Diaminobutyric acid (2,4-Diaminobütirik Asit)
3,5-DNB: 3,5-dinitrobenzoik asit
3,5-DNS: 3,5-dinitrosalisilik asit
4-metilBA: 4-metilbenzoik asit
MeCN: Acetonitrile (Asetonitril)
LogP: Octanol–Water Partition Coefficient (Hidrofilik–lipofilik denge)
HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi)
IgG: Immunoglobulins (İmmünoglobulinler)
RI: Refractive Index (Kırılma İndeksi)
LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi)
BA: Benzoik asit
BMAA: Beta-methylamino-L-alanine (Beta-Metilamino-L-Alanin)
BEH: Ethylene-bridged Hybrid (Etilen Köprülü Hibrit)
EtOH: Ethanol (Etanol)
SEC: Size Exclusion Chromatography (Boyut Dışlama Kromatografisi)
PABA: P-aminobenzoik asik
pKa: Acid Dissociation Constant (Asit ayrışma sabiti)
DMSO: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DMF: N,N-Dimetilformamid
BICINE: N,N-Dihydroxyethylglycine (N,N-Dihidroksietilglisin)
NMR: Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)
FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
GPC: Gel Permeation Chromatography (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)
WAX: Weak Anion Exchange (Zayıf Anyon Değişim)
WCX: Weak Cation Exchange (Zayıf Kasyon Değişim)
XRD: X-Ray Diffraction (X-Işını Kırınımı)
SCX: Strong Cation Exchange (Güçlü Kasyon Değişim)
SAX: Strong Anion Exchange (Güçlü Anyon Değişim)
SalA: Salisilik asitten
DAD: Diode-Array Detector (Diyot Dizi Dedektörü)
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IEC: Ion Exchange Chromatography (İyon Değişim Kromatografisi)
IC: Ion Chromatography (İyon Kromatografisi)
LogD: Distribution Coefficient at a specific pH (pH'ya bağlı dağılım katsayısı)
MMC: Mixed-mode Chromatography (Karma Mod Kromatografisi)
NP-HPLC: Normal Phase HPLC (Normal Faz Sıvı Kromatografisi)
RPC: Reversed Phase Chromatography (Ters Faz Kromatografisi)
TLC: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
TFA: Trifluoroacetic acid (Trifloroasetik Asit)

UV-Vis: Ultraviolet–Visible Spectroscopy (Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi)

HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2'-2-ethanesulfonic acid

SEM: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

PEI/Zein: Zein ile modifiye edilmiş polietilenimin sabit fazı

1.GİRİŞ

1.1. Kromatografinin Temel Yapısı, Gelişimi ve Ayırma Prensibi

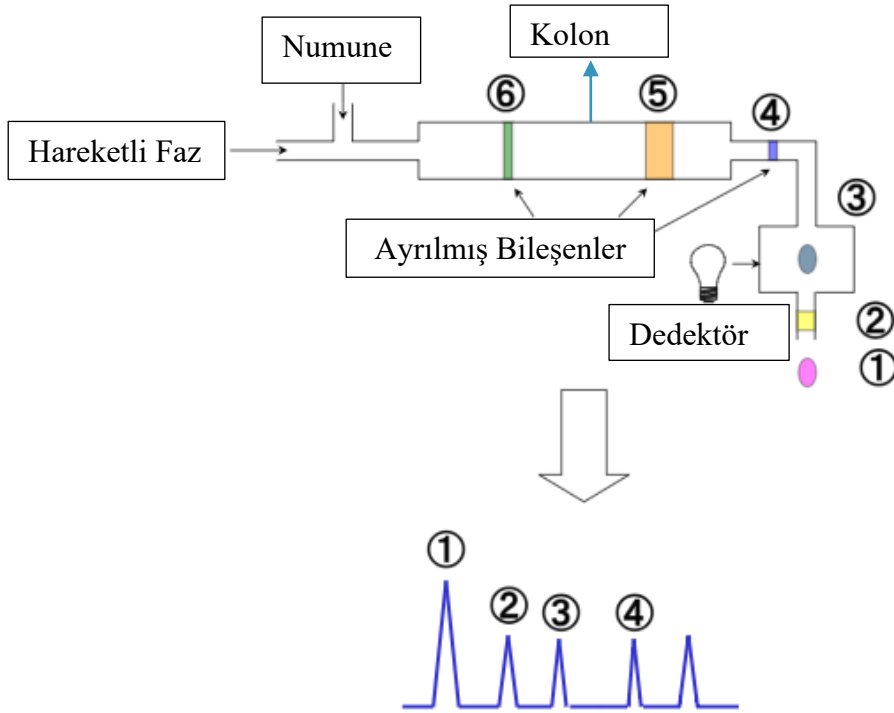
Kromatografi, maddeleri ayırmak, saflaştırmak ve tanımlamak amacıyla yaygın şekilde kullanılan fiziksel bir ayırma yöntemidir (Coşkun, 2016). IUPAC'a göre bu teknik, bileşenlerin bir sabit faz ve belirli yönde hareket eden bir hareketli faz arasında farklı şekillerde dağılmasına dayanır (Ettre, 1993). Terim, Yunanca "chroma" (renk) ve "graphein" (yazmak) sözcüklerinden türetilmiş olup, başlangıçta renkli pigmentlerin ayrılmasına atıfta bulunur (Harper, n.d.). Kromatografi ilk olarak 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla geliştirilmiştir (Berezkin, 1990; Hesse ve Weil, 1954). Kromatografi, karışımların bileşenlerine ayrılması için geliştirilen en temel ve etkili ayırma tekniklerinden biridir. Bu yöntemin temeli, analiz edilecek örnekteki bileşenlerin sabit faz ile olan etkileşimlerine göre farklı hızlarda taşınmasına dayanır. Sistem iki fazdan oluşur; biri sabit faz, diğeri ise hareketli faz olarak adlandırılır. Sabit faz, genellikle katı veya sıvı bir destek üzerinde sabit kalan ve ayırmayı sağlayan yüzeydir. Hareketli faz, örneği sistem boyunca taşıyan fazdır. Karışım içindeki her bir bileşik, sabit faza olan afiniteleri doğrultusunda sistem içerisinde farklı derecelerde tutulur. Sabit faza daha kuvvetli bağlanan bileşikler sistem içinde daha uzun süre kalır, daha zayıf etkileşim gösterenler ise daha hızlı şekilde taşınarak kolondan önce elüe edilir. Bu farklı tutulma süreleri, bileşiklerin birbirinden ayrılmasını sağlar. Böylece, örnek içerisindeki maddeler birbirlerinden ayrıştırılır ve ayrı ayrı tespit edilebilir hâle gelir. Kromatografik ayırma yöntemleri, özellikle kompleks karışımların analizinde yüksek duyarlılık ve seçicilik sunar. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, ilaç etken maddeleri, pestisitler, karbonhidratlar gibi biyolojik ve kimyasal öneme sahip birçok bileşik bu yöntemle başarıyla ayrılabilir. Bu yönüyle kromatografi, günümüzde hem araştırma laboratuvarlarında hem de ilaç, gıda ve çevre analizlerinde yaygın olarak kullanılan vazgeçilmez bir tekniktir (Skoog vd., 2006). Kromatografik teknikler içerisinde önemli bir yere sahip olan sıvı kromatografi (LC), bileşiklerin sıvı bir hareketli faz kullanılarak sabit faz üzerinde ayrılmasına dayanan kromatografik bir tekniktir. İlk olarak klasik sistemlerde kullanılan sıvı kromatografi, cam kolonlar içerisinde düşük basınç altında ve yerçekimi kuvvetiyle ilerleyen mobil fazla gerçekleştirilmekteydi. Bu geleneksel sistemler sınırlı çözünürlük, düşük hız ve düşük verimlilik gibi dezavantajlara sahipti (Oliver, 1991). Teknolojinin gelişmesiyle birlikte bu yöntemin

otomatikleştirilmiş, yüksek basınca dayanıklı, daha hassas ve hızlı hâle getirilmiş bir versiyonu olan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) geliştirilmiştir. HPLC, klasik sıvı kromatografi (LC) sistemlerine göre çok daha dar pik genişliği, kısa analiz süresi ve yüksek ayırma kapasitesi ile öne çıkmaktadır. Sistemde mobil faz, güçlü bir pompa yardımıyla kolondan yüksek basınç altında geçirilir; bu da analitlerin sabit fazla daha etkili etkileşim kurmasını sağlar (Meyer, 2010). HPLC cihazları temel olarak şu birimlerden oluşur: mobil faz haznesi, yüksek basınçlı pompa sistemi, örnek enjektörü, sabit faz içeren kolon, dedektör ve veri analiz ünitesi. Mobil faz, çözünürlüğü yüksek bir çözücü ya da çözücü karışımı olarak seçilir ve pompa yardımıyla sabit faz üzerinden yüksek basınçla geçirilir. Pompa sistemlerinin en önemli işlevi, sabit bir akış hızını minimum darbe ile sağlamaktır. Bu da analiz tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı açısından kritiktir (Meyer, 2010). HPLC, özellikle kompleks örnek matrislerinde hızlı ve güvenilir ayırma yapabildiği için ilaç sanayii, biyoteknoloji, gıda analizi ve çevresel izleme gibi alanlarda yoğun şekilde tercih edilmektedir. Modern analiz teknolojilerinin temel taşlarından biri hâline gelen bu sistem, sıvı kromatografinin evrimsel olarak ulaştığı en verimli aşamalardan biridir (Oliver, 1991; Meyer, 2010).

1.2. HPLC’de Ayırma Mekanizması ve Kromatogram Yorumlama

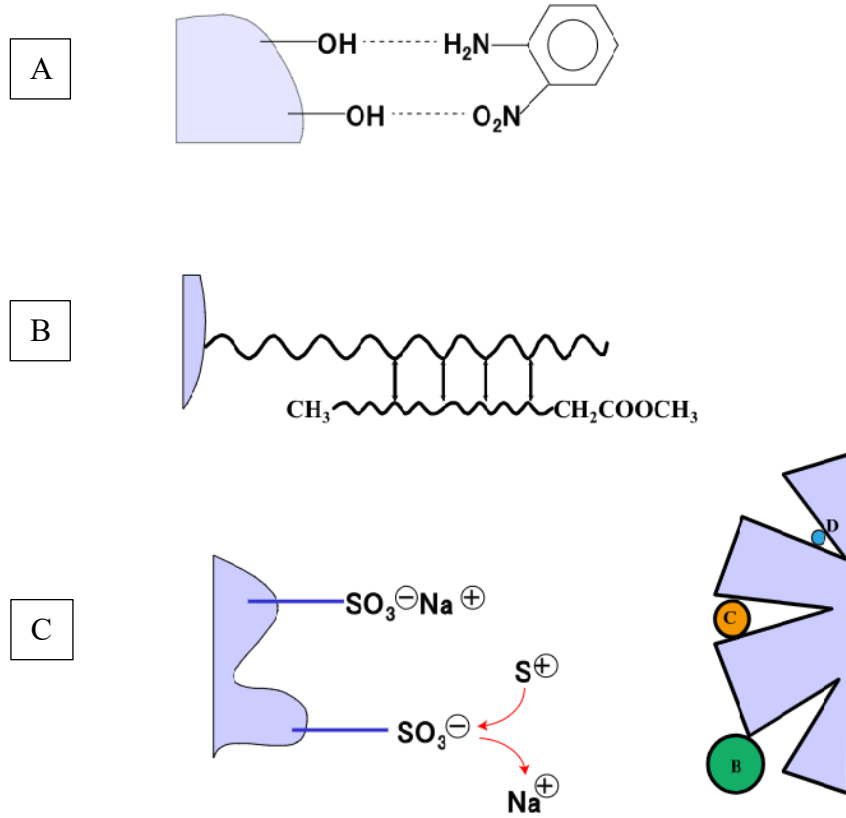
Bir kimyasal karışımın ayrılması sürecinde, analiz edilecek örnek, hareketli faz olarak tanımlanan sıvı bir taşıyıcıya yüklenir ve sabit faz işlevi gören katı bir ortam üzerinden geçirilir. Bu taşıma süreci boyunca, karışımı oluşturan bileşenler sabit fazla fizikokimyasal etkileşimlere girer. Her bir bileşiğin sabit faz ile olan afinite derecesi farklı olduğundan, kolon içerisindeki ilerleme hızları da değişkenlik gösterir. Sabit faza güçlü bağlanma eğiliminde olan bileşikler sistemde daha uzun süre tutulurken, zayıf etkileşim gösterenler daha erken elüe olur. Bu selektif tutulma davranışları, bileşenlerin zamanla birbirinden ayrılmasını sağlar ve yüksek çözünürlüklü bir ayırma gerçekleşir. Ayrılmış bileşenler, analitik dedektör sistemleri aracılığıyla izlenebilir. En yaygın kullanılan dedektörlerden biri olan UV dedektörü, bileşiklerin belirli dalga boylarında ışığı absorplama kapasitesine dayalı olarak sinyal üretir. Kromatogramda, X eksenini bileşenlerin elüsyon süresini; Y eksenini ise UV sinyalinin şiddetini temsil eder. Aynı koşullar altında gerçekleştirilen ölçümlerde, bilinmeyen bir örneğe ait bileşik, elüsyon süresi bilinen bir standartla karşılaştırılarak tanımlanabilir. Bunun yanı sıra, kromatogramdaki pik alanı veya pik yüksekliği, analitin konsantrasyonuyla doğru orantılı

olduğundan, önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri yardımıyla nicel analiz gerçekleştirilebilir. Bu açıklamalara Şekil 1.1 ile örnek oluşturulmuştur (JASCO, n.d.).



Şekil 1.1: Kromatografik ayırma ve dedeksiyon sürecini şematik olarak gösterimi; üst kısım ayırma mekanizması, alt kısım kromatogram (JASCO Corporation, n.d.)

Yüksek performanslı sıvı kromatografide (HPLC), karışımdaki bileşenlerin ayrılması, her bir bileşiğin sabit fazla olan etkileşim gücündeki farklılıklara dayanmaktadır. Kolon içerisinden geçen bileşikler, sabit fazla ne ölçüde etkileşime girdiklerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerler. Sabit fazla zayıf etkileşim sergileyen bileşikler sistemi daha hızlı terk ederken, daha güçlü etkileşime sahip olanlar kolon içinde daha uzun süre tutulur ve bu sayede ayırım gerçekleşir. Bu ayırım mekanizması, sistemde etkin olan çeşitli fizikokimyasal etkileşimlere dayanır. Başlıca etkileşim türleri arasında adsorpsiyon, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler, elektrostatik çekim, gözenekli yapıya nüfuzu ve boyut dışlama mekanizmaları yer almaktadır. Bu açıklamalara Şekil 1.2 ile örnek oluşturulmuştur (JASCO, n.d.).



Şekil 1.2: Sabit faz-analit etkileşim türleri (JASCO Corporation, n.d.)

A şemasında, polar bileşiklerin sabit fazla hidrojen bağları yoluyla gerçekleştirdiği etkileşim temsil edilmektedir. Sabit faz üzerinde bulunan hidroksil (–OH) grupları, analit molekülündeki amino (–NH₂) veya nitro (–NO₂) gibi polar fonksiyonel gruplarla hidrojen bağı kurabilir. Bu tür etkileşimler özellikle normal faz kromatografisi ve hidrofilik etkileşimli kromatografisi (HILIC) sistemlerinde önemlidir. Bu durumda, sabit fazla daha kuvvetli polar etkileşim kuran bileşikler kolonda daha uzun süre tutulurken, apolar karakterdeki bileşikler sabit faza bağlanmadan daha hızlı elüe edilir. B şeması ise hidrofobik etkileşimleri, yani ters faz kromatografisindeki (RP-HPLC) ayırma mekanizmasını göstermektedir. Sabit faza kovalent olarak bağlı uzun zincirli hidrokarbon grupları (örneğin C18) ile apolar analit molekülleri arasında van der Waals tipi hidrofobik etkileşimler oluşur. Bu durumda, apolar bileşikler sabit faza daha kuvvetli bağlandığından kolondan daha geç elüe edilir. Buna karşın, polar bileşikler sabit faza düşük afinite gösterdiğinden daha erken elüe olur. Ters faz kromatografisi, biyolojik örnekler, ilaç etken maddeleri ve apolar organik bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. C şemasında gösterilen yapı ise iyonik etkileşimlere dayalı iyon değişim kromatografisini (IEC) temsil eder. Sabit faz üzerinde yer alan anyonik gruplar (örneğin SO₃⁻) ile ortamda bulunan katyonik analitler arasında elektrostatik çekim kuvvetleri oluşur. Bu etkileşim

mekanizmasında, sabit faza ters yük taşıyan iyonlar bağlanır ve daha geç elüe edilirken, zayıf etkileşim gösteren iyonlar daha hızlı şekilde sistemden ayrılır. Bu mekanizma, hem anyon değiştirici hem de katyon değiştirici kolonlarla çalışılabilen iyon değişim sistemlerinde kullanılır ve özellikle iyonik bileşiklerin seçici analizinde büyük avantaj sağlar. Bu üç temel etkileşim tipi (A, B ve C), klasik HPLC sistemlerinde genellikle birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmekte ve her sistem yalnızca belirli bir etkileşim mekanizmasına dayanmaktadır. Ancak son yıllarda geliştirilen mixed-mode (karma mod) kromatografi yaklaşımları sayesinde, Sabit faz yüzeyine birden fazla etkileşim türünün eşzamanlı olarak bütünleştirilmesiyle, daha seçici ve güçlü bir ayırma mekanizması elde edilebilmektedir. Örneğin, ters faz kromatografisinde (B) kullanılan hidrofobik zincir grupları ile iyon değişim kromatografisinde (C) yer alan yüklü fonksiyonel gruplar aynı sabit faz yapısı üzerinde birlikte bulunabilir. Böyle bir sistemde, analit molekülleri hem hidrofobik etkileşimler yoluyla sabit faza bağlanır hem de elektrostatik çekimlerle tutulur. Benzer şekilde, sabit fazın yüzeyinde hem polar hidroksil grupları (A) hem de anyonik veya katyonik gruplar (C) yer alarak, polar bileşiklerin hem hidrojen bağı hem de elektrostatik çekim ile tutulması sağlanabilir. Bu çoklu etkileşim modeli sayesinde, özellikle kompleks yapıya sahip hem iyonik hem de apolar ya da hidrofilik özellik gösteren bileşiklerin ayrılması daha verimli hâle gelir. Mixed-mode sabit fazlar, klasik HPLC sistemlerinde benzer polariteye sahip olduğu için ayrılması zor olan analitler arasında bile seçici ayırım yapılmasına olanak tanır. Bu yönüyle A, B ve C şemalarında ayrı ayrı gösterilen etkileşim türleri, karma mod kromatografi sistemlerinde aynı sabit faz üzerinde birlikte çalışarak çok boyutlu bir ayırma stratejisi sunar.

Şekil 1.2'de yer alan etkileşim modelleri, klasik HPLC sistemlerinde bağımsız olarak kullanılan üç temel ayırma mekanizmasını temsil etmektedir: hidrojen bağına dayalı polar etkileşimler (A), hidrofobik etkileşimler (B) ve elektrostatik iyonik etkileşimler (C). Bu şemalar, sabit faz üzerindeki fonksiyonel grupların analit molekülleriyle nasıl bir seçicilik oluşturduğunu yalın biçimde ortaya koymaktadır. Ancak günümüzde geliştirilen karma modlu sabit fazlar, bu üç mekanizmayı tek bir kolon üzerinde birleştirerek daha üst düzey ve çok boyutlu bir ayırma stratejisi sunmaktadır. Karma mod sistemlerde sabit faz yüzeyine aynı anda hem hidrofilik ($-OH$), hem hidrofobik (C_8 , C_{18}) hem de iyonik (SO_3^- , NH_3^+) gruplar yüzeye tutturulabilir. Bu sayede analit molekülleri yalnızca tek bir tür etkileşim üzerinden değil, aynı anda birden fazla alıkonma yolu ile ayrılabilir. Şekilde C bölgesi olarak kodlanan elektrostatik etkileşim

alanı, örneğin hem anyonik sabit faz grupları hem de katyonik analitler için önemli bir alıkonma noktası sağlar. Bu alanla birlikte, eşzamanlı olarak B bölgesindeki apolar gruplarla hidrofobik analitler tutulabilirken, A bölgesinde ise polar gruplar hidrojen bağlarıyla etkileşim kurar. Bu yapı sayesinde, örneğin hem bazik hem de apolar karakter taşıyan bir analit, önce elektrostatik çekimle sabit faza bağlanır, ardından apolar bölgede tutulur ve böylece kolon içinde kendine özgü bir alıkonma süresi kazanır. Bu mekanizma, klasik sistemlerde görülemeyecek kadar yüksek ayırma kapasitesi yaratır. Özellikle benzer polariteye sahip bileşiklerin aynı örnek içinde bulunduğu durumlarda, karma mod sistemlerin sağladığı çok boyutlu ayırma düzlemi, ayırma başarısını ciddi oranda artırmaktadır.

Sonuç olarak, Şekil 1.2'nin alt mesajı, karma modlu HPLC sistemlerinin tek yönlü ayırma stratejilerinin ötesine geçerek, birden fazla fizikokimyasal etkileşimi aynı anda devreye soktuğu gerçeğini vurgular. Bu teknoloji, yalnızca analit seçiciliğini değil, aynı zamanda yöntemin esnekliğini ve gerçek matrislere uygulanabilirliğini artırır. Karma modlu kolonların bu yapısı, özellikle çok bileşenli biyolojik numunelerde, ilaç formülasyonlarında ve izomer ayırımında kritik avantajlar sağlar.

1.2.1. Ayırma modları

1.2.1.1. Ters faz kromatografi (RP-HPLC)

Ters fazlı sıvı kromatografi (RPLC), nötr pH koşullarında çözünmüş moleküllerin hidrofobik özelliklerine bağlı olarak ayrılmasını sağlayan ve en yaygın kullanılan kromatografik tekniktir. Bu yöntemde ayırma, analitlerin hareketli faz ile sabit faz arasında sahip oldukları dağılım katsayısına göre gerçekleşir. Sabit faz, genellikle silika bazlı olup yüzeyine bağlanmış uzun zincirli hidrofobik gruplar içerir. Bu yapı, sabit faz üzerinde sıvı benzeri bir tabaka oluşturarak düşük polariteye sahip analitlerin daha uzun süre tutulmasına, yüksek polariteye sahip olanların ise daha erken elüe edilmesine neden olur (Manadas vd., 2010). Ters fazlı sıvı kromatografi (RPLC), özellikle peptitlerin ayrılması amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Bunun başlıca nedenleri arasında; bu tekniğin su bazlı örneklerle ve gradyan elüsyon sistemleriyle yüksek derecede uyum göstermesi, ayrıca ayırma mekanizmasının pH, katkı maddeleri ve organik çözücü türü gibi parametrelerle kolaylıkla modüle edilebilmesi yer alır (McCalley, 2009). Bu yönüyle RPLC, hem esnek hem de kontrol edilebilir bir ayırma stratejisi sunar. Kromatografik

ayrımın kapasitesini etkileyen çok sayıda faktör mevcuttur. Bunlar arasında kolon sıcaklığı, kolon uzunluğu, sabit fazın kimyasal yapısı, partikül boyutu, hareketli faza eklenen iyon-çifti oluşturuıcı reaktifler, hareketli faz modifikatörleri ve gradyan eğimi sayılabilir (Gilar vd., 2005). Bu parametrelerin her biri, hem ayırım verimini hem de pik şekillerini doğrudan etkiler. Genellikle çevrimiçi ters fazlı sıvı kromatografi işlemleri asidik pH koşullarında gerçekleştirilir. Bu durum, peptitlerin iyonlaşmasını sağlayarak sabit fazla etkileşimi artırır. Bununla birlikte, yöntemin yüksek pH koşullarında çevrim dışı (offline) olarak uygulanması, ardından elde edilen fraksiyonların birleştirilmesi, farklı iyonlaşma durumları aracılığıyla peptitlerin hidrofobiklik özelliklerini değiştirir ve bu sayede daha dik açıyla (ortogonal) ayırım elde edilmesine olanak tanır (Yang vd., 2012). Bu tür çok boyutlu uygulamalar, özellikle karmaşık biyolojik örneklerde analiz duyarlılığını ve kapsamını artırmak amacıyla geliştirilmiştir.

1.2.1.2. Normal faz kromatografi

Normal faz kromatografi, sabit fazın polar, hareketli fazın ise apolar özellik gösterdiği bir ayırma tekniğidir. Bu yöntemde analitlerin sabit faza tutulması, polar yüzey gruplarıyla gerçekleşen etkileşimler aracılığıyla sağlanır. Sabit fazı oluşturan partiküllerin yüzeyinde genellikle silanol ($-SiOH$) gibi polar fonksiyonel gruplar bulunur ve bu gruplar, analit moleküllerinin polar kısımlarıyla hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri veya yük transferi yoluyla etkileşime girer. Hareketli faz ise genellikle non-polar veya düşük polariteye sahip çözücülerden oluşur. Ayırma işlemi sırasında hareketli fazın polaritesi kademeli olarak artırılarak, sabit faza daha az bağlanan bileşikler daha erken, daha güçlü bağlananlar ise daha geç elüe edilir. Böylece düşükten yükseğe doğru polariteye sahip bileşikler, kolon boyunca farklı sürelerde tutulur ve birbirlerinden ayrılır. Bu teknik, özellikle polar bileşiklerin seçici olarak ayrılması, izomer ayrımı ve ilaç hammaddelerinin safsızlık analizleri gibi alanlarda etkin biçimde kullanılmaktadır. Ayrıca, ara polariteye sahip analitlerin ayrımı için de oldukça uygundur (Skoog vd., 2006).

1.2.1.3. İyon değişim kromatografisi (IEC)

İyon değişim kromatografisi (IEC), karşıt elektriksel yükler temel alınarak bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan bir ayırma yöntemidir (Li vd., 2016). Bu teknikte, sabit faz üzerindeki fonksiyonel gruplar ile örnek bileşenleri arasında oluşan elektrostatik çekim kuvvetleri, alıkonma mekanizmasının temelini oluşturur. Yöntem, uygulama şekline göre ikiye ayrılır; katyon değişim kromatografisi ve anyon değişim kromatografisi. Katyon değişim kromatografisinde, asidik pH koşullarında sabit fazda bulunan negatif yüklü gruplar (örneğin sülfat grupları), pozitif yüklü peptitlerle elektrostatik etkileşim kurar. Anyon değişim kromatografisinde ise bazik pH ortamında sabit fazdaki pozitif yüklü gruplar (örneğin kuaterner amonyum grupları), negatif yüklü peptitleri çeker. İyon değişim kromatografisi, sabit faza bağlanmış fonksiyonel grupların kuvvetine göre ayrıca iki alt gruba ayrılır; güçlü katyon değişim kromatografisi (SCX), güçlü anyon değişim kromatografisi (SAX), zayıf katyon değişim kromatografisi (WCX) ve zayıf anyon değişim kromatografisi (WAX) (Association of Clinical Scientists, 2022). Bu tür sistemlerde kullanılan fonksiyonel gruplar genellikle silika ya da sentetik polimer esaslı reçineler üzerine yüzeye tutturulabilir. Bununla birlikte, zaman zaman inorganik yapılı taşıyıcı malzemeler de kullanılabilmektedir (Li vd., 2016). Bu yöntemde peptitlerin sabit fazdan ayrılması, mobil fazın iyonik gücünün yükseltilmesi yoluyla sağlanır. Böylece peptitlerin sıvı faza geçişi, yani elüsyonu gerçekleşir. Özellikle güçlü katyon değişim kromatografisi (SCX), proteomik çalışmalar kapsamında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, peptitler net pozitif yüklerine göre ayrılır ve en düşük pozitif yüke sahip peptit ilk olarak elüe edilir. Mobil fazdaki tuz konsantrasyonunun artırılması, peptit ile sabit faz arasındaki elektrostatik etkileşimi azaltarak alıkonma süresini kısaltır. Ancak güçlü katyon değişim kromatografisinin (SCX) çözünürlük kapasitesi, ters fazlı kromatografiye kıyasla sınırlı kalmakta ve bu nedenle karmaşık karışımların ayrılması açısından kullanım alanı kısıtlanabilmektedir (Essader vd., 2005).

1.2.1.4. Hidrofilik etkileşimli kromatografi (HILIC)

Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC), ilk olarak ters gradyan kromatografi yöntemi ile geliştirilmiş ve zamanla polar bileşiklerin ayrılmasında en çok tercih edilen tekniklerden biri hâline gelmiştir (Simpson vd., 1987). HILIC, temel prensip

olarak normal faz kromatografisine benzer şekilde çalışır; sabit fazın yapısı polar, başlangıçtaki hareketli faz ise düşük polaritelidir. Ancak ters fazlı sıvı kromatografiden (RPLC) farklı olarak, gradyan elüsyonu sırasında hareketli fazın polaritesi artırılarak ayırım gerçekleştirilir. Bu işlem, organik çözücü oranının azaltılması ile sağlanır ve böylece daha su bazlı (hidrofilik) bir ortam elde edilir (Boersema vd., 2008; Mizukami vd., 2004). HILIC yönteminde kullanılan sabit fazlar; siyanopropil, diol ya da amino grupları gibi hidrofilik karakterde fonksiyonel gruplar içeren yapılarla modifiye edilmiştir (Jandera, 2008). Buna karşılık, hareketli faz ise genellikle organik çözücülerle zenginleştirilmiş, düşük polariteli bir yapıya sahiptir (Boersema vd., 2008). Bu sistemde, polar olmayan veya düşük polariteli analitler daha zayıf etkileşim gösterdiğinden daha erken elüe olurken, yüksek polariteye sahip analitler sabit fazla daha güçlü hidrofilik etkileşimlere girerek daha geç elüe edilir (Buszewski ve Noga, 2012). HILIC yönteminde sabit faz yüklü gruplar içeriyorsa, analitlerle oluşabilecek elektrostatik etkileşimler de göz önünde bulundurulmalıdır. Böyle durumlarda, gradyan sırasında tampon ya da tuz konsantrasyonunun artırılması yoluyla bu elektrostatik bağların zayıflatılması sağlanabilir (Boersema vd., 2008; Mizukami vd., 2004). Bu strateji, özellikle iyonik yapıya sahip analitlerin daha kontrollü biçimde elüsyonunu sağlar. Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC), özellikle polar analitlerin ve hidrofilik özellikteki peptitlerin ayrılmasında yüksek verim sunar. Ayrıca, peptitlerin yapısında kutupluluğu artıran bazı sonradan oluşan biyokimyasal değişikliklerin, örneğin şeker bağlanması (glikozilasyon), asetil grubu eklenmesi (N-asetilasyon) ve fosfat grubu bağlanması (fosforilasyon) gibi dönüşümlerin, seçici olarak zenginleştirilmesine yönelik yapılan protein haritalama çalışmalarında da bu yöntem yaygın biçimde kullanılmaktadır (Manadas vd., 2010).

1.2.1.5. Karma mod (mixed-mode) kromatografi

Karma mod kromatografi (MMC), genellikle ters fazlı sıvı kromatografi (RPLC) ya da hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC) sistemlerinin, iyon değişim kromatografisi (IEC) ile birleştirilmesiyle oluşturulan bir ayırma tekniğidir (Zhang ve Liu, 2016). Bu teknik, klasik iyon değişim kromatografisine benzer şekilde çalışmakla birlikte, kullanılan sabit fazlar iyon değişim kolonlarına kıyasla çok daha hidrofobik yapıya sahiptir. MMC sistemlerinde analitlerin tutulması birden fazla etkileşim mekanizmasına bağlıdır. Genellikle iyonik, hidrofobik ve/veya hidrofilik bağlanmalar eş zamanlı olarak işlev görür. Bu çoklu etkileşim yapısı, MMC'yi hem örnek hazırlama hem

de iyonlaşabilir ve nötr bileşenler içeren karmaşık biyolojik örneklerin analizi için ideal bir yöntem hâline getirir. MMC kolonları, iyon değişim kolonlarına alternatif olarak geliştirilmiştir ve özellikle biyolojik örneklerde doğrudan enjeksiyon yoluyla saflaştırma yapılabilmesine olanak tanınması sayesinde benzersiz avantajlar sunar (Zhang ve Liu, 2016). MMC sistemlerinde analitlerin tutulma süresi; kullanılan tamponun türü, mobil fazdaki organik çözücü oranı, pH ve tuz konsantrasyonu gibi parametreler değiştirilerek kolaylıkla kontrol edilebilir. Bu sistemler, ters fazlı sıvı kromatografi kolonlarında sabit fazdaki yüklü silanol grupları ile güçlü etkileşime giren bazik bileşiklerin ayrılması için oldukça uygundur. Ayrıca MMC kolonları; anyon, katyon, çift yüklü moleküller (zwitteriyonlar) ve nötr bileşikler gibi çok çeşitli türde analitlerin aynı anda ayrılmasını sağlayabilir (Snyder vd., 2010). MMC sistemleri, RPLC'ye kıyasla polar farmasötik maddeleri daha etkin tutabildiği için, analitik ve preparatif biyolojik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir (Zhang ve Liu, 2016).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

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

2.1.1. Karma Mod Sabit Fazların Gelişimi ve Kullanımı

Karma mod kromatografik sabit fazlar, analitlerin sabit faz üzerindeki tutulmasında aynı anda birden fazla etkileşim mekanizmasının etkili olduğu gelişmiş ayırma sistemleri arasında yer almaktadır (Liu ve Pohl, 2008, 2010, 2012; Liu, Pohl, Woodruff ve Chen, 2011; Hinterwirth vd., 2010). Bu tür sabit fazlar, genellikle silika veya polimer esaslı taşıyıcı yüzeylerin üzerine farklı kimyasal özelliklere sahip fonksiyonel grupların yüzeye tutturulması yoluyla elde edilmekte olup; hidrofobik, hidrofilik, iyonik, elektrostatik ya da π - π etkileşimleri gibi çeşitli etkileşim türlerini aynı anda bünyesinde barındıracak şekilde tasarlanmaktadır. Böylece hem polar hem de apolar karakterdeki analitlerin tek bir sistemde yüksek seçicilikle ayrılması mümkün hâle gelir. Karma mod sistemlerde ayırma başarısı, sabit faz ile analit arasında en az iki farklı ve baskın etkileşim türünün aynı anda aktif rol oynamasına bağlıdır. Bu çoklu etkileşim prensibi, özellikle kompleks içerikli numunelerde bulunan bileşiklerin ayırt edici özelliklerine göre seçici tutulmasını sağlayarak, klasik tek modlu fazlarla elde edilemeyen ayırma performansını mümkün kılar. Dolayısıyla bu sabit fazlar, hem alıkonma mekanizmasının çeşitliliğini artırmakta hem de geniş analit spektrumuna sahip örneklerin ayırımında esneklik sunarak modern HPLC uygulamaları için önemli bir alternatif oluşturmaktadır (Zhao vd., 2015).

2.1.1.1. Karma mod sabit fazların sentezinde kullanılan yaklaşımlar

Karma mod sabit fazların üretiminde en kritik adımlardan biri, inorganik silika matrisi ile fonksiyonel organik reaktifler arasında uygun bir bağlayıcı yapı oluşturmaktır. Bu bağlamda, terminal gruplar içeren silan türevleri yaygın olarak kullanılmakta olup; propiltrimetoksisilan (PTMS), 3-aminopropiltrimetoksisilan (APS) (Li vd., 2011), 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPS) (Qiao vd., 2015) ve 3-kloropropiltrimetoksisilan

(CPS) (Sun vd., 2013) gibi reaktifler sıkça tercih edilmektedir. Genel anlamda bu sabit fazların hazırlanmasında üç temel sentetik yaklaşım öne çıkmaktadır.

2.1.1.2. Terminal fonksiyonlu reaktiflerle ön modifikasyon yöntemi

Bu yöntemde, öncelikle organik olarak işlevselleştirilmiş reaktiflerin, terminal grubunda trimetoksisilan içeren PTMS ile tepkimeye sokulması yoluyla trimetoksisilil uç gruplarına sahip yeni organik bileşikler sentezlenir. Ardından bu türevler doğrudan silika yüzeyine tutturulabilir (Aral vd., 2015). Ancak bu süreçte çeşitli ara ürünler oluştuğundan dolayı saflaştırma ve izolasyon aşamaları çoğu zaman zorunlu hâle gelir. Ayrıca, oluşan yeni reaktiflerin çözünürlük karakteristikleri genellikle önceden belirlenemediğinden, uygun çözücü seçimi konusunda sınırlılıklar oluşabilir (Zhang vd., 2014).

2.1.1.3. Silika yüzeyinin ptms ile modifikasyonu sonrası aşılama

Bu yöntemde, silika matrisi öncelikle PTMS ile yüzeysel olarak modifiye edilir ve sonrasında işlevsel gruplar içeren organik reaktifler doğrudan bu yüzeye aşılır. Bu yöntemde en sık kullanılan PTMS türevi APS'tir. Reaktif anhidrit (Li vd., 2011), metil ester (Hu vd., 2013), karboksilik asit (Ray, Takafuji ve Ihara, 2012) veya epoksi (Li vd., 2014) grupları içeren organik moleküller, APS-modifiye silikanın yüzeyine doğrudan bağlanabilir. Bu yöntemin avantajı, yalnızca ilk basamakta susuz koşullara ihtiyaç duyulması nedeniyle daha basit ve uygulanabilir olmasıdır (Zhang vd., 2015).

2.1.1.4. Mps yüzey modifikasyonu ve tıklama tabanlı polimerizasyon

Silika, önce MPS ile modifiye edilir. Daha sonra alil ya da vinil fonksiyonel gruplar içeren organik reaktifler, ya “tiol-en” tıklama reaksiyonu (Qiao vd., 2014) ya da yüzeyden başlatılan radikal zincir transfer polimerizasyonu (Qiu vd., 2012) yoluyla merkaptosilika yüzeyine bağlanır. Bu strateji, ikinci yöntemle benzerlik taşısa da MPS'nin çoklu bağlanma bölgeleri sayesinde daha yüksek yükleme kapasitelerine ulaşabilmektedir. Her bir merkaptogrup, birden fazla reaktifin polimerizasyonuna imkân tanıyarak bağlanma oranını artırır. Ayrıca bu yöntem, klasik alkin-azid Huisgen tıklama kimyasına kıyasla metal iyonu kalıntısı riskini ortadan kaldırarak daha temiz sabit fazlar elde edilmesine olanak tanır (Liu vd., 2012). Bununla birlikte, en önemli

dezavantajı polimerleşme derecesinin hassas şekilde kontrol edilmesinin zorluğudur. Buna ek olarak, merkaptogrup ile alken grupları arasında istenmeyen ekleme reaksiyonları da meydana gelebilmektedir (Shi vd., 2015; Liu vd., 2012).

2.1.2. Karma Mod Sabit Fazların Yapısal Özellikleri

Karma mod kromatografik sabit fazlar, genellikle birden fazla türde kimyasal grubu aynı yapıda birleştirerek çok yönlü etkileşim mekanizmaları oluşturacak biçimde tasarlanmaktadır. Bu sabit fazlar, farklı alıkonma modlarını bir araya getirerek hem seçiciliği artırmakta hem de geniş analit yelpazesine sahip karmaşık numunelerde yüksek ayırma verimliliği sağlamaktadır. Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) mekanizmasına uygun olarak çalışan fazlarda, yüzey modifikasyonu genellikle polar fonksiyonel gruplar aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu tür fazlarda yaygın olarak kullanılan gruplar arasında polar amid bileşenleri (Aral vd., 2015; Ohya vd., 2015), anilin türevleri (Iverson ve Lucy, 2014), kuaterner amonyum iyonları (Aral vd., 2015; Li vd., 2011; Liu vd., 2015; Qiao vd., 2015), amino asit yapıları (Li vd., 2011), çeşitli polisakkaritler (Qiao vd., 2014; Sun vd., 2013) ve hidroksil içeren fonksiyonel gruplar (Wang vd., 2015) yer almaktadır. Ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) modunda çalışan sabit fazlar ise daha çok apolar/hidrofobik karakterde gruplar içermektedir. Bu yapıların tasarımında kullanılan bileşenler arasında uzun zincirli alkan grupları (Qiao vd., 2015; Wang vd., 2015; Cai vd., 2012), aromatik özellik gösteren imidazol halkaları (Liu vd., 2015; Sun vd., 2014), azobenzen türevleri (Qiu vd., 2013) ve boşluklu yapıya sahip kaliks (Zhao vd., 2014) aren sistemleri (Hu vd., 2013; Lu vd., 2014) sıklıkla tercih edilmektedir. İyon değişim kromatografisi (IEC) özelliklerine sahip karma mod sabit fazlarda ise, genellikle yüzeyde bazik karakterli üçüncül amin veya kuaterner amonyum iyonları (Jin vd., 2015; Sun vd., 2011; Lämmerhofer vd., 2008; Zimmermann vd., 2015) ya da asidik karboksilik gruplar (Cai vd., 2012; Yang vd., 2015) bulunur. Bu gruplar, iyonik yük dengesine bağlı olarak analit ile sabit faz arasında elektrostatik çekim oluşturarak alıkonmayı sağlar. Özetle, karma modlu sabit fazlar genellikle birden fazla alıkonma mekanizmasını etkin hâle getirmek amacıyla farklı fonksiyonel gruplar ile modifiye edilir. Böylece hem hidrofilik hem hidrofobik hem de iyonik özellikteki analitler için esnek ve güçlü bir ayırma sistemi sunulmuş olur.

2.1.2.1. Parçacık tabanlı karma mod sabit faz sistemleri

Son yıllarda, parçacık bazlı karma mod sabit fazlara yönelik literatürde önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Bu tür sabit fazların büyük çoğunluğu, kimyasal dayanıklılığı, yüksek mekanik kararlılığı ve iyi yüzey modifikasyon potansiyeli nedeniyle silika jel esaslı malzemeler kullanılarak geliştirilmiştir. Kullanılan ayırma modlarına göre sınıflandırıldığında, bu fazlar üç ana kategoride değerlendirilebilir:

- Ters faz / hidrofilik etkileşimli fazlar (RPLC/HILIC)
- Ters faz / iyon değişim fazları (RPLC/IEC)
- Hidrofilik etkileşimli / iyon değişim fazları (HILIC/IEC)

Bu yapıların her biri, belirli analit türlerine ve ayırma koşullarına uygun şekilde çoklu etkileşim mekanizmaları sunarak HPLC uygulamalarında geniş kapsamlı çözümler sunmaktadır.

2.1.2.2. RPLC/HILIC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi

Ters fazlı sıvı kromatografi (RPLC) çoğunlukla orta ve zayıf polariteye sahip analitlerin ayırımı için tercih edilirken, hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC) yüksek polar bileşiklerin ayırımı için daha uygundur. Bu bağlamda, RPLC ve HILIC mekanizmalarını aynı anda barındıran karma mod sabit fazlar geliştirilmiştir (Gargano vd., 2013). Amino asit ve peptit modifikasyonuna dayalı silika bazlı fazlar, RPLC/HILIC karma mod sabit fazlarının geniş bir sınıfını oluşturur (Ray, Takafuji ve Ihara, 2012). Örneğin, Zhang ve çalışma arkadaşları (Li vd., 2011), yüzeyine poli-L-lizin aşılansmış bir silika sabit faz geliştirmiştir. Bu faz, hem terminal amin grupları gibi polar yapılara hem de alkil zincirlerinden kaynaklanan hidrofobik karaktere sahiptir ve böylece hem RPLC hem de HILIC modlarında etkin ayırma imkânı sunar. Bu yapı, fenolik bileşikler, anilinler ve hidrofilik yapılar için başarılı ayırma sağlamıştır. Sürfaktin, yedi amino asit ve bir β -hidroksi yağ asidinden oluşan döngüsel bir heptapeptit olup, amfifilik yapısı nedeniyle RPLC/HILIC modlarında kullanılabilecek sabit fazların geliştirilmesinde değerlidir. Kuroda ve ekibi (Ohyama vd., 2014), surfaktin modifikasyonu ile elde edilen silika fazı, aminosilika ve karboksil grupları arasında amid bağı oluşturarak hazırlamıştır. Bu

yöntem, biyosümfaktanların kullanıldığı ilk sabit faz uygulaması olup, devamında poli(L-laktik asit) ile modifiye edilen alternatif bir yapı da geliştirilmiştir (Ohyama vd., 2015). Söz konusu yapı, karboksil gruplarının π - π etkileşim kabiliyetiyle, özellikle polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) ayrımı için etkili bulunmuştur. Glikozit yapılar da karma mod sabit faz geliştirme stratejilerinde yer almıştır. Liang ve arkadaşları (Liang vd., 2015), rebaudioside A ile modifiye edilmiş sabit fazları "tiol-en" tıklama kimyasıyla hazırlamış ve bu yapıların yüksek hidrofiliklik ve alternatif seçicilik sunduğunu göstermiştir. Bu sabit fazlar, bitkisel kökenli oligosakkaritlerin ayrımında üstün performans göstermiştir. Son dönemde, iyonik sıvıların (IL) sabit faz modifikasyonunda kullanımı yaygınlaşmıştır. Zhang ve arkadaşları (Li vd., 2011), imidazolin tipi iyonik sıvılarla modifiye ettikleri sabit fazları hem aromatik bileşiklerin hem de suda çözünen vitaminlerin ayrımı için geliştirmiştir. Benzer şekilde, 1-vinil-3-oktilimidazolyum L-laktat'ın merkaptosilika yüzeyine aşılınmasıyla, Trichoderma gibi mikroorganizmaların sekonder metabolitlerinin ayrımı için uygun bir faz oluşturulmuştur (Qiao vd., 2015). Bu kolonlar, ticari C8 kolonlara kıyasla daha yüksek seçicilik sunarak 10'a yakın farklı bileşiği başarıyla ayırabilmiştir. Ayrıca, imidazolyum gömülü N,N-dimetilaminopropil fonksiyonlu silika sabit fazlar geliştirilerek, hem polar hem de apolar yapıların ayrımı gerçekleştirilmiştir. Bu fazlar, nükleozid ve baz ayrımı için 58.000 plaka/m verimliliğe ulaşmıştır (Liu vd., 2015). Monokatyonik yapıya kıyasla dikasyonik ve trikatyonik iyonik sıvılar, daha geniş fizikokimyasal özellik aralığı sunmakta ve çoklu yük birimleriyle etkileşim kapasitesini artırmaktadır. Bu kapsamda Shi ve çalışma arkadaşları, trikatyonik iyonik sıvılarla modifiye edilmiş silika sabit fazlar geliştirerek flavonoidlerin ayrımı için yüksek verimlilik elde etmiştir. Flavonoidler, benzer yapıya sahip çok sayıda glikozit ve şeker süstitüsü içerdiğinden, bu yapıların ayrımı geleneksel kolonlarda oldukça zordur. Yeni geliştirilen faz, özellikle soya fasulyesi ekstraktlarından elde edilen flavonoidlerin ayrımında üstün performans göstermiştir. İmidazolyum bazlı iyonik sıvı içeren fazların ayırt edici özelliklerinden biri, düzlemsel ve şekil seçiciliğidir. Örneğin, 1-vinil-3-oktilimidazolyum L-laktat modifiyeli faz ile o-terfenil, m-terfenil ve trifenilen 6 dakika içinde yüksek çözünürlükle ayrılabilmiştir (Qiao vd., 2015). Aynı ayırım, ticari C8 kolonla gerçekleştirildiğinde yalnızca sınırlı bir ayırım sağlanabilmiştir. Benzen türevleri de karma mod sabit fazların geliştirilmesinde değerlendirilmektedir. Qiu ve ekibi (Qiu vd., 2013), sülfonik azobenzen grubu ile fonksiyonlandırılmış silika faz tasarlamış ve bu yapıların hem steroid hem de nükleozit bazlarının ayrımı için etkili olduğunu göstermiştir. Liu ve arkadaşları (Lu vd., 2014) ise kaliks[4]aren-türevli kitosan modifikasyonu ile

silika bazlı bir sabit faz geliştirerek, monosüstitüe benzenlerin ve fenollerin ayırımında başarılı sonuçlar elde etmiştir. Diğer yandan, Iverson ve Lucy (Iverson ve Lucy, 2014), anilin modifikasyonuna sahip gözenekli grafit karbon (PGC) matrisli bir sabit faz oluşturarak, HILIC ve zayıf RPLC alıkonma modlarını birlikte sunan hibrit bir yapı ortaya koymuştur. Bu kolon, 0–14 pH aralığında stabil çalışabilmekte ve yüksek pH kararlılığı ile dikkat çekmektedir. Shi ve arkadaşları (Wang vd., 2015), çift fonksiyonlu reaktifler ile modifiye edilmiş (C18-Diol) sabit fazlar geliştirmiştir. Bu yapılar, %100 su bazlı mobil faz koşullarında çalışabilmekte ve özellikle bazik analitlerin ayırımında pik şeklini iyileştirerek üstün ayırım kabiliyeti sunmaktadır.

2.1.2.3. RPLC/IEC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi

İyon değişim kromatografisi (IEC), iyonik bileşiklerin ayrılması için yaygın olarak kullanılırken, RPLC/IEC modunun kombinasyonu özellikle proteomik araştırmalar için potansiyel sunmaktadır (Qiao vd., 2011). Genellikle RPLC/IEC sabit fazlarının hazırlanmasında, RPLC yüzeylerine elektrostatik etkileşim sağlayan iyonik gruplar eklenir. RPLC/anyon değişim kromatografisi (AEX) ve RPLC/kasyon değişim kromatografisi (CEX) bazlı sabit fazlar bu doğrultuda geliştirilmiştir. İmidazol türevleri, RPLC/AEX sabit fazlarının hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilmektedir. Liu ve arkadaşları (Sun vd., 2009), terminal trimetoksisilil grubu içeren poli(1-alilimidazol)'ü sentezlemiş ve doğrudan silika yüzeyine aşılamıştır. Bu yapı, imidazol azotu ile silanol grupları arasında hidrojen bağları oluşturarak, sterik engel sayesinde daha iyi pik simetrisi sağlamıştır. Bu sabit faz ayrıca AEX modunda inorganik anyonların ayırımı için kullanılmıştır. Aynı araştırma grubu, benzimidazol ile modifiye edilmiş sabit fazı da sentezleyerek kolon verimliliğini 67.200 plaka/m'ye ulaştırmıştır (Sun vd., 2013). Luo ve çalışma arkadaşları (Sun vd., 2014), dikatyonik imidazolyum iyonik sıvı (IL) kullanarak RPLC/AEX sabit fazı geliştirmiştir. Bu yapı, klasik monokatyonik iyonik sıvılara kıyasla daha fazla etkileşim bölgesi sunmuş ve PAH'lar, anilinler ile organik ve inorganik anyonların ayırımı için etkinlik sağlamıştır. Kaliksaren bazlı fazlar da RPLC/AEX uygulamalarında dikkat çekmektedir.

Zhao ve arkadaşları, L-fenilalanin metil esterle fonksiyonlandırılmış kaliks aren modifiye silika fazı geliştirerek, kalıntı silanol etkisini baskılamış ve bazik bileşikler için üstün pik simetrisi elde etmiştir (Zhao vd., 2014). Bu yapı, melaminin bebek

mamasındaki belirlenmesi gibi spesifik analizlerde iyon çifti reaktifi gerekmeden kullanılabilmiştir. Aynı grupta, bis(tetraoksakaliks aren) triazin modifikasyonu ile hazırlanan yapı, çoklu etkileşim mekanizmaları sayesinde flavonoidler ve benzen türevleri gibi geniş bir bileşik grubunun ayrımını mümkün kılmıştır (Zhu vd., 2013; Hu vd., 2014). Lämmerhofer ve arkadaşları (Nogueira vd., 2005; Lämmerhofer vd., 2011), N-undecenil-3-aminoquinuclidine türevli silika faz geliştirerek hem RPLC hem de AEX etkileşimlerini tek bir yapıda toplamıştır. Bu fazlar, peptitlerin yan ürünleriyle birlikte saflaştırılmasında, vitamin ve oligonükleotidlerin ayrılmasında etkili olmuştur (Dabre vd., 2011; Zimmermann vd., 2014). Ek olarak, alilsülfonik asit ve 3-butenolik asit gibi fonksiyonlarla katyonik ve anyonik uç gruplarla modifiye edilmiş sabit fazlar yapılarak, MS uyumlu düşük iyonik güçte analiz mümkün hale getirilmiştir. Bai ve arkadaşları (Zhao vd., 2015), 3-dietilamino-1-propin fonksiyonlu silika yüzeyi geliştirerek, yeni bir çevrimdışı 2D-LC sisteminde yüksek geri kazanımlı protein ayrımı elde etmişlerdir. Liu ve ekibi (Jin vd., 2015), XCharge C8SAX sabit fazı kullanarak *Lycium ruthenicum* Murr. bitkisinden altı farklı antosiyanini saflaştırmış ve bunlardan beşinin ilk kez tanımlandığını bildirmiştir. RPLC/CEX sabit fazları da karışık mod uygulamaları arasında yer almaktadır. Carr ve arkadaşları (Zhang ve Carr, 2011), polistiren ağı ile modifiye silika faz geliştirerek, 43 bazik ilacın ayrımında farklı seçicilik profili sunmuştur. Bu yapı, polimer ağ yapısı sayesinde yüksek hidrolitik stabilite göstermiştir. Zhang ve arkadaşları (Cai vd., 2012), OTS ve 3-siyanopropiltriklorosilan kullanarak karboksil içeren bir RPLC/CEX sabit fazı hazırlamıştır. Bu faz, RPLC/CEX-RPLC 2D-LC sistemlerinde başarılı protein ve peptit ayrımlarına olanak sağlamıştır. Ayrıca, interferon- γ saflaştırılması için mikrokürelere dayalı çift fonksiyonlu fazlar da geliştirilmiştir (Yang vd., 2015).

2.1.2.4. HILIC/IEC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesi

İlk kez Hodges ve arkadaşları (Zhu vd., 1991), HILIC sabit fazlarının aynı zamanda iyon değişim kromatografisi (IEC) alıkonma mekanizmasına da sahip olabileceğini ortaya koymuşlardır. Bu bulgunun ardından, HILIC/IEC kavramı geliştirilmiş ve polar/hidrofilik bileşiklerin ayrılması amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. HILIC/IEC, geleneksel kromatografik modlara etkili bir tamamlayıcı nitelik taşımaktadır. Yang ve çalışma arkadaşları, HILIC/AEX karma mod sabit fazlarının geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu kapsamda, alkin-azid Huisgen reaksiyonu

(Liu vd., 2012) aracılığıyla propargilaminin azid-silika yüzeyine aşılmasıyla amino modifiyeli bir sabit faz hazırlanmıştır. Bu faz, serbest amino grubu ve triazol halkası sayesinde, geleneksel amino fazlara göre daha üstün performans sergileyerek inorganik anyonların ayırımında yüksek kolon verimliliği (71.000–74.000 plaka/m) sağlamıştır. Ayrıca, bu yapı polar nükleozidler, organik asitler ve bazların ayırımında da etkili olmuştur. Aynı araştırma grubu, asparagin temelli amid modifikasyonu ile benzer bir yapı daha geliştirerek alkin-silika üzerine başarılı bir şekilde tutturmuştur (Shen vd., 2013). Shi ve çalışma arkadaşları (Qiao vd., 2014), glukaminyum bazlı iyonik sıvıları (IL) kullanarak yenilikçi bir HILIC/AEX sabit fazı tasarlamışlardır. N,N-dialil-N-metil-D-glukaminyum bromür bileşiği, alil bromür ve N-metil-D-glukaminin reaksiyonu ile sentezlenmiş, ardından doğrudan merkaptosilika yüzeyine bağlanmıştır. Bu yapıda yer alan kuaterner amonyum grubu ve glikoz halkası, sabit faza yüksek hidrofiliklik kazandırmış ve sitidin ayırımı için 80.000 plaka/m gibi yüksek bir verimlilik sağlanmıştır. Ayrıca, 16 farklı flavonoid ile çeşitli nükleozid fosfat bileşiklerinin ayırımı da başarıyla gerçekleştirilmiştir. Guo ve arkadaşları (Shen vd., 2013), doğal olarak hidrofilik bir tripeptit olan glutatyonu kullanarak, “tiyol-en” tıklama kimyasıyla vinil-silika yüzeyine bağlamışlardır. Geliştirilen bu sabit faz, serbest amino ve karboksil grupları sayesinde HILIC, CEX ve HILIC/CEX modlarında yüksek ayırma verimliliği göstermiştir. Özellikle bazik kitooligosakkaritler, nötr fruktosanlar ve asidik karragenan oligosakkaritlerin ayırımı başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Fruktosanların ayırımında, polimerizasyon derecesi 2 ile 48 arasında değişen bileşenlerin keskin ve simetrik piklerle tanımlanabildiği gözlemlenmiştir.

2.1.2.5. Çoklu modlarda çalışabilen karma sabit fazların geliştirilmesi

Ihara ve arkadaşları (Qiu vd., 2012), imidazolyum temelli iyonik sıvılardan elde ettikleri monomeri iki aşamalı bir sentez ile hazırlayarak, silika yüzeyine poli(iyonik sıvı) kaplı bir sabit faz kazandırmıştır. Akrilol klorür ve 11-bromo-1-undekanol başlangıç maddeleriyle yürütülen bu süreç sonucunda, katyonik imidazolyum birimi, karboksil fonksiyonları ve hidrofobik alkil zincirlerinden oluşan çok yönlü etkileşim bölgeleri barındıran bir yapı elde edilmiştir. Bu yapı sayesinde, RPLC, HILIC ve AEX modlarında yüksek seçicilikle ayırım gerçekleştirilebilmiştir. Chen ve arkadaşları (Li vd., 2014), ardışık amin-epoksi reaksiyonları yoluyla sentezledikleri dendritik polimer yapısını silika yüzeyine tutturarak çoklu etkileşim sağlayan yeni bir sabit faz tasarlamışlardır. Kuaterner

amonyum grupları, fenil halkaları ile hidroksil ve eter fonksiyonları sayesinde, bu yapı RPLC, HILIC ve AEX modlarında çalışabilmekte ve hem iyonik hem de polar bileşiklerin ayırımında başarılı sonuçlar vermektedir.

Feng ve arkadaşları (Cheng vd., 2013), dietil vinilfosfonatın merkaptopropiltrietoksisilan ile reaksiyonundan elde ettikleri ara ürün ile silika yüzeyini modifiye ederek fosfat ester içeren yeni bir sabit faz (PES) geliştirmiştir. PES sabit fazı, kompleksleşme ve hidrofobik etkileşimleri temel alarak hem fenolik bileşiklerin hem de nükleobaz ve nükleozidlerin ayırımında üstün performans sergilemiştir. Geliştirilen kolon, RPLC ve HILIC koşullarında yüksek verimlilik göstermiştir. Luo ve araştırma grubu (Sun vd., 2014), kinolinyum tabanlı iyonik sıvı içeren sabit faz hazırlayarak, RPLC, AEX ve NPLC modlarında çalışabilecek yeni bir yapı geliştirmiştir. Bu sabit faz, kinolinin 3-kloropropil silika yüzeyine tek adımda bağlanmasıyla elde edilmiştir. İmidazolyum türevleriyle karşılaştırıldığında, daha büyük iyonik boyutu sayesinde daha güçlü π - π etkileşimi sağlayan bu yapı, organik bileşiklerin (örneğin PAH'lar, fenoller, parabenler) yanı sıra suda çözünebilen inorganik anyonların da başarılı şekilde ayrılmasını mümkün kılmıştır. Yu ve ekibi (Zhou vd., 2015), N-ferrosenil(benzoil)amino asit esterini kullanarak, doğrudan aminosilikaya bağlanan bir sabit faz üretmiştir. Bu faz, RPLC ve NPLC modlarında çoklu etkileşim mekanizmalarıyla (hidrofobik transfer, asit-baz etkileşimi, π - π istifleme, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimleri) yüksek ayırma kabiliyeti göstermiştir. Geliştirilen yapı, özellikle fenoller, aromatik bileşikler ve pestisitlerin, özellikle de sebze örneklerindeki organofosforlu pestisit kalıntılarının etkin şekilde ayrılmasında başarıyla kullanılmıştır.

2.2. Karma Modlu Sıvı Kromatografisi İçin Geliştirilen Sabit Faz Türleri

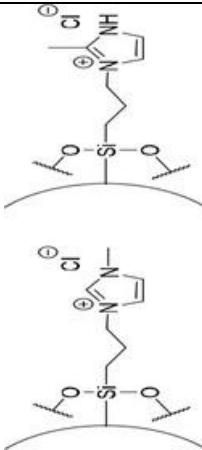
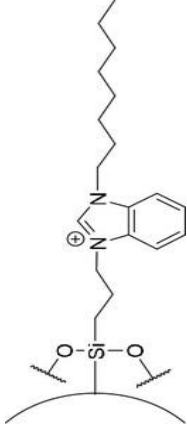
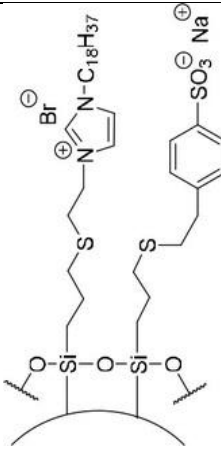
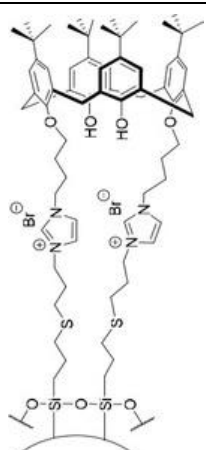
2.2.1. Silika bazlı karma modlu sabit fazların sınıflandırılması

Karma modlu sıvı kromatografisi (Mixed-Mode Chromatography, MMC) sistemlerinde kullanılan sabit fazların çoğu, kimyasal olarak işlevselleştirilmiş silika partikülleri üzerine inşa edilmiştir. Silika temelli materyaller, sahip oldukları geniş spesifik yüzey alanı, yüksek mekanik dayanım, kolay işlenebilirlik ve fonksiyonel grup bağlanmasına uygun silanol ($-\text{Si}-\text{OH}$) yüzey yapısı sayesinde kromatografik uygulamalarda yaygın biçimde tercih edilmektedir. Bu yüzeylere tutturarak edilen çeşitli fonksiyonel gruplar, hem polar hem apolar hem de iyonik karakterde etkileşimlere olanak

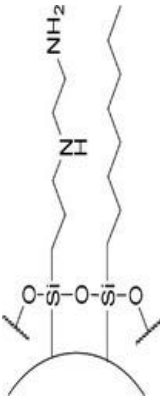
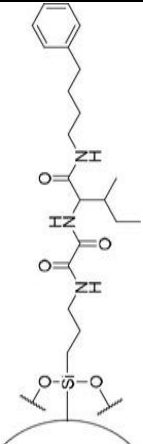
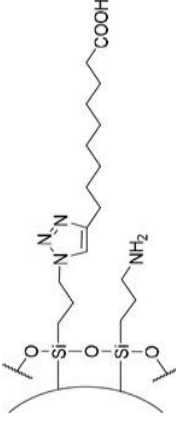
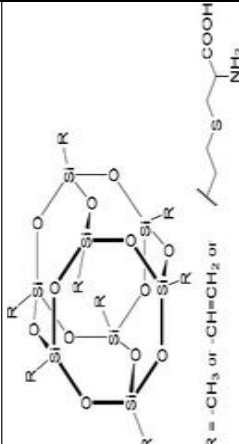
sağlayarak, aynı anda birden fazla ayırma mekanizmasını aktive edebilen hibrit sabit fazların geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

Karma modlu sabit fazlar, tek bir kromatografik mekanizmayla açıklanamayacak derecede kompleks alıkonma davranışı sergilerler. Bu sabit fazlar üzerinde, elektrostatik çekim/itme kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimler ve yüzey kompleksleşmeleri gibi çoklu kuvvetler sinerjik biçimde etki eder. Bu sayede, birbirine yakın polariteye ya da yapıya sahip analitlerin yüksek çözünürlükte ayrımı mümkün hâle gelir. Özellikle biyolojik örnekler, ilaç etken maddeleri, çevresel kirleticiler ve metabolitler gibi karmaşık yapılı hedef analitlerin seçici ayrımında bu sabit fazlar önemli avantajlar sunar.

Silika yüzeyinin kimyasal olarak modifikasyonu genellikle kovalent bağlanma yoluyla gerçekleştirilir ve bu süreçte farklı yapısal özelliklere sahip ligandlar yüzeye sabitlenir. Bu ligandlar, sabit fazın toplam polaritesini, yüzey yük yoğunluğunu ve etkileşim kabiliyetini belirleyen temel parametrelerdir. Silika bazlı karma modlu sabit fazlar, yüzeye bağlanan ligandların doğasına, bağlanma topolojisine, işlevsel grup sayısına ve dağılımına bağlı olarak çeşitli sınıflara ayrılmaktadır.

Tablo 2.1: Silika bazlı karma modlu sabit fazların sınıflandırılması					
Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
1-Metilimidazolyum veya 2-Metilimidazolyum		Element analizi, FTIR	Nükleositler,nükleobazlar,, Suda Çözünür Vitaminler, Sülfonamidler, Anyonlar Sakkaritler, İnorganik	HILIC/IEC	(Yang vd.,2010)
1-Oktilenzimidazolyum		Element analizi TGA, FTIR	Polisiklik aromatik Hidrokarbonlar, Mono-sübstütüe edilmiş benzen, Anilinler, Fenoller, İnorganik ve organik iyonların türevleri	RP / IEC / hidrojen bağı, π π istifleme	(Jiang vd., 2010)
1-Oktadesilimidazolyum ve Fenil sülfonat		Element analizi FTIR,TGA	Alkilbenzenler ve konumsal izomerler, Nükleositler/nükleik asit bazları, Flavonoidler, Küçük asidik ve bazık çözünen maddeler	RP / HILIC / IEC	(Ren vd., 2018)
Calixarene-imidazolyum		Element analizi, IR,TGA,	Alkilbenzenler, PAH'lar, Fenoller,Anilinler	HILIC / IEC	(Hu vd., 2016)

Tablo 2.1’ in devamı...					
Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
Benzile azot- köprülü kaliktriadin		Element analizi, TIR, TGA	Monosüstittüs benzenler Disüstittüs aromatikler, İnorganik anyonlar	RP / Hidrojen bağı , π - π etkileşimleri, Makro döngü barındırma	(Zhao vd., 2010)
Sikloforruktan (CF6) 6-benzoik asit türevi		Element analizi	Asit analogları, β -blokerler, Fnoller	İlaçlar, Nükleositler, HILIC / (IEC) / (RP)	(Wang vd., 2016)
Tris(2-aminoetil)amin ve 3-fenoksi benaldehit		Element analizi FTIR TEM TGA	Klorofenollerin SPE (Kati Faz Ekstraksiyonu)	RP / HILIC	(Gao ve Wei, 2010)

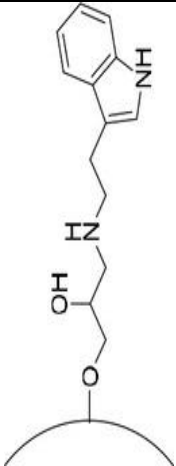
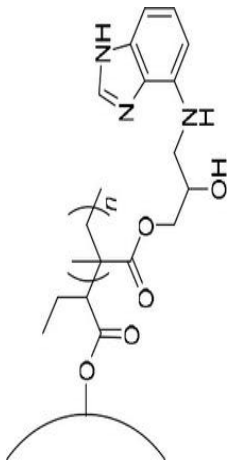
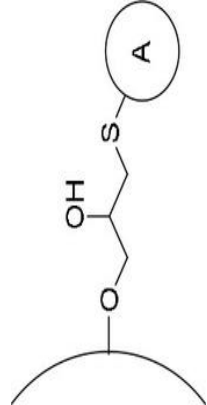
Tablo 2.1' in devamı...					
Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
Amino grubu (-NH ₂) ve Oktıl grubu (-C ₈ H ₁₇)		-	Bozulmamış (doğal) proteinler Oksitlenmiş protein formları Rekombinant insan büyüme hormonunun (rhGH) azaltılmış formları	EC (Ion Exchange Chromatography İyon Değişim Kromatografisi)	(Ding vd., 2017)
L-izolösin ve 4-fenilbutilamin		FTIR, SEM, Azot adsorpsiyon analizleri, ¹³ C-NMR	Nükleositler/nükleotid, Fenoller, Anilinler	RP/HILIC/π-π etkileşimleri/Hidrojen bağı/Dipol-Dipol etkileşimleri	(Aral vd., 2017)
Karboksilik, triazol, Oktametilene, Amino grupları		FTIR	Bazık, Nötr ve asidik ilaçların katı faz ekstraksiyonu (SPE)	Ters faz (RP), İyon değişim (IEC)	(Jin vd., 2018)
Sistein, vinil, Metil ile işlevselleştirilmiş silseskioksan		Element analizi	Alkilbenzenler, Nükleositler ve nükleik asitler, Çin bitkisel tıbbının bileşenleri	RP/HILIC	(Lü, 2017)

2.2.2. Polimerik karışık modlu sabit fazlar

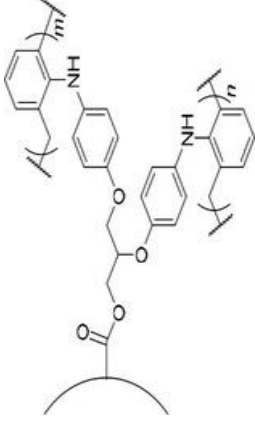
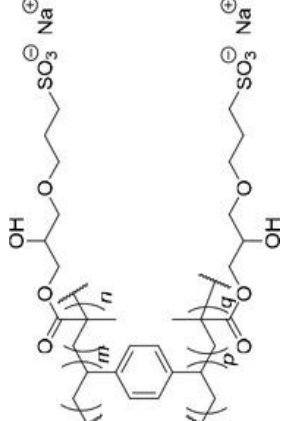
Polimerik karışık modlu sabit fazlar, sıvı kromatografi sistemlerinde kompleks matrislerden gelen çok çeşitli bileşiklerin etkin şekilde ayrılması amacıyla geliştirilen, çok fonksiyonlu ileri seviye durağan faz materyalleridir. Bu fazlar, çoğunlukla fonksiyonel monomerlerin uygun oranlarda çapraz bağlayıcı ajanlar (örneğin divinilbenzen, etilen glikol dimetakrilat) ile radikalik polimerizasyon yoluyla oluşturduğu üç boyutlu, ağ yapılı bir polimerik matrise sahiptir.

Polimerik yapılar, konvansiyonel silika bazlı fazlara kıyasla daha geniş pH aralığında (genellikle 1–13) kararlılık gösterir ve ayrıca kimyasal direnç, termal stabilite ve mekanik dayanıklılık bakımından da üstün özellikler sergiler. Bu yapılar üzerine hidrofobik (örneğin C₈, C₁₈ zincirleri), iyonik (örneğin sülfonik asit, kuaterner amin), hidrojen bağı yapıcı (örneğin üre, amid) veya zwitteriyonik (örneğin betain türevleri) gruplar kovalent olarak yüzeye tutturulur. Böylece sabit faz, aynı anda birden fazla ayırma mekanizmasını ters faz (RP), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC), iyon değişimi kromatografisi (IEC), iyon-çifti etkileşimi ve π - π konjugasyonları aktif hâle getirebilir. Ayrıca, bu fazlar yüksek porozite ve geniş yüzey alanına sahip olmaları sayesinde, difüzyon sınırlamalarını minimize eder ve özellikle yüksek akış hızlarında bile etkin kütle transferine imkân tanır. Bu da daha kısa analiz süreleriyle yüksek ayırma kapasitesi elde edilmesini sağlar. Sentetik kontrollere açık olmaları, polimerik sabit fazların tasarımında önemli bir avantajdır. Fonksiyonel grupların yüzey yoğunluğu, dağılımı ve faz içi etkileşim gücü moleküler düzeyde ayarlanabilir. Bu sayede hedeflenen analit grubu için özel etkileşim alanları oluşturularak analitik seçicilik ve ayırma çözünürlüğü optimize edilebilir.

Özellikle ilaç etken maddeleri, metabolitler, polipeptitler, fosfopeptitler, organik asitler ve çevresel kirleticiler gibi bileşiklerin analitik çözümlemesinde, polikapasiteli karma mod sabit fazların çok yönlü ayırma kapasitesi, onları üstün kılmaktadır. Ayrıca biyolojik sıvılar ve kompleks örnek matrisleri gibi zorlu analizlerde, matriks etkisinin azaltılması ve seçici alıkonma profili oluşturulması açısından kritik bir rol oynarlar.

Tablo 2.2: Polimerik karışık modlu sabit fazlar					
Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
Triptamin modifiye agaroz		Titrasyon analizi	Rekombinant insan serum albümini (rHSA)	HCIC	(Wu vd., 2016)
5-Poliye bağlanmış aminobenzimidazol (glisidil metakrilat)		-	İnsan IgG	HCIC	(Tong vd., 2016)
Protein modifiye dekstran aşılı agaroz		Konfokal lazer Tarama mikroskobu Atomik kuvvet mikroskobu	İnsan IgG	HCIC	(Zhao vd., 2017)

Tablo 2.2'nin devamı...

Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
Diazaresin modifiye gözenekli poli (Glisidilatmetakrilat-ko-divinilbenzen) mikropartiküller		Azot adsorpsiyon analizi, FTIR, SEM, Optik mikroskopi,	Benzen analogları	RP/HILIC	(Yu vd., 2017)
Poliye bağlı sülfonik asit (Glisidil metakrilat-ko-divinilbenzen		Element analizleri, FTIR, TEM, Azot Adsorpsiyon Analizi	N3-metiladenin, N3-etiladenin SPE ve İdrarda N7-etilguanin	RP/HILIC/IEC	(Hu vd., 2018)

2.2.3. Hibrit karma modlu sabit fazlar

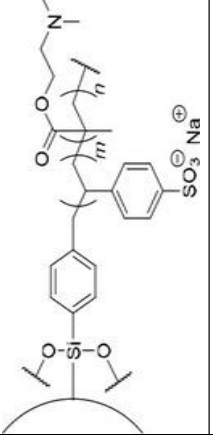
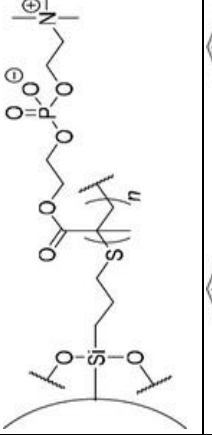
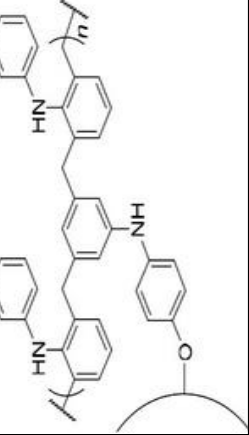
Hibrit karma modlu sabit fazlar, sıvı kromatografi uygulamalarında hem silika hem de organik polimer yapıların avantajlarını bir araya getiren ileri düzey durağan fazlardır. Bu fazlar, genellikle organik-inorganik hibrit destek materyalleri kullanılarak sentezlenir. En yaygın örneklerden biri olan bridged ethylene hybrid (*BEH*) yapılar, silika iskeletine organosilan türevlerinin kovalent bağlanmasıyla oluşturulur. Bu yapı sayesinde sabit faz, hem mekanik dayanıklılık hem de geniş pH aralığında kimyasal stabilite kazanır.

Hibrit sabit fazlar, klasik silika bazlı fazların hidrolitik kararsızlık ve dar pH aralığı gibi sınırlamalarını ortadan kaldırırken, yüzey modifikasyonları aracılığıyla birden fazla ayırma mekanizmasının aynı platformda çalışmasına olanak tanır. Bu fazlar üzerine hidrofobik zincirler (örn. C₁₈), iyonik gruplar (örn. -SO₃H, -NR₃⁺), hidrojen bağı yapıcı fonksiyonlar veya zwitteriyonik yapılar yüzeye tutturulabilir. Bu sayede ters faz (RP), hidrofilik etkileşim (HILIC), iyon değişimi (IEC) ve π - π etkileşimleri gibi mekanizmalar aynı sabit faz üzerinde eşzamanlı ya da ardışık olarak işlev görebilir.

Ayırma kapasitesi ve seçicilik, yüzeye tutturulan fonksiyonel grupların yüzey üzerindeki dağılımı, yoğunluğu ve mekânsal yerleşimine bağlıdır. Bu nedenle, hibrit sabit fazların üretiminde çok aşamalı yüzey mühendisliği yöntemleri ve hassas kontrollü modifikasyon protokolleri tercih edilir. Ayrıca, bu fazlar yüksek sıcaklıklarda (≥ 60 °C) ve geniş bir pH aralığında (yaklaşık 1–12) çalışma olanağı sunarak biyolojik örneklerin ve karmaşık matrislerin analizi için uygun hale gelir.

Bunlara ek olarak, hibrit yapılı sabit fazlar düşük taneler arası basınç farkı, yüksek yüzey homojenliği ve küçük partikül boyutu sayesinde UHPLC (Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) sistemlerinde yüksek verimli analizlerin gerçekleştirilmesine imkân tanır. Geliştirilen yeni hibrit fazlarda, grafen oksit, zirkonya, iyonik sıvı grupları veya organik-inorganik kompozit bileşenlerle yapılan modifikasyonlar, elektrostatik ve π - π etkileşimleri yoluyla çok yönlü alıkonma mekanizmaları sağlayarak daha yüksek seçicilik ve ayırma verimliliği sunmaktadır.

Tablo 2.3: Hibrit karma modlu sabit fazlar

Sabit Fazın Ligan(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrma Mekanizması	Kaynakça
Poli (1-(2-amino-2-oksoetil)-3-vinylimidazolium)		Element analizi, FTIR, TGA	Nükleositler, Nükleik Asit bazları, Suda çözünen vitaminler, saponinler, Fenoller, Anilinler	RP/HILIC	Wang vd., 2016)
Poli(4-stirenülfonat-ko-dimetilaminoetil metakrilat)		Element analizi, FTIR, SEM, XPS, TGA	β -agonistler, Nükleositler,	HILIC/IEC	(Bo ve Wei, 2017; Bo vd.,2017)
Poli (2-metakriloyloksietil fosforilkolin		Element analizi XPS	Nükleositler, Puerarin, Yumurta akındaki proteinler	HILIC/IEC	(Xiong vd., 2018)
Diazoresinler		FTIR, SEM, TGA,	Benzen analogları, Organik asitler, Fullerenler,C60,C70	RP/HILIC/ π - π Etkileşim	(Cong vd., 2017)

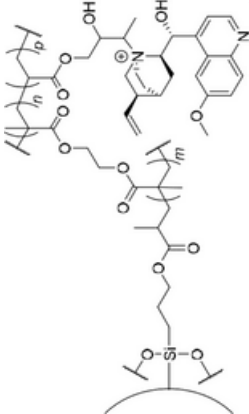
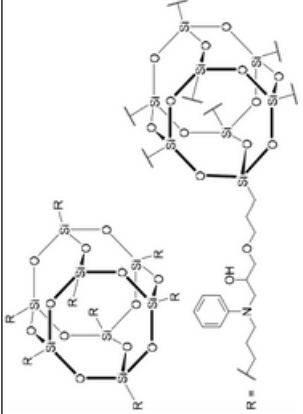
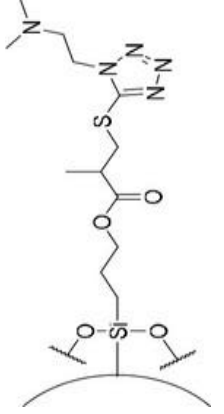
2.2.4. Monolitik karma modlu durağan fazlar

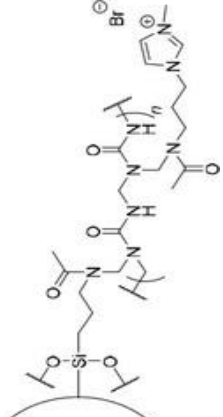
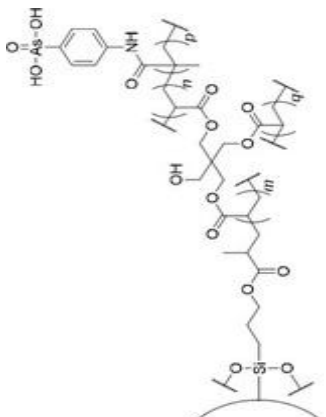
Monolitik karma modlu sabit fazlar, sıvı kromatografisinde yüksek hızda ve verimli ayırma sağlayan, gözenekli ve sürekli bir iskelet yapısına sahip ileri nesil durağan faz materyalleridir. Geleneksel partikül dolgulu kolonlardan farklı olarak, monolitik fazlar tek parça halinde sentezlenmiş ve hem makro gözenekli (akış kanalları) hem de mikro gözenekli (yüksek yüzey alanı sağlayan yapılar) bir iç mimariye sahiptir. Bu çift gözenekli yapı, düşük basınç düşüşü ile yüksek geçiş hızlarında çalışmaya olanak tanırken, analit-matris etkileşimleri açısından geniş yüzey alanı sunar.

Karma modlu özellik kazandırmak amacıyla monolitik iskelet, genellikle silika veya organik polimer bazlı yapı üzerine iyonik, hidrofilik, hidrofobik ya da zwitteriyonik grupların kovalent bağlanmasıyla modifiye edilir. Bu modifikasyonlar sonucunda aynı sabit fazda ters faz (RP), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC), iyon değişim (IEC) ve π - π etkileşimleri gibi çoklu ayırma modlarının bir arada çalışması mümkün hale gelir. Ayırma verimliliği, silika yüzeyine tutturulan fonksiyonel grupların kimyasal yapısına, yük dağılımına ve yüzey yoğunluğuna bağlı olarak optimize edilebilir. Monolitik karma modlu fazlar, özellikle biyolojik örneklerde proteinler, peptitler, ilaç metabolitleri ve diğer polar/non-polar bileşiklerin hızlı ve seçici ayrımında öne çıkar. Ayrıca, gözenekli yapıları sayesinde viskoz örneklerin işlenmesinde tıkanma riski minimaldir ve uzun süreli stabilite sunarlar. Bu özellikler, monolitik fazları hem analitik hem de preparatif kromatografi uygulamaları için uygun hale getirir.

Son yıllarda, moleküler baskılanmış polimerler (MIP), iyonik sıvılar, karbon nanoyapılar ve metal-organik kafes (MOF) yapılarla hibritlenen monolitik sabit fazlar geliştirilmiş; bu yapılar sayesinde yüksek seçicilik, hedef analite özgül bağlanma kapasitesi ve çok yönlü etkileşim mekanizmaları elde edilmiştir. Bu gelişmeler, monolitik karma modlu fazların ileri düzey kromatografik uygulamalarda kullanım potansiyelini önemli ölçüde artırmaktadır.

Tablo 2.4: Monolitik karma modlu durağan fazlar

Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
Poliye bağlı kinin glisidil metakrilat- ko-etilen dimetakrilat		Element analizi, SEM	PAH, Alkilbenzenler, Benzoik asit homologları, Alkaloidler, β 2-reseptör uyarıcıları	RP/IEC/ π - π etkileşimleri	(Wang vd., 2018)
Polihedral N-fenilaminopropil ve glisidil modifiye kopolimeri		Element analizleri, FTIR, SEM, Nitrojen adsorpsiyonu analiz	Alkilbenzen, Alkilbenzen Ketonlar, Nükleik Asit Bazları, Amino Asitler, Fenoller, Fenolik	RP/HILIC/ Hidrojen bağı, SEC	(Su vd., 2018)
1-(2-Dimetilaminoetil)-5-merkaptotetrazol		FTIR, SEM, Azot adsorpsiyon analizi, Enerji dağıtıcı spektroskopisi	Alkilbenzenler, Amidler, Anilinler, Sülfonamidler, Nükleobazlar ve Protein triptik	RP/HILIC/IEC	(Wang vd., 2017)

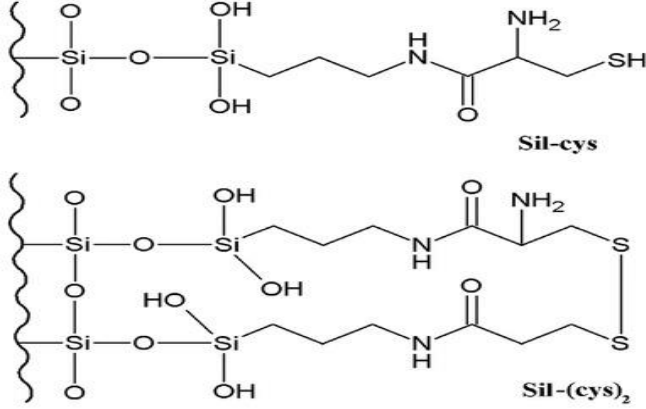
Tablo 2.4'ün devamı...					
Sabit Fazın Ligand(ları)	Yapı	Karakterizasyon	Analitler	Ayrırma Mekanizması	Kaynakça
1-asetilamino-propil-3-metilimidazolyum bromür ile üre-formaldehit		SEM, NMR	Fenoller, Benzoik asit türevleri, Enkefalinler	HILIC/ Hidrojen Bağ/IEC	(Wang vd., 2016)
Poli(p Metakriloylaminofenilarsit-ko-pentaeritritol triakrilat)		FTIR, Zeta-potansiyel Analizi, SEM, EDX,	PAH, Nükleozitler/Nükleobazlar, Fenoller, Sülfonamidler	RP/HILIC/IEC	(Qin vd., 2018)

2.3. HILIC Sabit Fazlarının Geliştirilmesindeki İlerlemeler

2.3.1. Silika jeli ve kimyasal olarak bağlanmış silika tabanlı sabit fazlar

Silika sol taneciklerinin kontrollü koşullar altında bir araya gelerek oluşturduğu ve pH 9 seviyesine kadar stabilitesini koruyabilen yüksek saflıktaki "sil-gel" tipi B sınıfı küresel silika partikülleri, HILIC kromatografisinde hâlen en yaygın kullanılan kolon materyalleri arasında yer almaktadır. Çıplak silika partikülleri, çeşitli polar bileşiklerin etkin biçimde ayrılmasına olanak tanırken, bu partiküllerin boyutunun küçülmesiyle birlikte ayırma verimliliği de artmaktadır. Son yıllarda, 2 mikrometreden daha küçük tamamen gözenekli UHPLC (Ultra Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) partiküllerinin HILIC modunda kullanımı yaygınlaşmıştır (Ahn vd., 2010; Lurie vd., 2011; Novaková vd., 2014). Özellikle polar ve bazik bileşiklerin ayrılmasında, çekirdek-kabuk (core-shell) yapısına sahip sub-2 mikrometre silika partiküllerinin, aynı boyuttaki tamamen gözenekli yapıdaki partiküllere göre daha yüksek verim sağladığı bildirilmiştir. Bu iyileşme, partikül içi difüzyon mesafesinin azalması ve bu sayede örnek transfer direncinin (van Deemter C-terimi) düşmesiyle açıklanmaktadır (Heaton ve McCalley, 2014). Ayrıca, alıkonma kuvveti ve seçiciliği artırmak amacıyla, silika yüzeyleri çeşitli polar fonksiyonel gruplarla kimyasal olarak modifiye edilmektedir. Bu amaçla kullanılan başlıca gruplar arasında diol, amino, amid, siklodekstrin, iyon değişim, zwitteriyonik, poli(2-hidroksietil aspartamid) ve poli(süksinimid) gibi fonksiyonel yapılar yer almaktadır (Alpert, 1983).

2.3.2. Amino asit ve amid bağı sabit fazlar

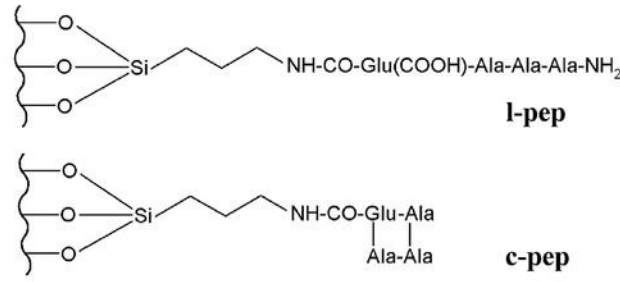


Şekil 2.1: Sistin (Sil-(cys)₂) ve sistein (Sil-cys) bağlı silika sabit fazının yapıları (Ohyama vd., 2008; Xue vd., 2009).

"Tiyol-ene" klik reaksiyonları, hem basitlikleri hem de yüksek verimlilikleri sayesinde, amino asit türevli sabit fazların seçici biçimde sentezlenmesine olanak sunmaktadır. Vinil triklorosilanın yatay polimerizasyonu yoluyla modifiye edilmiş silika jel yüzeylerinin, sistin (Xu vd., 2014) ya da sistein (Shen vd., 2012) ile gerçekleştirdiği reaksiyonlar sonucunda, tuz içeren mobil fazlar kullanılarak nükleozitlerin, sulfadiazin, sulfisoksazol ve benzoik asit türevlerinin etkili bir biçimde ayrılabilirdiği sabit fazlar elde edilmiştir (Şekil 2.1). Bu tür amino asit fonksiyonlu sabit fazlarda, alıkonma mekanizmasında iyonik etkileşimlerin önemli ölçüde rol oynadığı literatürde yaygın olarak vurgulanmaktadır.

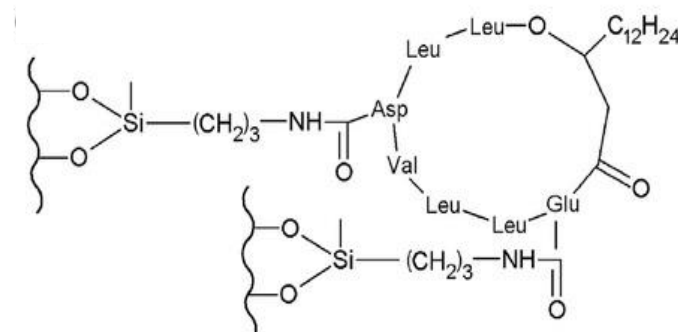
2.3.3. Peptit ve siklopeptit fonksiyonlu sabit fazlar

Silika yüzeyine tutturulan doğrusal peptitler, çok sayıda amid bağı içermeleri nedeniyle belirgin hidrofilik karakter sergilemekte ve genellikle yapısal benzerliğe sahip bileşiklerin sıvı kromatografisinde tercih edilmektedir. Bu tip peptit bazlı sabit fazlar; HILIC modunda kiral bileşiklerin ayrılması, DNA'nın fraksiyonlanması ile peptit ve proteinlerin saflaştırılması, ayrıştırılması ve izolasyonu gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır (Kikta ve Grushka, 1977; Shundo vd., 2009; Ohyama vd., 2008).



Şekil 2.2: Aynı amino asit dizilimine sahip (-alanin-alanin-alanin-glutamik asit) doğrusal peptit (l-pep) ve siklopeptit (c-pep) fazlarının yapıları (Li vd., 2013; Ohyama vd., 2008; Xue vd., 2009)

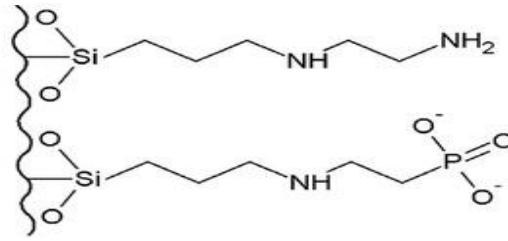
“Klik-dipeptit” sabit fazı ise, α -azido-L-fenilglisin dipeptidinin alkilen-silika yüzeyine klik kimyası ile bağlanması yoluyla hazırlanmış olup; hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sayesinde aromatik bileşikler için yüksek seçicilik, iyi pik simetrisi ve yüksek ayırma verimliliği sunmaktadır (Xue vd., 2009). Zhang ve çalışma arkadaşları, aynı amino asit dizilimine (-alanin-alanin-alanin-glutamik asit) sahip doğrusal (l-pep) ve siklik (c-pep) peptit sabit fazlarını HILIC sisteminde nükleik bazlar, nükleozitler, sülfonamidler ve benzoik asit türevlerinin ayırımı açısından karşılaştırmışlardır (Şekil 2.2). Bu çalışmada c-pep fazının, l-pep fazına kıyasla polisiklik aromatik hidrokarbonlar için belirgin boyut seçiciliği gösterdiği, ancak kuvvetli polar bileşikler için daha düşük hidrofilik etkileşim sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca, düşük pH ve yüksek iyonik güç koşullarında yalnızca asidik bileşiklerin alıkonması iyon değişim mekanizması nedeniyle azalmış, bazik bileşikler ise büyük oranda etkilenmemiştir (Li vd., 2013).



Şekil 2.3: Bacillus subtilis tarafından üretilen döngüsel heptapeptit yapısındaki biyosürfaktan surfaktin bağlı silikanın yapısı (Cameotra & Makkar, 1998; Ohyama vd., 2014).

Diğer taraftan, *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen bir biyosürfaktan olan döngüsel heptapeptit surfaktin, β -hidroksi yağ asidi grubunu içerecek şekilde APS (aminopropil silika) yüzeyine amidik bağla tutturulmuştur. Bu yeni yapıdaki sabit faz, HILIC modunda nükleik asitler, nükleozitler, vitaminler ve ksantinlerin ayırımında klasik APS kolonlarından farklı seçicilik profili göstermiştir (Şekil 2.3). Üç farklı pürin türevi için ise karışık RP/HILIC (Ters Faz/Hidrofilik Etkileşimli Sıvı Kromatografi) mekanizmasının etkin olduğu gözlemlenmiştir (Ohyama vd., 2014; Arima, Kakinuma ve Tamura, 1968; Cameotra ve Makkar, 1998).

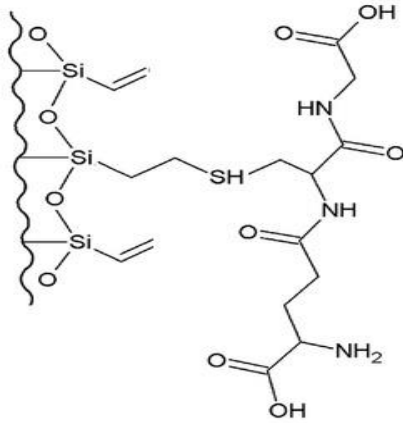
2.3.4. Zwitteriyonik ve karışık modlu silika tabanlı sabit fazlar



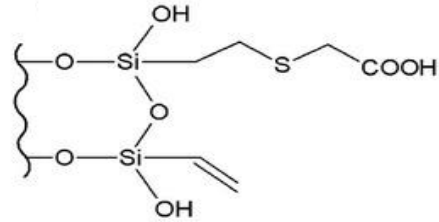
Şekil 2.4: Zwitteriyonik amino-fosfat bağlı silika sabit fazının yapısı (Cheng vd., 2013).

Hem pozitif hem de negatif yüklü fonksiyonel gruplar içeren silika bazlı zwitteriyonik sabit fazlar, HILIC uygulamalarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Jiang vd., 2006; Boersema vd., 2007; Zhang vd., 2012). Amino asitlerin silika jel yüzeyleriyle reaksiyona girmesiyle elde edilen peptit-tabanlı zwitteriyonik fazlar, inorganik anyon ve katyonların hızlı ayırımında kullanılabilir. Bu tür fazlar, sıklıkla mobil faz bileşimine bağlı olarak çift modlu bir alıkonma davranışı (HILIC/ters faz) sergiler. Anyon-katyon değişim ile hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografiyi birleştiren karışık modlu (ACE/HILIC) sabit fazlar, iyonik ve polar etkileşimleri entegre ederek küçük moleküllü ilaçların seçici ayırımında önemli avantajlar sunmaktadır (Zhu, Mant ve Hodges, 1991; Strege vd., 2000). Amino-fosfat zwitteriyonik sabit fazı, negatif yüklü fosfat grubuyla birlikte pozitif yüklü diamino grubu içerir (Şekil 2.4) (Cheng vd., 2013). Bu faz ile vitaminler, nükleozitler, deoksinükleozitler, nükleobazlar ve aromatik asitlerin ayırımı, sulu asetonitril içeren amonyum format mobil fazı kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bazı bileşiklerin alıkonma kapasitesi, pH arttıkça yükselirken; nikotinamid gibi yüksüz bileşiklerin alıkonması, pH değişiminden büyük ölçüde etkilenmemektedir. Glutamin temelli, karışık modlu ve silika yüzeyine bağlı bir başka sabit faz, bir amino alkol grubu ile iki amid grubu (biri polar baş grup, diğeri aromatik

halka içinde) içererek; polar, orta polariteye sahip ve apolar analitlerin alıkonmasına imkân tanımaktadır (Aral T. vd., 2015). Bu yapı, zwitteriyonik fazlara benzer şekilde, HILIC ve iyon değişim mekanizmalarını bir arada barındırarak çift yönlü etkileşim sağlar. Bu kolon kullanılarak altı farklı nükleotid, pH 3,25 fosfat tampon koşulunda HILIC modunda 10 dakika içinde ayrılmış; bitki hormonları ve fenolik bileşikler ise ters faz koşullarında ayrıştırılmıştır.



(Şekil 2.5)



(Şekil 2.6)

Şekil 2.5: Glutasyon bazlı karışık modlu HILIC/kasyon değişim mekanizmasına sahip bağlı silika sabit fazı (Alpert, 2008; Shen vd., 2013).

Şekil 2.6: Thiol-Click-COOH bağlı silika sabit fazının yapısı (Liang vd., 2015).

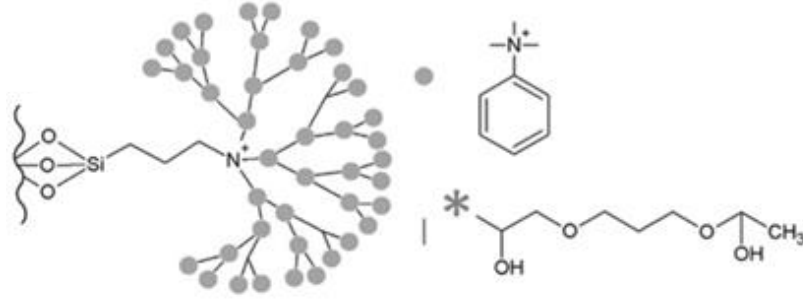
Ayrıca, glutasyon bazlı karışık modlu HILIC/kasyon değişim sabit fazı (Şekil 2.5), hidrofobik ve hidrofilik özellikler ile iyonik yük farkı taşıyan peptitlerin ayrımı için kullanılmıştır. Bu fazla, nötr fruktosan bileşikler bazik kitooligosakkaritlerden; kuvvetli asidik özellik taşıyan karagenan oligosakkaritleri ise başarıyla ayrılmıştır (Shen vd., 2013). Elde edilen bu ayırım davranışı, düşük tampon konsantrasyonu içeren mobil fazlarda elektrostatik itme temelli ERLIC mekanizması ile açıklanmaktadır (Alpert, 2008). Tiyol-ene klik reaksiyonu, alken ile tiyol arasındaki hidrotiyolasyon temelli bağlanmaya dayanmakta olup yüksek verimlilik ve stereoselektif ürün oluşumu sağlamaktadır (Lowe, 2010). Örneğin, vinil grubu taşıyan silika yüzeyine bağlanan tioglikolik asit, tiyol-Click-COOH kolonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2.6). Bu faz, saf silikaya kıyasla daha yüksek hidrofiliklik göstererek; 13 nükleozit ve baz ile dört suda çözünebilir vitaminin seçici olarak ayırımını gerçekleştirmiştir. Bu ayırım performansı,

HILIC bölünme mekanizması ile iyon değişim mekanizmasının sinerjik etkisine atfedilmektedir (Peng vd., 2013).

2.3.5. Polimer kaplı ve polimerik yapıda sabit fazlar

Polisakkarit bazlı sabit fazların HILIC ayırımları için kullanımı son yıllarda artış göstermektedir. Gözenekli (FRULIC-N) (Qiu vd., 2011; Padivitage vd., 2013) ve yüzeysel gözenekli çekirdek-kabuk yapılı (Dolzan vd., 2014) silika partiküllerine kimyasal olarak bağlanan doğal siklofruktan-6 (CF6), yalnızca HILIC modunda değil, aynı zamanda saf organik çözücülü normal faz koşullarında da çeşitli biyolojik ve farmasötik moleküllerin (nükleik bazlar, nükleozitler, nükleotidler, ksantinler, β -blokerler, fenolik asitler, karbonhidratlar vb.) ayırımında kullanılmaktadır. Karbonil diimidazol (CDI) ile aktive edilmiş silika yüzeyine bağlanan dekstran, hem hidrofilik etkileşimleri artırmakta hem de silikanın mekanik dayanımını korumaktadır (Sheng vd., 2014). Bu yapı, şekerler, şeker alkoller, oligosakkaritler ve glikosillenmiş peptitlerin ayırımı için uygundur ve mobil fazdaki tuz konsantrasyonunun değiştirilmesiyle alıkonma kontrolü sağlanabilir. Bu sabit fazlar özellikle glikobiyoloji ve proteomiks alanlarında potansiyel taşımaktadır.

Hidrofilik bir aminoglikozid olan neomisin, çok sayıda amino, hidroksil ve glikozidik oksijen grubu içerir ve silika yüzeyine başarıyla tutturulmuştur. Neomisin bazlı sabit faz, tamponlanmış sulu asetonitril mobil fazında nükleozitler, sitokinler ve sülfonamidler gibi polar bileşiklerin HILIC modunda ayırımında etkili olmuştur (Örtel vd., 2004; Peng vd., 2013). Ayrıca karışık modlu hidrofilik/iyon değişim mekanizmaları ile organik asitler gibi yüklü bileşiklere yönelik ilave seçicilik sağlamaktadır. Rebaudioside A (RA), dört şeker birimi ve hidrofobik aglikon içeren bir diterpen glikozittir ve tiyol-ene klik reaksiyonu ile silika yüzeyine tutturulmuştur (Liang vd., 2015). Bu yapı sayesinde elde edilen HILIC/RPLC karışık modlu sabit faz, su oranı arttıkça şekerlerin alıkonmasında azalma göstermiştir; bu durum HILIC mekanizması ile uyumludur. Yüksek oranda sulu mobil fazlarda ise RP mekanizması devreye girmektedir.

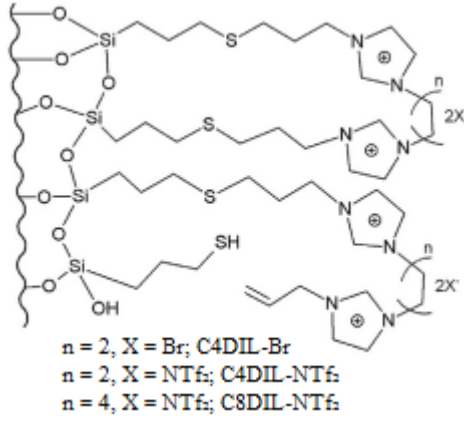


Şekil 2.7: Aromatik dörtlü amonyum iyonları içeren dallanmış birimlerin tekrarıyla oluşturulmuş dendritik polimer sabit fazının yapısı; bu polimerler silika jel üzerine bağlanmıştır. Dallar üzerindeki dolu daireler fenil-amonyum gruplarını temsil etmekte, daireler arasındaki çizgiler ise görselin sağ alt köşesinde gösterilen yapıyı ifade etmektedir. Dörtlü amonyuma bağlanma noktası bir yıldız işareti (*) ile gösterilmiştir (Shon,2010;Livd.,2014).

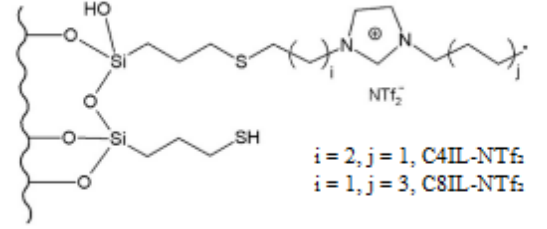
Dendritik polimerler, merkezden dallanarak yayılan çok sayıda aktif uca sahip yapılardır ve silika yüzeyine amin-epoksi reaksiyonları ile bağlanabilir. Şekil 2.7'de gösterildiği gibi, aromatik dörtlü amonyum iyonları içeren tekrar eden birimlere sahip bu yapılar, çeşitli alıkonma mekanizmalarını (hidrofobik, anyon değişim, hidrofilik) aynı anda sunabilmektedir (Shon, 2010; Li vd., 2014). Nükleik bazlar (urasil, sitozin, guanin) ve bunların nükleozit türevleri (uridin, sitidin, guanozin), pH 5'e ayarlanmış ve %98 asetonitril içeren mobil faz koşullarında başarıyla ayrılmıştır. Polivinil alkol (PVA) ile kaplanmış silika sabit fazları (PVA-Sil), çıplak silikaya göre daha yüksek pH stabilitesi sağlamakta ve bazik analitlerle istenmeyen elektrostatik etkileşimleri azaltmaktadır (Ji vd., 2014). PVA çözeltisine fonksiyonel katkı maddeleri eklenerek farklı işlevselliğe sahip sabit fazlar elde edilebilir. Bu kolonlarda nükleozitlerin güçlü alıkonma gösterdiği ve yaklaşık 57.000 teorik plaka verimliliğe ulaşıldığı bildirilmiştir. Asetonitril oranı düşürülen gradyan yönteminde sekiz farklı sefalosporin aynı anda ayrılmıştır. Ayrıca, gözenekli grafitik karbon yüzeyinin PVA ile kaplanması sonucunda elde edilen yeni nesil bir sabit faz, pH 12'ye kadar stabil olup HILIC karakteri göstermektedir (Hou vd., 2016).

Son olarak, 0,1 mm iç çapındaki gözenekli küresel silika partikülleri, yüklü organik polimer nano-boncuklarla kaplanarak çift fonksiyonlu bir yapıya dönüştürülmüştür. İç gözenek alanı, ters faz ve zayıf anyon değişim özellikleri gösterirken; dış yüzey, kuvvetli katyon değişim grupları ile donatılarak asidik, bazik ve nötr bileşiklerin eş zamanlı ayrımını mümkün kılmıştır (Liu ve Pohl, 2010). Bu sabit faz, yüksek asetonitril içeren sistemlerde hidrofilik ilaçların ve bunların karışık iyonlarının (örneğin, potasyum tuz formundaki penisilin) etkili şekilde ayrımında kullanılmıştır.

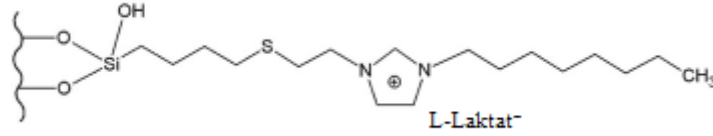
İyonik sıvılar (IL), 100 °C'nin altında eriyen, oda sıcaklığına yakın sıvı hâlde bulunabilen ve oldukça düşük buhar basıncı, yüksek termal stabilite ile geniş çözündürme kabiliyetine sahip özel tuzlardır. Silika yüzeyine bağlanan iyonik sıvılarda genellikle yalnızca katyon tutturulduğu için, bu fazlar teknik olarak “serbest” iyonik sıvılar olarak sınıflandırılmaz. İyonik sıvıların fizikokimyasal özellikleri; katyon ve anyon türlerinin değiştirilmesi veya işlevsel grupların modifikasyonu yoluyla istenilen şekilde ayarlanabilmektedir (Silvester, 2011; Opallo ve Lesniewski, 2011). Katyonik merkezlere göre imidazolyum, amonyum, fosfonyum, piridinyum ve guanidinyum temelli iyonik sıvı yapıları literatürde yaygın şekilde sınıflandırılmıştır (Qiao vd., 2013; Qiu vd., 2011; Shen vd., 2011; Bicker vd., 2011). HPLC’de ilk olarak bazik analitlerin silika yüzeyindeki rezidüel silanol grupları ile etkileşimini azaltmak amacıyla mobil faz katkı maddesi olarak kullanılan iyonik sıvılar, günümüzde HILIC ayırımlarında sabit faz bileşeni olarak da uygulanmaktadır (He vd., 2003; Ruiz-Angel vd., 2006).



(Şekil 2.8)



(Şekil 2.9)



(Şekil 2.10)

Şekil 2.8: Bromür ve bis (trifloro metan sülfonil)imid anyonları ile kombinasyon halinde, 1,4-bis(3-alilimidazolyum) bütan ve 1,8-bis(3-alilimidazolyum) oktan bazlı di-katyonik iyonik sıvılara dayalı silika bağlı sabit fazların yapısı (Li vd., 2014).

Şekil 2.9: Farklı uzunluklarda bağlı zincirler içeren di-katyonik iyonik sıvıların bağlandığı silik asabit fazları (Qiao vd., 2014).

Şekil 2.10: L-laktat anyonu ile birlikte imidazolyum içeren C8-silika sabit fazının yapısı (Qiao vd., 2015).

Shi ve arkadaşları, bromür ve bis (trifloro metansülfonil)imid anyonlarıyla eşleşen 1,4-bis(3-alilimidazolyum)bütan ve 1,8-bis(3-alilimidazolyum)oktan tabanlı çeşitli di-katyonik iyonik sıvılar sentezlemişlerdir (Şekil 2.8) (Qiao vd., 2014). Bu yapılar, tiyol-ene klik tepkimesi aracılığıyla 3-merkaptopropil ile modifiye edilmiş silika yüzeyine bağlanmıştır. Zincir uzunlukları farklı olan bu di-katyonik iyonik sıvı yapılarından elde edilen sabit fazlar (Şekil 2.9), HILIC ve anyon değişim mekanizmalarının birlikte etkili olduğu karışık modlu bir alıkonma profili sergilemiştir. Nükleozitlerin ayırımında yüksek verimlilik ve seçicilik sağlanırken, benzer yapıları monokatyonik iyonik sıvı sabit fazlarda düşük alıkonma davranışı gözlemlenmiştir. Ayrıca, imidazolyum gömülü C8 yapısında ve L-laktat anyonu içeren sabit faz (Şekil 2.10), polisiklik aromatik hidrokarbonlar, anilin

türevleri ve Trichoderma türüne ait ikincil metabolitlerin HILIC/RPLC karışık modda ayrımı için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Qiao vd., 2015). Polaritesi geniş aralıkta değişen bu bileşikler, metanol/su (70/30) mobil fazı ile temel çizgiden ayrılacak biçimde etkili şekilde ayrılmıştır. Etkili bir glukaminyum tabanlı iyonik sıvı sabit fazı ise N,N-dialil-N-metil-D-glukaminyum bromürün tiyol-ene klik kimyası yoluyla silika yüzeyine tutturulması ile hazırlanmıştır (Qiao vd., 2014). Bu sabit fazda, substitüe benzoik asitlerin alıkonması, anyon değişim ve HILIC etkileşimlerinin birlikte kontrol ettiği karma mekanizmayla açıklanmaktadır. Düşük pH koşullarında asitlerin disosiyasyonu azaldığı için iyonik etkileşimler de zayıflamaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), farmasötik ve çevresel izlemeden biyoteknoloji ve gıda güvenliğine kadar çeşitli alanlarda yüksek hassasiyeti, duyarlılığı ve çok yönlülüğü ile değer verilen hayati bir analitik teknik olarak öne çıkmaktadır (Sýkora vd., 2018; Zhou vd., 2020). HPLC'nin son on yıllardaki evrimi, sabit faz malzemelerindeki yenilikler tarafından önemli ölçüde yönlendirilmiştir (Hosseini ve Tabar Heydar, 2021; Yang vd., 2023). Ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) gibi yerleşik tek modlu yöntemlerin birçok ayırma zorluğu için etkili olduğu kanıtlanmış olsa da, karmaşık numunelerle karşılaştıklarında genellikle zorluklarla karşılaşılır. Spesifik olarak, geniş bir polarite spektrumuna sahip bileşenler içeren karışımların analizi, bu tek modlu yaklaşımların içsel sınırlamalarını vurgulama eğilimindedir (Dembek ve Bocian, 2023).

Bu zorlukların üstesinden gelmek için karma modlu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (MHPLC) yaklaşımı giderek daha umut verici bir strateji hâline gelmiştir. Çeşitli ayırma mekanizmalarını tek bir kolonda birleştirerek çalışır (Zhou vd., 2022). Bir yöntemde, durağan fazlar, silika veya polimer desteklerin yüzeyine fonksiyonel ligandlar eklenerek modifiye edilir. Bu ligandlar, hidrofobik, hidrofilik, elektrostatik ve hatta π - π etkileşimler gibi farklı şekillerde etkileşime girecek şekilde tasarlanmıştır (Jiang vd., 2023; Zheng vd., 2021). Bu etkileşim çeşitliliği sadece ayırmanın seçiciliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda farklı analitlerin çözünürlüğünü iyileştirmeye de yardımcı olur (Wolrab vd., 2021). Bu yaklaşımın iyi bir örneği, şekil seçiciliğini artıran ve silanol aktivitesini azaltan, dokosil uçlu poliamin-tabanlı amfifil bir ligandla modifiye edilmiş sabit fazın kullanılmasıdır. Bu, yapısal olarak benzer bileşikleri etkili bir şekilde ayırmak için özellikle yararlı hâle getirir (Zhang vd., 2016). Bu işlemin başka bir versiyonu, silika

veya polimer desteklerinin aynı etkileşim aralığını sunan ligandlarla işlevselleştirilmesini içerir (Han vd., 2019; Mumin vd., 2022). Örneğin, bir çalışma, dokosil ile sonlandırılmış bir poliamin amfifil bağlı fazın kullanılmasının şekil seçiciliğini iyileştirdiğini ve silanol aktivitesini azalttığını ve benzer moleküllerin daha iyi ayrılmasına yol açtığını göstermiştir (Zhang vd., 2021). Ek olarak, imidazolyum iyonik sıvıların bir poli(kinin) ile modifiye edilmiş silika matrisine dâhil edilmesiyle kromatografik sistemin çok yönlülüğü önemli ölçüde genişletilir. Bu modifikasyon, sistemin ters faz, HILIC ve iyon değiştirme modlarında çalışmasına izin vererek kullanışlılığını daha da artırır (Zhou vd., 2020).

Son araştırmalar, hem polar hem de polar olmayan işlevleri entegre eden ve çeşitli analitler arasında dengeli alıkonma sağlayan karma modlu sabit fazlar geliştirmeye odaklanmıştır (Aral vd., 2017; Gao vd., 2020). Bunlar arasında, PEI ile modifiye edilmiş fazlar, karmaşık biyolojik ayrılmaları kolaylaştırarak hidrofilik etkileşimleri ve anyon değişimini artırır (Gao vd., 2020; Liu vd., 2020; Yang vd., 2023). Benzer şekilde, COF ile modifiye edilmiş fazlar, yüksek gözeneklilik ve çoklu etkileşim modlarından yararlanarak MHPLC yeteneklerini daha da genişletir ve bu da onları zorlu matrisler için özellikle uygun hâle getirir (Hu vd., 2020; Zeng vd., 2016; Zheng vd., 2021). Ayrıca, [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan kullanmak gibi yeni sentetik stratejiler, RPLC, HILIC ve IEC koşullarında sorunsuz çalışmayı sağlayarak hem verimliliği hem de esnekliği önemli ölçüde artırır (Mumin vd., 2022). Bu gelişmelerin yanı sıra, geleneksel tek modlu sistemlere kıyasla karma modlu fazların performansını değerlendirmek için artan araştırma çabaları ayrılmıştır. Çoklu etkileşim mekanizmalarını akıllıca birleştirerek, MHPLC fazları, küçük organik moleküllerden karmaşık biyomoleküllere kadar çok çeşitli analitler için üstün seçicilik ve hassasiyet göstermiştir (Wan, 2021; Wang vd., 2016; Zhang vd., 2016). Wang ve ark., sıvı kromatografisi için silika bazlı, dikasyonik iyonik sıvılarla modifiye edilmiş karışık modlu bir sabit faz geliştirdi. Bu karma modlu sabit faz, çeşitli gıda katkı maddelerinin ayrılması ve tespitinde iyi performans ve geri kazanım oranları göstermiştir (Wang vd., 2024). Benzer şekilde, yakın tarihli bir çalışma, silikanın polietilenimin (PEI) ve zein ile modifiye edilmesiyle oluşturulan yeni bir PEI/Zein çekirdek-kabuk kompozit sabit fazını tanıttı. Bu yenilikçi faz, yalnızca ters faz modunda hidrofobik flavonların ve hidrofilik etkileşim modunda nükleositlerin ve antibiyotiklerin etkili bir şekilde ayrılmasını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda karmaşık numuneler için seçiciliği ve ayırma verimliliğini de artırır (Shen vd., 2024). Bu gelişmeler, çeşitli etkileşim mekanizmalarının araştırılmasıyla birlikte, RPLC/HILIC (Sun vd., 2023), HILIC/RPLC/iyon değişim kromatografisi (IEX) (Chen

vd., 2021) ve HILIC/RPLC/IEX/normal fazlı sıvı kromatografisi (NPLC) (Chen ve Chen, 2018) dâhil olmak üzere karmaşık numunelerin analizi için çeşitli karma modlu sabit fazların tasarımına yol açmıştır.

Kantitatif yapı-alıkonma ilişkisi (QSRR) çalışmaları, kromatografik ayırmayı yöneten etkileşimler hakkındaki anlayışımızı derinleştirmiştir (Yang vd., 2023; Kaliszan, 2007). Bölme katsayısı (logP), dağılım katsayısı (logD) gibi parametreler, karma modlu durağan fazlarda alıkonma davranışı ile etkili bir şekilde ilişkilendirilmiş ve yeni malzemelerin rasyonel tasarımı için bir tahmin aracı sunulmuştur (Charifson ve Walters, 2014; Lemasson vd., 2018). Bu tür çalışmalar yalnızca kolon performansını optimize etmeye yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda karma modlu kromatografinin temelini oluşturan moleküler düzeydeki mekanizmalar hakkında kritik bilgiler sağlar (Svrkota vd., 2023; Dinh vd., 2011).

Bu çalışma, hem hidrofilik hem de iyon değişim özellikleri kazandıran dietanolamin'den türetilen yeni birçok işlevli durağan fazı tanıtmaktadır. [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan ile reaksiyonu, silika substrat ile sağlam bir kovalent bağ oluşturarak HILIC, RPLC ve IEX koşulları altında sorunsuz çalışan ve geleneksel tek modlu sistemlerin sınırlamalarının üstesinden gelen bir malzeme verir. Özellikle, sentez son derece pratik, uygun maliyetli ve tekrarlanabilir. Epoksit halka açma reaksiyonu, solvent içermeyen bir ortamda gerçekleştirilmiş ve yalnızca 2 saat içinde tamamlanarak yöntemin hem verimliliğini hem de ölçeklenebilirliğini ortaya koymuştur. Element analizi, FTIR, SEM ve BET ile kapsamlı karakterizasyon, kimyasal bileşiminin, morfolojisinin ve yüzey alanının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlarken; performansı, yüksek polar nükleobazlardan/nükleositlerden hidrofobik alkilbenzenlere, PAH'lara, Sudan boyalarına, anilin, sübstitüe edilmiş fenollere ve benzoik asitlere kadar çeşitli analitlerin ayrılmasıyla gösterilir.

Ayrıca, bu çok işlevli durağan fazın alıkonma mekanizmaları, kromatografik davranışını yöneten temel etkileşimleri aydınlatmak için alıkonma verilerini logD ve pKa değerleri ile ilişkilendiren QSRR parametreleri aracılığıyla sistematik olarak incelenir. Bu bütünlük yaklaşım sadece tasarımı doğrulamakla kalmaz, aynı zamanda karmaşık numune analizi için uyarlanmış yeni nesil malzemelerin gelecekteki gelişimi için bir çerçeve oluşturur. Karma modlu sabit fazlar, HPLC'de çoklu etkileşimlerle seçiciliği ve verimliliği artırır.

3. YÖNTEM

3.1. Malzemeler

Yüksek saflıkta küresel silika jel (Kromasil 5-100 SIL, 5 μm , 100 Å, 324 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) Nouryon Chemical Company (İsveç) tarafından tedarik edildi. HPLC için kullanılan asetonitril (ACN), metanol (MeOH) ve izopropanol (IPA) HPLC sınıfındaydı ve Merck tarafından sağlandı. Bu çalışmada kullanılan tüm analitler (Şekil 4.1, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.9, Şekil 4.11, Şekil 4.13 ve EK-12, Ek Malzemeler) ve diğer tüm reaktifler ve çözücüler Sigma-Aldrich (ABD) veya Merck tarafından sağlanmıştır. Sentezde kullanılan tüm reaktifler, aksi belirtilmedikçe reaktif derecesindeydi.

3.2. Enstrümanlar

Paslanmaz çelik HPLC kolonları, Çin menşeli HPLC üreticileri tarafından tedarik edildi. Chromtech pompa, rezervuar ünitesi ve aparatlarından (ABD) oluşan kolon paketleme sistemi ile kolonlar paketlenmiştir. Kızılötesi spektrumlar Mattson 1000 FTIR spektrometresi (Mattson, ABD) kullanılarak ölçüldü. Element kompozisyon analizi, Thermo Scientific FLASH 2000 cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. İyonlardan arındırılmış su, bir Millipore Milli-Q sistemi (Merck, ABD) ile arıtıldı. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, Dicle Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan SEM Laboratuvarı'nda Quanta FEG 250 sistemi (FEI Company, ABD) kullanılarak elde edildi. Dokusal analiz, otomatik bir adsorpsiyon sistemi kullanılarak 67 K'da nitrojen adsorpsiyonu ile gerçekleştirildi (Micromeritics, ASAP 2020). BET yüzey alanı (SBET), toplam gözenek hacmi (VT) ve gözenek boyutu dağılımı, Quantachrome yazılımı kullanılarak nitrojen adsorpsiyon-desorpsiyon izotermelerinden hesaplandı.

3.3. HPLC Koşulları

Kromatografik analizler, bir kuaterner pompa, gaz giderici, otomatik numune alma cihazı, diyot dizi dedektörü (DAD) ve termostatlı bir kolon bölmesi (Agilent, Almanya) içeren bir Agilent 1260 HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) için analitlerin standart çözeltileri, asetronitril (ACN) içinde 1 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) için analitler, suda 0.1 N NaOH içinde hazırlanan guanin hariç, bir analit suda çözünmediği sürece suda veya bir su-etanol karışımında çözüldü. Tüm çözeltiler, her analit için 0.05 mg/mL'lik nihai konsantrasyonlar elde etmek için su veya ACN ile seyreltildi ve 4 ° C'de saklandı. Ön testler de dahil olmak üzere tüm deneyler için tampon çözeltiler, amonyum format, amonyum asetat, potasyum monohidrojen fosfat ve potasyum dihidrojen fosfat kullanılarak yapıldı. pH, gerektiği gibi %2,5 amonyak çözeltisi, 0.1 M KOH veya 0.1 M asit kullanılarak ayarlandı. Ek kromatografik parametreler ilgili bölümlerde özetlenmiştir.

3.4. Kromatografik Kolonun Paketlenmesi

Kolonlar (250 × 4,6 mm, paslanmaz çelik), hem bulamaç hem de itme çözücülerini olarak IPA/MeOH (50/50) karışımı kullanılarak 450 bar'lık bir basınç altında yeni sabit fazlarla dolduruldu. Toplam 3.7 g sabit faz, 50 mL IPA / MeOH (50/50) içinde dağıtıldı ve ultrasonik bir banyoda 10 dakika boyunca sonikleştirildi. Daha sonra bulamaç, pompaya bağlı 50 mL'lik bir rezervuara döküldü ve rezervuar bağlantıları güvenli bir şekilde kapatıldı. İtme çözücüsü daha sonra 50 bar'dan başlayarak pompalandı. Basınç, her adımda 1 dakikalık bir alıkonma ile 50 bar'lık artışlarla kademeli olarak artırıldı ve 10 dakika içinde 450 bar'a ulaştı. 450 bar'ı 20 dakika beklettikten sonra, çözücü bir MeOH/IPA (70/30) karışımı kullanılarak 15 dakika daha pompalandı ve ardından 10 dakika saf MeOH uygulandı. Kolon daha sonra HPLC sistemine bağlandı ve 1 saat boyunca 0,5 mL/dk akış hızında MeOH ile şartlandırıldı. Daha sonra, kolon MeOH / su (50/50), ACN/su (10/90), ACN/su (50/50) ve ACN/su (90/10) ile sıralı şartlandırmaya tabi tutuldu ve her karışım 1 saat boyunca uygulandı. Son olarak, kolon, ilk testler sırasında prob olarak adenin ve butilbenzen kullanılarak test edildi.

3.5. Yeni Durağan Fazın Sentezleri

Sentezin ilk aşaması solvent içermeyen bir ortamda gerçekleştirildi. 50 mL'lik yuvarlak tabanlı bir reaksiyon balonuna, 3 g (12.51 mmol) [2- (3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan ve 1.57 g (15.01 mmol, 1.2 eşdeğer) dietanolamin eklendi. Karışım 100 ° C'de 2 saat boyunca karıştırıldı ve ilerleme ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılarak izlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra (sılan bileşiği reaksiyon ortamında tamamen tüketildiğinde), 40 mL toluen ve 6 g silika jel (Kromasil silika 5-100) ilave edildi. Elde edilen süspansiyon 120 ° C'de 96 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra karışım süzüldü ve modifiye edilmiş silika malzeme, reaksiyona girmemiş reaktifleri uzaklaştırmayı amaçlayan, 24 saat boyunca 200 mL kloroform ile sürekli ekstraksiyon için bir Soksilet aparatına yerleştirildi. Ekstraksiyonu takiben, modifiye edilmiş silika, 7 saat boyunca standart basınç altında bir döner buharlaştırıcıda ısıtılarak kurutuldu. Element analizi sonuçları: C, %18.75; H, %3.50; N, %1.82 . SEM, BET ve FTIR sonuçları, karakterizasyonlar bölümünde sunulur ve tartışılır.

3.6. QSRR Değerlerinin ve Kromatografik Parametrelerin Hesaplanması

logD, logS ve pKa değerlerini hesaplayarak durağan faz ile analitler arasındaki etkileşim mekanizmasını tartışmak için bir QSRR kurulmuştur. Tüm analitlerde tutarlılığı sağlamak için bu değerler ChemAxon'un Chemalize yazılımı kullanılarak hesaplandı. EK-1'de sunulan logD ve logS değerleri, her analit grubu için en uygun pH koşulları altında belirlenmiştir. Ek olarak, hem nükleobazlar/nükleositler hem de benzoik asitler için logD ve logS'nin pH ile değişimini gösteren grafikler oluşturuldu ve tüm analitler için teorik plaka sayısı (N) ve pik asimetri faktörü (As) hesaplanmıştır. Teorik plaka sayısı(N) denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı. Her analit grubunun teorik plaka hesaplarının sonuçları EK-1'de verilmiştir.

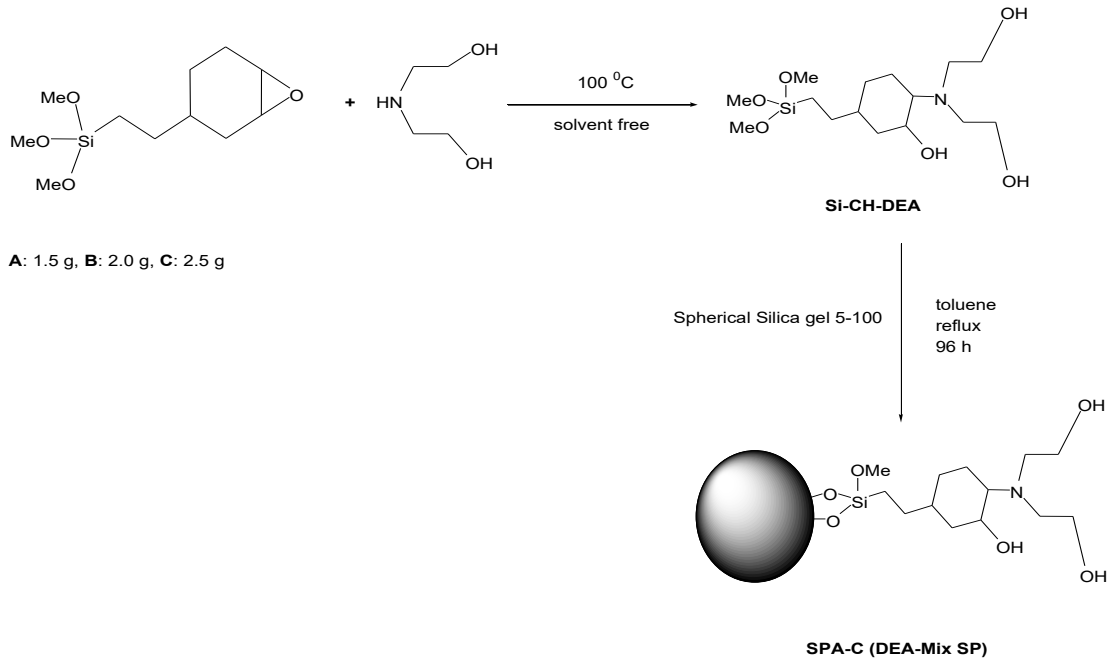
$$N = 5.54 \times (RT / W_{50})^2 \quad (\text{Denklem 3.1})$$

3.7. Sentezler

Dietanolamin, ucuz ve kolayca bulunabilen bir başlangıç malzemesidir. Yapısı, apolar alifatik metilen zincirlerine ek olarak iki polar hidroksil grubu ve ikincil bir amin grubu içerir. Bu çalışmada sentezlenen durağan fazın tasarımında amaç, hem yüksek

polar hidroksil gruplarını hem de apolar kısımları aynı yapı içine dahil etmektir. Bu yaklaşım, analitleri geniş bir polarite aralığında (polar, orta polar ve apolar bileşikleri kapsayacak şekilde) ayırabilen karma modlu bir sabit faz geliştirme amacına dayanmaktadır. Çeşitli bileşik sınıfları ile etkili etkileşimleri mümkün kılmak için, durağan fazın farklı moleküler yapılarla uyumlu fonksiyonel grupları içermesi gerekir.

Sentez prosedürünün bir başka avantajı basitliğidir: Silika yüzeyinde sadece tek aşamalı bir reaksiyon içerir, ilk adımda çözücü gerektirmez ve süresi nispeten kısadır. Bu faydalara dayanarak, başlangıç reaktifleri olarak dietanolamin ve [2- (3,4-epoksisikloheksil) etil] trimetoksisilan seçildi. Dietanolamin, yalnızca iki hidroksil grubu aracılığıyla yüksek polarite sağlamakla kalmaz, aynı zamanda amin grubunun protonasyonu nedeniyle pH 10'un altında katyonik bir karakter benimser. Bu, güçlü hidrojen bağlarının yanı sıra iyon-çift (anyon-katyon) etkileşimleri kurmasına izin vererek anyon değişim yeteneklerine katkıda bulunur. Sonuç olarak, bu polar etkileşimler yoluyla polar analitler için yüksek seçicilik hedeflendi. Bu çalışmanın dikkate değer bir yönü, silan birleştirme reaktifi olarak [2- (3,4-epoksisikloheksil) etil] trimetoksisilanın kullanılmasıdır ve bu da kromatografik sabit faz sentezinde nadir bir seçim. Bu bileşik, hem bir alifatik sikloheksil halkası hem de reaktif bir epoksi grubu içeren yapısal bileşenleri için seçilmiştir. Epoksi kısmı, aminler gibi nükleofillerle kolayca reaksiyona girer ve halka açıldıktan sonra bir amino alkol oluşturur. Bu amino alkol işlevselliği, durağan fazın -OH ve -NH₂ grupları aracılığıyla hidrojen bağları, iyon-dipol, dipol-dipol ve hatta iyon çifti etkileşimleri oluşturmasını sağlar. Ayrıca, silan birleştirme maddesinin hacimli sikloheksil ve etil grupları, nihai yapıya hidrofobik özelliklere katkıda bulunur. Kısacası, kuplaj reaktifinin kendisi polar ve apolar fonksiyonel grupların bir kombinasyonuna sahiptir. Dietanolamin ile reaksiyona girdikten sonra, ortaya çıkan yapı, daha geniş bir kromatografik etkileşim yelpazesini destekleyerek daha fazla çeşitlilik ve gelişmiş polarite kazanır.



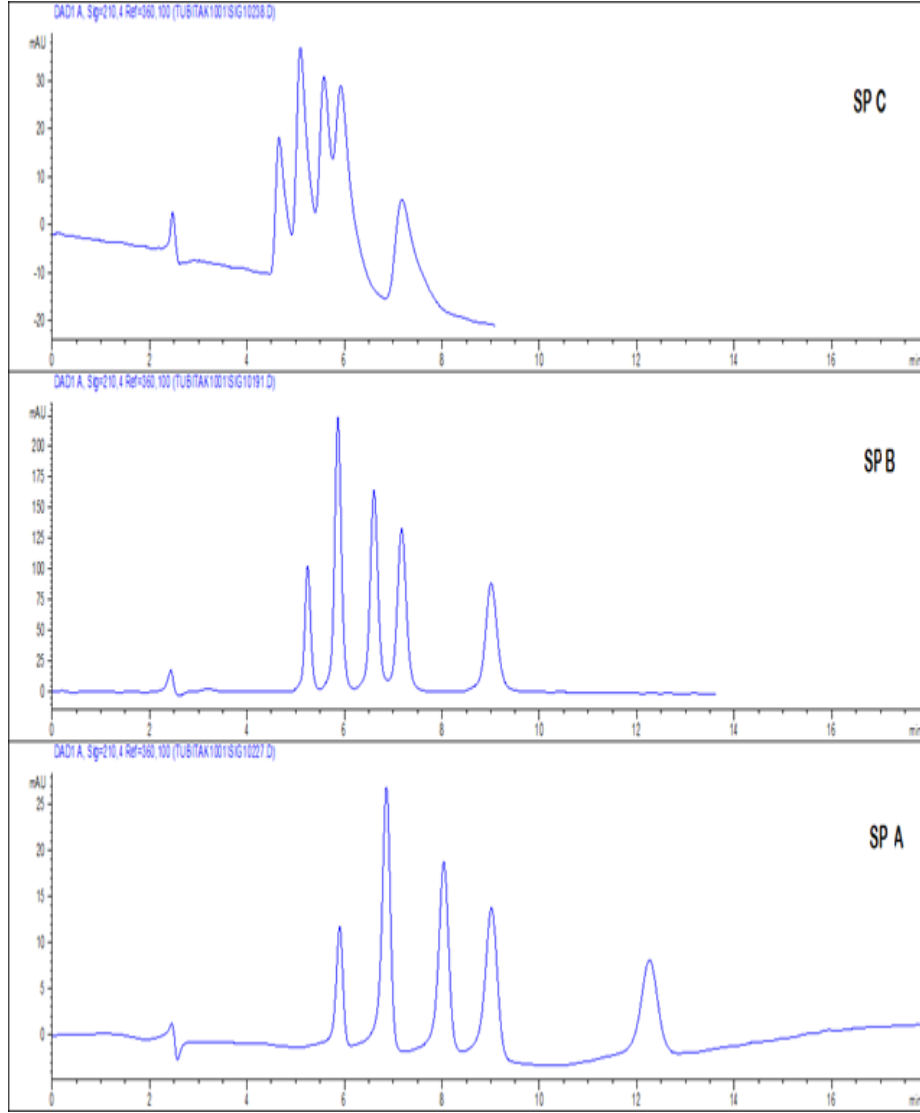
Şekil 3.1: Yeni karma modlu sabit fazın sentezi

Çalışmanın ilk aşamasında, tasarlanan durağan fazın sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Sentezin ilk adımında, dietanolamin ve [2- (3,4-epoksisikloheksil) etil] trimetoksisilan, çözücü içermeyen koşullar altında 100 ° C'de 2 saat boyunca reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon sırasında, silan birleştirme maddesindeki epoksi halkası açıldı ve Si-CH-DEA bileşiği elde edildi. Reaksiyonun ilerlemesi, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile izlendi. 2 saat sonra birleştirme reaktifinin tam tüketiminin onaylanması üzerine, karışıma tolueen ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) dereceli küresel silika jel (Kromasil 5 µm, 100 Å) ilave edildi. Elde edilen süspansiyon 120 °C'de 96 saat karıştırıldı. Filtrasyonu takiben, elde edilen sabit faz malzemesi, reaksiyona girmemiş bileşenleri silika matrisinden çıkarmak için 24 saat boyunca kloroform ile Soksilet ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Yeni durağan fazın yapısal analizi ve karakterizasyonu, element analizi, Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, Brunauer-Emmett-Teller (BET) yüzey alanı ölçümü ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirildi.

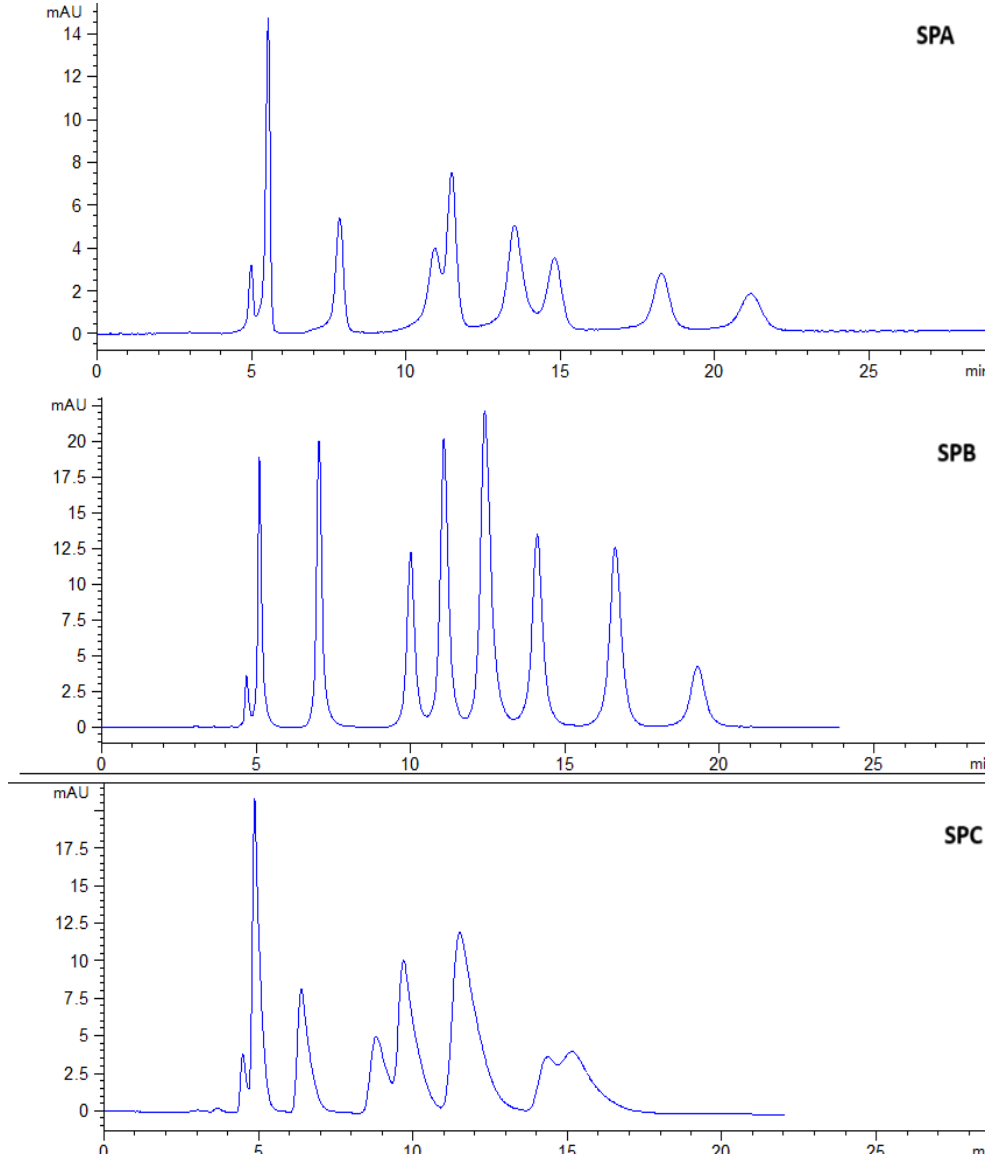
3.8. Silika Üzerindeki Karbon Yükünün Optimizasyonu

Ligand yüklemesinin kolon performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek ve kullanılan ligand miktarını optimize etmek için, farklı miktarlarda birleştirme reaktifleri kullanılarak üç farklı sabit faz sentezlendi. Her reaksiyon 4 g silika jel ile başlatıldı ve SPA, SPB ve SPC olarak adlandırılan sabit fazlar, sırasıyla 2.5, 2.0 ve 1.5 g [2- (3,4-epoksisikloheksil) etil] trimetoksisilan ile reaksiyona sokularak hazırlandı. Elde edilen malzemelerin temel bileşimleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu durağan fazlar, aynı prosedür kullanılarak kolonlara paketlenildi ve ilk performans testlerine tabi tutuldu. İlk analit olarak adenin kullanılmış, süresi, teorik plaka sayısı (N) ve asimetri faktörü (As) hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır (EK-12). Sonuçlar, SPB'nin 27.000 N / m değerine ve 1.05 As değerine sahip olduğunu, SPA'nın ise 22.000 ve 1.25 sergilediğini ve SPC'nin 6.000 N ve 1.6 As ile önemli ölçüde daha düşük performans gösterdiğini gösterdi.

Daha kapsamlı bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla, beş bileşenli bir alkilbenzen karışımı (Şekil 3.2) ile dokuz bileşenli bir nükleobaz/nükleosit karışımı (Şekil 3.3), her bir kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Her iki analit grubunda da SPA, SPB'ye kıyasla biraz daha uzun süreleri sergiledi, ancak daha geniş ve daha az simetrik piklere sahipti ve bu da ayırma seçiciliğinin azalmasına yol açtı. SPC en kısa analiz sürelerini sunmasına rağmen, aynı zamanda düşük N ve As değerleri ile düşük verimlilik ve seçicilik gösterdi. Bu bulgular, yetersiz ligand kapsamının, bloke edilmemiş silanol gruplarının aktif kalmasına neden olduğunu ve bunun da pik distorsiyona ve bozulma ayırma performansına katkıda bulunduğunu açıkça göstermektedir. Ayrıca, azaltılmış ligand yoğunluğu seçiciliği olumsuz etkiler. Öte yandan, en yüksek ligand yüklemesine sahip olan SPA, SPB ile karşılaştırılabilir seçicilik gösterdi, ancak muhtemelen yüzey düzensizlikleri veya aşırı ligand birikimine bağlı kontaminasyon nedeniyle pik deformasyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak, 1.5 g birleştirme reaktifi tam silanol kapsamı için yetersizken, 2.5 g aşırı olduğunu kanıtladı. Bu nedenle, 2.0 g birleştirme reaktifi ve 4.0 g silika ile hazırlanan sabit faz SPB, gelişmiş ayırmalar için en uygun olarak kabul edildi. Bu optimize edilmiş kolon DEA-Mix-SP olarak belirlenmiştir.



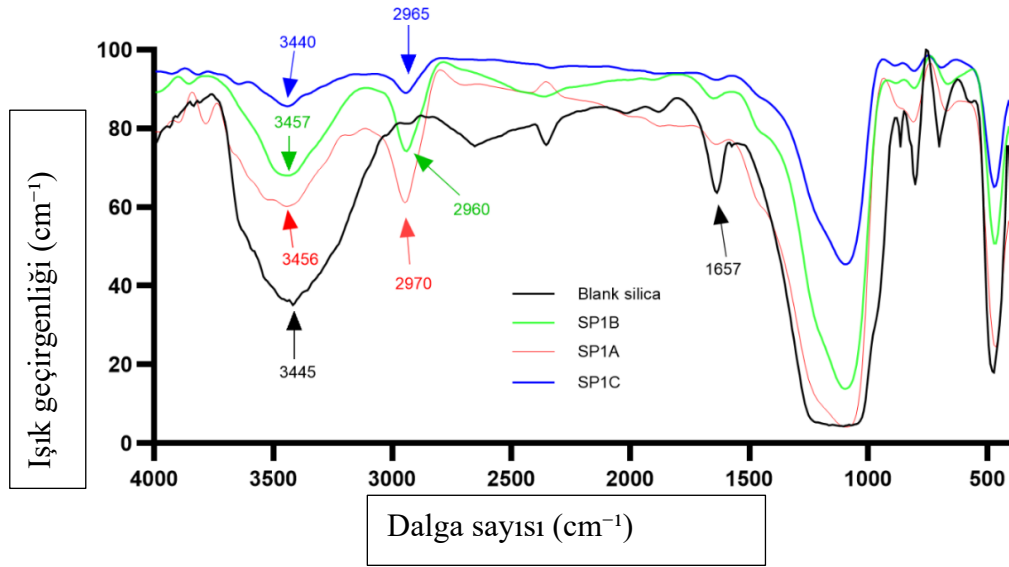
Şekil 3.2: SPA-C için ilk testler. Alkilbenzler karışımı. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 40/60, akış hızı: 1 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 210 nm. Analitler: 1) Benzen, 2) Tolüen, 3) Etilbenzen, 4) Kümen, 5) Bütılbenzen.



Şekil 3.3: SPA-C için ilk testler. Nükleobazlar/nükleositler. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 10/90, akış hızı: 0,8 mL/dak, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dalga boyu: 265 nm. Analitler: 1 Timin, 2 Urasil, 3 Uridine, 4 Adenosine, 5 Sitozin, 6 Adenin, 7 Sitidin, 8 Guanin, 9 Guanodin

3.9. Karakterizasyonlar

İlk olarak, sentezlenen üç durağan fazın temel bileşimi incelendi, ardından FTIR analizi yapıldı. Tablo 3.1'de gösterildiği gibi, SPA ve SPB'deki karbon ve nitrojen yüzdeleri oldukça benzerdi, SPA en yüksek seviyeleri ve SPC en düşük seviyeleri gösteriyordu. Seçilen kolon olan SPB'yi referans alırsak, %18,75 karbon ve %1,97 nitrojenin varlığı, silikanın etkili yüzey modifikasyonunu açıkça gösterir. Bu sonuç, FTIR verileriyle de desteklenmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: SP1A-C'nin FTIR spektrumu

Üç sabit fazın FTIR spektrumları, sırasıyla 2960, 2965 ve 2970 cm^{-1} 'de karakteristik $-\text{CH}_2-$ germe sinyalleri gösterdi. Boş silika spektrumunda gözlemlenen 1657 cm^{-1} 'deki belirgin bant, SPA-C'de neredeyse yoktu, bu da silika yüzey kimyasında önemli bir değişiklik olduğunu gösteriyor. Beklendiği gibi, tüm spektrumlarda $-\text{OH}$ sinyalleri mevcuttu. Bu sinyaller, silika yüzeyindeki kalıntı silanol gruplarından veya sabit faz yapısına dahil edilen hidroksil işlevlerinden kaynaklanabilir. Özellikle, $-\text{OH}$ bandı boş silikada yoğundu, ancak SPA-C'de önemli ölçüde daha zayıf görünüyordu.

Toplamda, elementel ve FTIR analizleri, üç sabit fazın da başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. SEM ve BET yüzey alanı analizi de dahil olmak üzere daha ileri karakterizasyon teknikleri, yalnızca SPB sabit fazı için gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Hazırlanan durağan fazların temel bileşimi

Öge	Element bileşimi %		
	C	H	N
Boş silika	0	0.01	0
SPA	22.6	4.21	2.19
SPB	19.34	3.61	2.02
SPC	13.45	2.53	1.36

Tablo 3.2: DEA-Mix SP'nin BET yüzey karakterizasyonu

BET Analizi	Boş Silika	DEA-Karışım SP (B)
BET yüzey alanı (m ² /g)	320	141
Toplam gözenek hacmi (cm ³ /g)	0.9	0.26207
Ortalama gözenek çapı (Å)	110	76

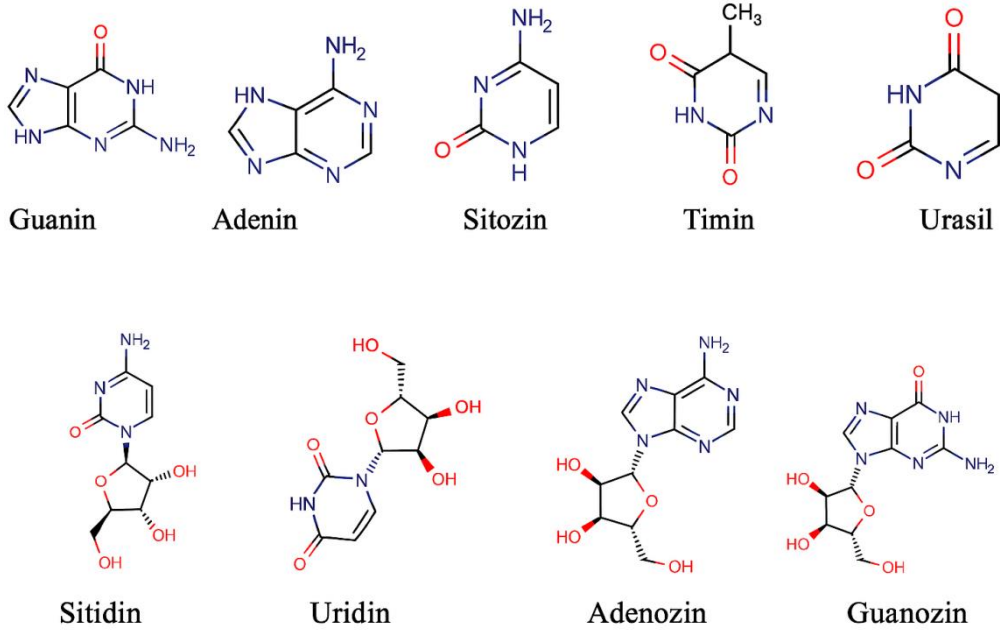
Ürün sertifikasında verilen nitrojen adsorpsiyon verilerine göre, modifiye edilmemiş Kromasil silika, 320 m²/g yüzey alanı, toplam 0,90 mL/g gözenek hacmi ve ortalama 110 gözenek çapı sergiler. Bununla birlikte, organik bir ligand ile yüzey modifikasyonundan sonra, bu parametrelerde önemli bir azalma gözlenmiştir (Tablo 3.2). Modifikasyonu takiben, yüzey alanı 141 m²/g'ye düştü, toplam gözenek hacmi 0.26 mL / g'ye düştü ve ortalama gözenek çapı 76'ya düşürüldü. Bu sonuçlar, modifikasyon işlemi sırasında organik ligandın gözenek yüzeylerine başarılı bir şekilde sabitlendiğini ve iç gözenekli yapıyı kısmen doldurduğunu göstermektedir. Özellikle, gözenek hacmindeki yaklaşık %70'lik azalma, gözenek boşluğunun önemli bir bölümünün ligand molekülleri tarafından kaplandığını ve bazı gözeneklerin tamamen tıkanmış olmasının muhtemel olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ortalama gözenek çapındaki azalma, gözeneklerin tamamen yok olmadığını, aksine daraldığını ima eder, bu da ligandın ağırlıklı olarak gözenek duvarları boyunca biriktiği bir biriktirme modeline işaret eder. Bu davranış, modifikasyon işleminin silika yüzeyi boyunca nispeten homojen bir kaplama ile sonuçlandığı ve malzemenin iç yapısını etkili bir şekilde değiştirdiği fikrini desteklemektedir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular, yüzey modifikasyonunun sadece silikanın fiziksel özellikleri üzerinde değil, aynı zamanda gözenekliliği üzerinde de belirgin bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu değişikliklerin kapsamı, işlevselleştirme işleminin verimliliğini açıkça gösterir ve organik ligandın silika matrisine başarılı bir şekilde dahil edildiğini doğrular.

Bu çalışmada kullanılan silika jel, düzgün şekilli, küresel parçacıklar ile karakterize edilen HPLC kalitesindeydi. Kimyasal yüzey modifikasyonları, parçacık parçalanması, asimetri veya boyuttaki değişiklikler gibi morfolojik deformasyonlara neden olma potansiyeline sahip olduğundan, modifikasyon işleminden kaynaklanan herhangi bir yapısal değişikliği değerlendirmek için SEM kullanılmıştır. EK-2'de gösterildiği gibi, hem modifiye edilmemiş ticari silikanın (A) hem de modifiye edilmiş DEA-Mix SP varyantının (B) SEM mikrografları, partikül morfolojisinin bozulmadan kaldığını ortaya koymaktadır. Herhangi bir bozulma, toplanma veya önemli boyut değişikliği belirtisi gözlenmedi. şekil ve dağılımdaki bu tutarlılık, kimyasal modifikasyonun silika parçacıklarının fiziksel bütünlüğünü olumsuz etkilemediğini doğrular ve böylece işlevselleştirme yaklaşımının güvenilirliğini ve başarısını destekler.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. HPLC Değerlendirmeleri

4.1.1. HILIC koşulları altında nükleobazların HPLC değerlendirmesi



Şekil 4.1: Bu çalışmada incelenen nükleobazların/nükleositlerin yapıları

Nükleobazlar ve nükleositler, nispeten güçlü polariteye sahip bileşiklerdir, bu da zayıf hidrofobik etkileşimler nedeniyle geleneksel RPLC kolonları kullanılarak etkili bir şekilde tutulmalarını ve ayrılmalarını doğal olarak zorlaştırır. Buna karşılık, hidrofilik etkileşim sıvı (HILIC), bu tür yüksek polar analitleri ayırmak için daha uygun bir platform sağlar. Bu nedenle, nükleobazlar ve nükleositler, HILIC koşulları altında karma modlu durağan fazların performansını değerlendirmek için güvenilir model bileşikler olarak yaygın olarak kabul edilmektedir.

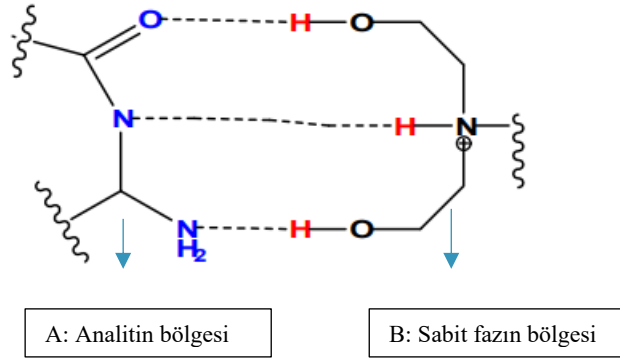
Bu çalışmada, bu polar analitler, yeni geliştirilen kolon DEA-Mix SP durağan fazının alıkonma davranışını araştırmak için seçilmiştir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, timin, urasil, üridin, adenin, adenosin, guanin, guanozin, sitozin ve sitidin içeren dokuz bileşenli bir karışım, DEA-Mix SP kolonu kullanılarak analiz edildi. İzokratik koşullar

altında, dokuz bileşiğin tümü 2 mL/dk'lık bir akış hızında 92/8 oranında asetonitril ve fosfat tamponundan (5 mM, pH 7.5) oluşan bir mobil faz kullanılarak 15 dakika içinde başarılı bir şekilde ayrıldı (Şekil 4.3). Aynı ayırma işlemi fosfat tamponu olmadan, sadece asetonitril ve su kullanılarak gerçekleştirildiğinde, analiz 12 dakika içinde tamamlanmıştır (Şekil 4.3). Bununla birlikte, tampon içeren mobil faz kullanıldığında daha keskin pik şekilleri ve iyileştirilmiş çözünürlük gözlemlendi, bu da bu koşullar altında daha verimli bir ayırma olduğunu gösteriyor.

Bununla birlikte, yeşil analitik kimyanın artan önemi göz önüne alındığında, yalnızca su ve asetonitrilden oluşan tamponsuz bir mobil fazın kullanılması da çevresel açıdan değer taşımaktadır. Bu nedenle, her iki ayırma koşulu da optimize edilmiş seçenekler olarak sunuldu. EK-1'de gösterildiği gibi, nükleobazlar ve nükleositler için normalleştirilmiş teorik plaka sayıları (N/m) 26.000 ile 33.000 arasında değişirken, pik simetri değerleri çoğunlukla 1.00'e yakındı ve 1.00 ile 1.17 arasında değişiyordu. Bu kromatografik parametreler, yeni geliştirilen DEA-Mix SP kolonunun mükemmel ayırma verimliliğini ve analitik güvenilirliğini açıkça vurgulamaktadır.

DEA-Mix SP kolonundaki analitlerin alıkonma süreleri ile polariteleri (logD) arasında açık ve tutarlı bir ilişki gözlenmemiştir. Alıkonma süreleri (EK-1), logD (EK-18) ve logS değerleri (EK-19) ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir korelasyon kurulamamıştır. Örneğin, en düşük logD değerine (-2.80) sahip en hidrofilik analit olan sitidin, yedinci dereceden ayrıldı. Benzer şekilde -2.42'lik nispeten düşük bir logD ile üridin ikinci sırada yer alırken, guanozin (-2.71) en son ortaya çıkan oldu. Bununla birlikte, üridin ve adenosin hariç, nükleositler, karşılık gelen nükleobazlardan daha uzun süre kolon üzerinde kalma eğilimindedir gibi genel bir eğilim ortaya çıkar. Bu, hidrofilik riboz kısmının, sabit faz ile hidrojen bağı yoluyla alıkonmayı artırabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, önemli kanıtlar, alıkonma sürelerini yöneten birincil etkileşimin riboz grubundan ziyade pürin ve pirimidin halkalarını içerdiğini göstermektedir. Örneğin, adenosin, bir riboz parçasına sahip olmasına rağmen, adenin'den önce ayrıştırılır, bu da ribozun tek başına alıkonmayı önemli ölçüde etkilemediğini ima eder. Ayrıca, guanin, guanozin, sitozin ve sitidin en güçlü tutulan analitler arasında olup Şekil 4.2'de "A" olarak etiketlenmiş ortak bir yapısal motifi paylaşır. Bu motif muhtemelen gözlemlenen güçlü bağlamaya önemli bir katkıda bulunuyor. Adenin bir karbonil grubundan yoksun olsa da, yapısı hidrojen bağı yapabilen

nitrojen atomları içerir ve potansiyel olarak benzer etkileşimlere girmesine izin verir. Özellikle, bir riboz birimi içermeyen guanin, hala ikinci en yüksek alıkonmayı sergiledi ve sekizinci oldu, aromatik baz yapısının durağan faz ile etkileşimdeki merkezi rolünü güçlendirdi.



Şekil 4.2: DEA-Mix SP ile nükleobazların/nükleositlerin bazı analitleri için önerilen etkileşim mekanizması

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, bu yapısal birim hem laktam tipi bir amid grubu hem de bir ekzosiklik birincil amin içerir. Karbonil oksijen, birincil amin ve amid nitrojeni, sabit faz ile potansiyel bir üç noktalı etkileşim oluşturuyor gibi görünmektedir. Hidroksil grupları yoluyla hidrojen bağı iyi kurulmuş olsa da, merkezi etkileşim ya hidrojen bağı ya da iyonik çekim içerebilir. Bu, durağan fazdaki amino grubunun yaklaşık 3-4'lük bir pKa'ya sahip olduğu ve pH 7.5'te tamamen protonlanmasını sağladığı göz önüne alındığında özellikle akla yatkındır. Bu arada, A ünitesinin amid yapısındaki nitrojen, 4-5 aralığında bir pKa'ya sahip bir proton taşır, bu da aynı koşullar altında büyük ölçüde protondan arındırılacağı anlamına gelir. Bu nedenle, bu iki bölge arasında güçlü bir iyonik etkileşim olması muhtemeldir. İster iyonik kuvvetler ister hidrojen bağı tarafından yönlendirilsin, böyle bir üç noktalı etkileşim, özellikle güçlü alıkonma davranışı ile sonuçlanacaktır.

Ek olarak, sabit faz ayrıca üçüncül hidroksilleri ve diğer hidrofilik fonksiyonel grupları içerir. Benzer şekilde, analitler, analite özgü ikincil etkileşimlere katılabilen çeşitli polar ve polar olmayan kısımları içerir. Örneğin, adenin ve adenosin arasındaki alıkonma farkı, durağan faz ile doğrudan etkileşimlerinden ziyade mobil fazdaki çözünürlük özellikleriyle daha iyi açıklanıyor gibi görünmektedir. Adenin, adenozone ($\log S = -1.31$) kıyasla suda ($\log S = -1.74$) önemli ölçüde daha düşük çözünürlüğe sahiptir (EK-19). Her iki bileşik de asetonitrilde az çözünür olmasına rağmen, adenozone biraz daha

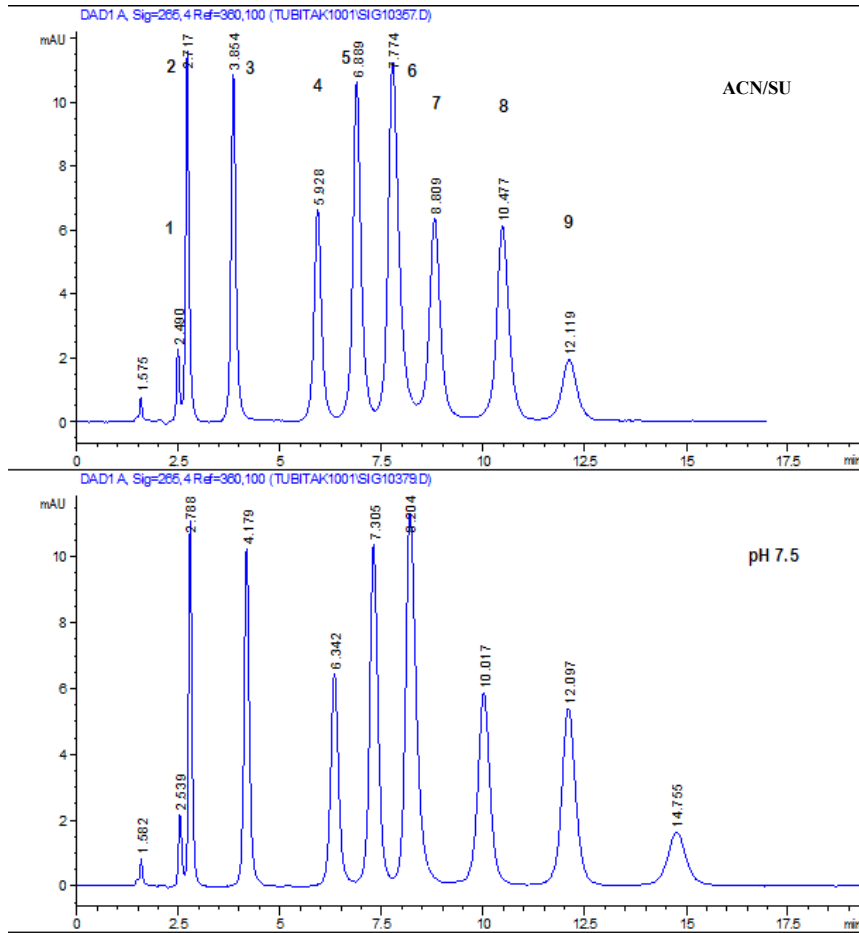
iyi çözünürlük gösterir. Sonuç olarak, her iki molekülün de durağan faz ile benzer ve zayıf bir şekilde etkileşime girdiği göz önüne alındığında, alıkonmadaki fark, ACN/su mobil faz karışımındaki çözünürlüklerine bağlanabilir. Daha iyi çözünmüş adenozin, durağan faz ile etkileşimin azalması nedeniyle daha erken ortaya çıkar.

Tüm bu çoklu etkileşimlerde, analitlerin güçlü bir şekilde etkileşime girdiklerinde uzamsal konumları ve konformasyonları büyük önem taşır. Etkileşimin aynı anda meydana geldiği noktaların sayısı, ilgili atomlar ve birlikte meydana gelen etkileşim türleri, büyük olasılıkla analitlerin bu uzamsal konumlarını ve konformasyonlarını belirler. Bu nedenle, etkileşim mekanizmasının yalnızca logD ve logS ile açıklanamayacak kadar karmaşık olduğu, birden fazla eşzamanlı etkileşimi içerdiği ve klasik RPLC veya HILIC yöntemleriyle uyumlu olmadığı açıktır. Bu yeni karma modlu kolonun etkileşim mekanizmasının ayrıntılı bir incelemesi aşağıdaki bölümlerde sunulmuştur.

Nükleobaz ve nükleosit ayrımları ile ilgili literatürün gözden geçirilmesi, en etkili kolonların tipik olarak 5 ila 9 analiti 8 ila 15 dakika içinde çözdüğünü ortaya koymaktadır (Dinh vd., 2011; Kotani vd., 2012; Lemasson vd., 2018; Liu, S. vd., 2015; Wang vd., 2016). Bununla birlikte, bazı raporlar önemli ölçüde daha uzun ayırma sürelerine işaret etmektedir. Örneğin, 25 dakikada beş analit (Li vd., 2016), 25 ila 35 dakikada sekiz analit (Wang vd., 2016; Zhang vd., 2016) ve 40 dakikaya kadar süren dokuz analit (Wang vd., 2015). Araştırma grubumuz daha önce çeşitli yeni geliştirilen karışık modlu durağan fazları kullanarak nükleobaz / nükleosit karışımlarının başarılı bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır (Aral vd., 2015, 2017; Mümin vd., 2022). Bunlar arasında en verimli sonuçlar, altı analitin 10 dakika içinde, yedi analitin ise 22 dakika içinde ayrıldığı bir çalışmada elde edildi. Gua ve Gaiki, 10 mM amonyum asetat ile 85/15 ACN/su mobil fazı, 30 °C'lik bir kolon sıcaklığı, 1.5 mL/dk'lık bir akış hızı ve 248 nm'de UV tespiti kullanarak dört farklı ticari HILIC kolonunda nükleobaz/nükleosit karışımlarının alıkonma davranışını değerlendirdi (Guo ve Gaiki, 2005). Çalışmalarında, beş ila altı analit 7-12 dakika içinde ayrıldı. Bu çalışmada değerlendirilen dört kolonun da en iyi bilinen ticari HILIC kolonları arasında yer aldığını belirtmekte fayda var. 2023 yılında yapılan bir çalışmada, Zhou ve ark. polar gömülü bir fenil-dendritik sabit faz sentezledi ve bunu çeşitli polar ve polar olmayan bileşiklerin ayrılması için test etti. Bu çalışmada, beş bileşenli bir nükleobaz / nükleosit karışımı yaklaşık 15 dakika içinde ayrıldı. Benzer şekilde, Wang ve ark. 2024'te

yapılan bir araştırma, karışık modlu alıkonma davranışını keşfetmek için İki katyonlu bir iyonik sıvı ile modifiye edilmiş yeni bir sabit faz sunulmuştur. Bulgularında, altı bileşenli bir nükleobaz / nükleosit karışımı 20 dakika içinde ayrıldı.

Birlikte ele alındığında, bu literatür bulguları yeni geliştirdiğimiz DEA-Mix SP sabit fazımızın yüksek performansının altını çizmektedir. 9 bileşenli bir nükleobaz / nükleosit karışımını sadece 12 (veya 15) dakikada başarılı bir şekilde ayırırken, etkileyici teorik plaka sayıları (26.000-33.000) ve neredeyse ideal pik simetrileri elde etmesi, oldukça umut verici bir sonucu temsil ediyor. Kapsamlı incelememize dayanarak, DEA-Mix SP, nükleobaz/nükleosit ayrımları için mevcut en etkili kolonlardan biri olarak güvenle kabul edilebilir.



Şekil 4.3: DEA-Mix SP üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin iki farklı optimum koşul altında ayrılması. Koşullar: ACN/su ve ACN/tampon (5 mM, pH 7.5 fosfat):92/8, 2.0 ml/dk, 10 °C, 2 µL, 265 nm. Analitler: 1; Timin, 2; Urasil, 3; Üridin, 4; Adenosin, 5; Sitozin, 6; Adenin, 7; Sitidin, 8; Guanin, 9; Guanozin.

4.1.1.1. Mobil faz içeriğinin etkisi

Mobil fazın bileşimi, analit-durağan faz etkileşimlerinin anlaşılmasında ve ayırma koşullarının optimize edilmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu, suda iyi çözünürlüğe sahip yüksek polar bileşikler için özellikle önemlidir, çünkü mobil fazdaki su ve organik çözücü arasındaki denge, hem alıkonma davranışını hem de ayırma verimliliğini doğrudan etkiler. Bu çalışmada, yeni geliştirilen karma modlu sabit fazın ayırma performansını daha iyi değerlendirmek için, mobil fazdaki ACN içeriği sistematik olarak %80 ile %92 arasında değiştirildi. Bu, mobil faz bileşiminin hem etkileşim mekanizmalarını hem de kromatografik seçiciliği nasıl etkilediğinin ayrıntılı bir incelemesine izin verdi.

Bu yeni karma modlu HPLC sabit fazı kullanılarak, dokuz bileşenli bir nükleobaz ve nükleosit karışımı başarıyla ayrıldı. Değişen ACN içerikleri altında elde edilen kromatogramlar (EK-13), alıkonma süresi eğilimleri (EK-3) ile birlikte, analit-sabit faz etkileşimlerinin mobil faz bileşiminden nasıl etkilendiğini açıkça göstermektedir. Mobil fazdaki ACN oranı azaldıkça, analitlerin çözünürlüğü, özellikle suda yüksek oranda çözünür olanlarda artmıştır. Bu, hidrofilik durağan faz için bağlanma eğilimlerini azalttı ve daha kısa alıkonma sürelerine neden oldu.

Düşük ACN koşulları altında kaydedilen kromatogramlar, daha yakın aralıklı zirveler ve daha kısa elüsyon süreleri gösterdi. Bu davranış, suda daha fazla çözünür olan analitlerin, durağan faz ile daha az güçlü etkileşime girdiğini ve daha hızlı bir şekilde ayrıştırıldığını göstermektedir. Buna karşılık, ACN içeriğinin artırılması, mobil fazdaki su oranını azalttı, böylece analit çözünürlüğünü düşürdü ve sabit faz ile etkileşimlerini artırdı. Sonuç olarak, alıkonma süreleri uzadı ve bitişik pikler arasındaki mesafe arttı.

Özellikle, alıkonma süreleri arttıkça, genel elüsyon sırası tutarlı kaldı. Bununla birlikte, pik noktaları arasındaki daha büyük boşluk, ayırma seçiciliğinin artmasına yol açtı ve bu da sistemin yüksek ACN koşulları altında daha seçici hale geldiğini gösterdi.

Grafiksel verilerin (EK-3) ve üst üste binen kromatogramların (EK-13) analizi, en yüksek sürelerinin %92 ACN içeren mobil faz koşulu altında gözlendiğini ortaya koymuştur. Bu koşullar altında, pikler arası mesafe artarak maksimum düzeye ulaşmış ve pik çözünürlüğünde belirgin bir iyileşme sağlamıştır. Sonuç olarak, analitler arasındaki

girişimler en aza indirildi ve genel seçicilik belirgin şekilde iyileştirildi. Bu kromatografik davranış, HILIC ayırma mekanizmasının bilinen özellikleri ile güçlü bir uyum içindedir.

Özetle, mobil fazdaki ACN/su oranı, analit-durağan faz etkileşimlerinin doğasını ve gücünü yöneten kritik bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. ACN içeriğinin artırılması, hem seçiciliği hem de en yüksek çözünürlüğü artırırken aynı anda daha uzun alıkonma sürelerine yol açtı. Optimum ayırma performansı, %92 ACN koşulu altında elde edildi. Bu sonuç, yeni geliştirilen karma modlu sabit fazın, karmaşık analit karışımlarının yüksek çözünürlüklü ve seçici olarak ayrılmasını sağlayarak, HILIC ve RPLC özelliklerini etkili bir şekilde dengeleme yeteneğini vurgulamaktadır.

Genel olarak, bu bulgular, ayırma kalitesi ve verimliliği açısından önemli faydalar sağlayabileceğinden, özellikle yüksek suda çözünürlüğe sahip polar bileşiklerle uğraşırken, mobil faz bileşiminin dikkatli bir şekilde optimize edilmesinin önemini vurgulamaktadır.

4.1.1.2. Akış hızının etkisi

Optimum mobil faz bileşiminin (ACN/su, 92:8 v/v) belirlenmesinin ardından, bir sonraki adım akış hızının optimize edilmesini içeriyordu. Mobil faz ve kolon sıcaklığı sabit tutulurken (ACN/su 92:8 v/v, 20 °C), 0,2 mL/dk'lık artışlarla 0,8 ila 2,0 mL/dk arasında değişen yedi farklı akış hızında bir dizi analiz gerçekleştirildi (EK-14). Elde edilen veriler, alıkonma davranışının akış hızının bir fonksiyonu olarak nasıl değiştiğini araştırmak için çizilmiştir (EK-4).

Hem EK-4 hem de EK-14'te gösterildiği gibi, akış hızındaki bir artış, alıkonma sürelerinde bir azalmaya yol açar. Özellikle, bu düşüş doğrusal bir eğilim izlemez, daha ziyade üstel bir model sergiler. 0,8 ila 1,4 mL/dk arasında, alıkonma süreleri hızla düşer; bununla birlikte, 1,4 mL/dk'nın ötesinde, azalma hızı önemli ölçüde yavaşlar ve bu da kinetik veya kütle transfer sınırının yaklaştığını düşündürür. Örneğin, toplam analiz süresi 0,8 mL/dk'da 29 dakikadan 2,0 mL/dk'da sadece 12 dakikaya düşürüldü. İlginç bir şekilde, en yüksek akış hızında bile, dokuz analitin tümünün tam olarak ayrılması, seçicilik veya pik çözünürlüğünde herhangi bir kayıp olmadan sürdürüldü. Bu, nükleobazlar ve nükleositler için DEA-Mix SP kolonunun üstün ayırma kabiliyetini güçlü bir şekilde doğrular. Önemli ölçüde kısaltılmış analiz süresi ve korunan kromatografik

performans sayesinde, sonraki sıcaklık optimizasyon çalışmaları için en uygun akış hızı olarak 2,0 mL/dk seçilmiştir.

4.1.1.3. Sıcaklığın etkisi

Karışık modlu durağan fazlarda, analitlerin alıkonma mekanizmaları hem apolar hem de polar etkileşimlerin bir kombinasyonu ile şekillendirilir. Bu nedenle, sıcaklık değişimlerinin alıkonma üzerindeki etkisi daha da kritik hale gelir. Sıcaklık, mobil fazın viskozitesinden analit-faz etkileşimlerine kadar birçok parametreyi etkiler ve kromatografik ayırmayı doğrudan yönlendirir. Bu çalışmada, yüksek polar özelliklere sahip yeni geliştirilen karma modlu bir kolon üzerindeki nükleobazların sıcaklığa bağlı alıkonma davranışı ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, 10°C ile 70°C arasındaki yedi farklı sıcaklıkta (EK-15) elde edilen alıkonma faktörü (k) değerleri Van't Hoff denklemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Van't Hoff denklemi şu şekilde verilir.

$$\ln k = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / RT \quad (\text{Denklem 4.1})$$

Denklemde 4.1’de $\ln k$, alıkonma faktörünün doğal logaritmasını temsil eder; T, Kelvin cinsinden sıcaklıktır; R evrensel gaz sabitidir ve ΔH° ve ΔS° sırasıyla entalpi ve entropi değişimlerini temsil eder.

Tablo 4.1: "Van't Hoff denkleminde elde edilen ΔH° ve ΔS° değerleri

Analitler	RT sırası	ΔH°	ΔS°
Timin	1	-65,83	- 0,24
Urasil	2	-66,61	-0,21
Üridin	3	-88,26	-0,22
Adenozin	4	-88,3	-0,14
Sitozin	5	-67,54	-0,04
Adenin	6	-90,29	-0,01
Sitidin	7	-98,16	-0,11
Guanin	8	-80,33	-0,02
Guanozin	9	-96,22	-0,06

Denklem, $\ln(k)$ ve $1/T$ arasında doğrusal bir ilişkinin beklendiğini ve bu ilişkiden türetilen eğim ve kesişim değerlerinin ΔH° ve ΔS° 'yi hesaplamak için kullanıldığını göstermektedir. Van't Hoff grafiklerine (EK-5) ve elde edilen termodinamik parametrelere (Tablo 4.1) dayanarak, ΔH° değerlerinin tüm analitler için negatif olduğu

gözlemlenebilir. Bu, alıkonma işleminin ekzotermik olduğunu ve sıcaklık arttıkça alıkonma eğiliminin azaldığını gösterir. Kolonun özellikle polar bileşiklerle güçlü etkileşimler sergilediği ve bu da onu sıcaklık değişimlerine karşı oldukça hassas hale getirdiği açıktır.

Saklama sırasını değerlendirirken, timin önce yükselirken, guanozin en son yükselir. Termodinamik açıdan bakıldığında, timin -65.83 kJ/mol'de en düşük entalpi değişimini sergilerken, sitidin -98.16 kJ/mol'de en yüksek mutlak entalpi değişimini gösterir. Adenin, sitidin ve guanozin dahil olmak üzere daha sonra elüte olan analitler, -90 kJ/mol'den daha büyük entalpi değişiklikleri gösterir, bu da kolonun bu bileşiklerle daha güçlü etkileşime girdiğini gösterir. En zayıf etkileşim timin ile gözlenir. Ek olarak, üridin, sitidin ve guanozin gibi nükleosit yapısına sahip bileşikler, timin, adenin ve guanin gibi nükleobazlara kıyasla daha yüksek ΔH° değerleri gösterir. Bu, kolonun özellikle hidroksil grupları içeren polar moleküllerle daha güçlü etkileşimler kurduğunu göstermektedir.

Tüm analitler için ΔS° değerleri negatiftir, bu da alıkonma sırasında sistem bozukluğunda bir azalma olduğunu gösterir. Erken elüte olan ilk dört analit için entropi değişimi, diğer analitlere kıyasla önemli ölçüde daha negatiftir. Bu, kolonla etkileşimlerinin daha az ve daha spesifik bağlanma bölgeleri ile daha düzenli olduğunu göstermektedir. Öte yandan, adenin ve guanin gibi daha büyük analitler için daha düşük ΔS° değerleri, bağlanmalarının daha çok noktalı ve daha az düzenli olduğunu gösterir. İlginç bir şekilde, adenin ve sitidin, guanine kıyasla ΔH° açısından daha yüksek bağlanma enerjilerine sahip olmalarına rağmen, daha erken elüte olurlar. Bu, alıkonma davranışının yalnızca entalpideki değişikliklerle açıklanamayacağı anlamına gelir. Adenin daha yüksek bir negatif ΔH° 'ye sahipken, guanin daha negatif bir ΔS° 'ye sahiptir. Daha negatif entropi değerleri, moleküller arası etkileşimlerin daha organize, kararlı ve yapılandırılmış olduğunu göstermektedir. Bu durumda, bağlama daha zayıf olmasına rağmen, süreç daha "düzenli" hale gelir ve bu da sistemin serbestlik derecelerinde bir azalmaya yol açar. Adenin bağlanması daha güçlü bir moleküler etkileşim yaratsa da bağlanma sırasında daha çok noktalı ve düzensiz bir yapı oluşturur. Özetle, adenin bağlanması, guanine kıyasla daha karmaşık ancak esnek etkileşimler içerirken, guanin, genel bağlanmanın daha zayıf olmasına rağmen kolonla daha düzenli ve kararlı etkileşimler gösterir. Ek olarak, guanin, tüm nükleobazlar/nükleositler arasında mobil fazda en düşük çözünürlüğe

sahiptir. Bu nedenle, guaninin daha sonraki elüsyonu ve sıcaklık değişikliklerine daha fazla tepkisi (EK-15, EK-5), baskın rolün analit-durağan faz etkileşiminden ziyade analit-çözücü etkileşimi tarafından oynandığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada test edilen nükleobaz/nükleosit bileşikleri ile DEA-Mix SP karma modlu kolon arasındaki alıkonma davranışının, entalpi ve entropi arasındaki denge tarafından yönlendirildiği bulunmuştur. Kolonun yüksek polar karakteri nedeniyle, özellikle nükleosit bazlı analitler ve büyük fonksiyonel gruplara sahip olanlar ile güçlü etkileşimler oluşturduğu gösterilmiştir. Çok noktalı esnek etkileşimlere ek olarak, düzenli ve kararlı çok noktalı etkileşimler akılda alıkonma davranışında önemli bir rol oynar. Bu bağlamda, bu tür kolonlar için sıcaklık optimizasyonunun sadece analiz süresi için kritik olmadığı, aynı zamanda seçicilikte de çok önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

4.1.1.4. Tampon konsantrasyonunun etkisi

Mobil faz pH'ının alıkonma davranışı üzerindeki etkisini araştırmak için, kullanılacak uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi gerekir. Hem tampon konsantrasyonunun ayırma ve alıkonma davranışı üzerindeki etkisini incelemek hem de pH optimizasyonu için optimal tampon konsantrasyonunu belirlemek için, analizler 5, 10, 20 ve 40 mM konsantrasyonlarda 90/10 vv'de gerçekleştirildi: ACN/(amonyum asetat pH 5.0) 1 mL/dk akış hızında ve 20 °C'de mobil faz (EK-16), ve tampon konsantrasyonunun etkisi grafiksel olarak analiz edildi. Tampon ve pH optimizasyonları 2.0 mL/dk akış hızında değil, 1.0 mL/dk'da gerçekleştirildi. Bunun nedeni, saf su/ACN mobil faz ile 2,0 mL/dk akış hızında optimum koşulların zaten elde edilmiş olması ve bunun sonucunda son derece kısa bir analiz süresi elde edilmesiydi. Bu nedenle, bu koşul altında optimizasyona devam etmek yerine, daha ideal bir ayırma elde edilmesi beklentisi ile 1.0 mL/dk akış hızında tampon konsantrasyonu ve pH optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

EK-6'da görüldüğü gibi, tampon konsantrasyonunun tüm analitlerin süreleri üzerindeki etkisi tek tip değildi. Konsantrasyon arttıkça, adenin daha hızlı sızdı. Bu etki özellikle 0-5 mM ve 30-40 mM aralıklarında daha belirgindi. Çoğu analitin süreleri bir dereceye kadar artarken, adenin süresi azalmıştır. Böylece, adenin ve sitozin arasındaki seçicilik azaldı (EK-16). 10 mM'lik bir tampon konsantrasyonunda, bu iki analitin pik noktaları tamamen örtüşürken, 40 mM'de adenin sitozinden biraz daha erken elüte olmaya

başladı. Kolonda en çok tutulan analit olan guanozinin süresi, artan tampon konsantrasyonu ile önemli ölçüde artmıştır. 0 mM'de (tamponsuz) 17 dakika olan analiz süresi, 40 mM tampon konsantrasyonunda 22 dakikaya yükseldi.

Tampon konsantrasyonunun artmasıyla analiz sürelerindeki artış, iki potansiyel etkiye bağlanabilir. Birincisi, olası tuzlama etkisidir. Sulu fazda artan iyonik kuvvet, analitlerin etrafındaki su moleküllerini azaltarak ACN'ye doğru göç etmelerine neden olur. Bu polar bileşikler ACN'de zayıf çözünürlüğe sahip olduklarından, doğal olarak durağan faz ile daha fazla etkileşime girerler ve bu da daha uzun alıkonma sürelerine yol açar. Adenin alıkonma süresindeki azalma ki bu tam tersi bir eğilimdir, bu tuzlanma etkisi (Salting-out effect) ile de açıklanabilir. Yüksek logD değerine (-0.58) sahip olan adenin, daha sonra elüte olan diğer analitlere göre çok daha düşük polariteye sahiptir. Ayrıca suda diğer analitlere göre daha düşük çözünürlüğe sahiptir. Analitlerin ACN'ye kaymasına neden olan tuzlanma etkisi, adenin'in elüsyon sırasını değiştirmiş ve daha erken elüte olmasına yol açmış olabilir. Diğer bir olası etki, artan tampon konsantrasyonu nedeniyle sabit fazın yüzeyinde daha kalın bir tabaka oluşmasıdır (Bui, Verhage ve Irgum, 2010). Artan tampon konsantrasyonu, polar sabit fazın yüzeyindeki hidrolitik tabakayı kalınlaştırır ve bu da sabit fazın polar karakterini artırır. Sonuç olarak, bazik polar ve bazik analitler kolon üzerinde daha fazla tutulur ve daha sonra elüte edilir.

Sonuç olarak, tampon konsantrasyonunun hem süreleri hem de seçicilik üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Optimizasyon çalışmalarına dayanarak, 5 mM'lik bir tampon konsantrasyonunun pH optimizasyonu için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni, diğer konsantrasyonlarda sitozin ve adenin zirvelerinin tamamen örtüşmesi, 5 mM'de ise henüz örtüşmemiş olmalarıdır. Konsantrasyonun artırılmasının olumlu bir etkisi olmadığından, daha fazla tuz kullanmanın gereksiz olduğu sonucuna varıldı.

4.1.1.5. pH'ın etkisi

Polar durağan bir fazın etkileşim mekanizmasını araştırmanın ve anlamının en iyi yolu, pH değişikliklerine yanıt olarak etkisini incelemektir. Bu, hem analitler hem de durağan faz polar olduğunda özellikle önemli hale gelir ve pH'a göre davranışını incelemeyi kaçınılmaz kılar. Bu çalışmada, DEA-Mix SP'nin değişen pH koşulları altında nükleobazlara/nükleositlere göre davranışı, 3.0 ile 8.0 arasındaki pH seviyelerinde, 5 mM

tampon konsantrasyonu, 1 ml/dk akış hızı ve 20°C sıcaklık ile incelenmiştir. Elde edilen kromatogramlar üst üste bindirildi (EK-17) ve sonuçlar grafiklendirildi (EK-7). Adenin hariç, pH düştükçe analiz sürelerinin azaldığı ve adenin hariç tüm analitler için maksimum süresinin pH 4.0'da meydana geldiği bulunmuştur. PH 3.0'da, süreleri tekrar biraz azalmaya başladı. pH 6.5 ile 8.0 arasında, adenin hariç tüm analitler için süreleri neredeyse sabit kalırken, pH 5.75 ile 4.0 arasında analiz sürelerinde önemli bir artış gözlenmiştir. Özellikle, kolon üzerinde en çok tutulan guanozin, guanin ve sitidinin süreleri, diğer analitlere kıyasla pH 5.0 ile 4.0 arasında çok daha hızlı değişimler göstermiştir. Adenin'in diğer analitlere zıt davranması ilginç olsa da, adenin'in önceki optimizasyon deneylerinde farklı davranışlar sergilediği göz önüne alındığında, bu şaşırtıcı bir sonuç değildi. Adenin'in bu farklı davranışı, pH 4.0'da adenozin ve pH 5.0'da sitozin ile birlikte elüsyonuna yol açtı. PH 5.0 ve 8.0 arasında, adenin ve sitozin zıt yönlerde hareket etti, bu da aralarındaki mesafeyi arttırdı ve böylece seçiciliği artırdı. Sonuç olarak, en iyi ayırma pH 7.5'te elde edildi ve pH 7.5 ile 8.0 arasında önemli bir fark gözlenmedi.

pH düştükçe bazik analitlerin analiz sürelerinin artması ilginç bir sonuçtur. Bu sınıf analitlerle daha önce yaptığımız çalışmalarda pH ile paralel olarak analiz sürelerinin de arttığı gözlenmiştir (Aral vd., 2015, 2017). Düşük pH'ta, bu bazik analitlerin suda daha iyi çözünmesi ve sonuç olarak kolondan daha erken çıkması beklenir. Bununla birlikte, burada belirleyici bir rol oynayanın mobil faz ile etkileşim değil, durağan faz ile etkileşim olduğu görülmektedir. Bu ilginç sonucun kaynağının güçlü iyonik etkileşimler (katyon-dipol, katyon-anyon) olduğu düşünülmektedir. Düşük pH değerlerinde, sabit faz yapısındaki üçüncül amin grubu protonlanır. PH düştükçe, aminin protonasyonu daha kolay hale gelir. 6-8 pH aralığındaki bir mobil faz, sabit fazı yeterince katyonik hale getirmek için yeterli değildir bunun aksine, durağan fazın katyonik doğasını bastırır. Ayrıca, önceki bölümde belirtildiği gibi, durağan fazın yüzeyinde oluşan hidrolitik tabaka, durağan fazın bir parçası gibi davranır ve pH 3–5 aralığında katyonlarla olan etkileşim gücünü artırırken, pH 6–8 aralığında bu etkileşimi baskılar. Bu nedenle, mobil fazda yeterince protonlanmayan bazik analitler, pH 3-5 aralığındaki iyonik etkileşimler yoluyla durağan faz ile güçlü bir şekilde etkileşime girer ve daha sonra kolondan elüte olur.

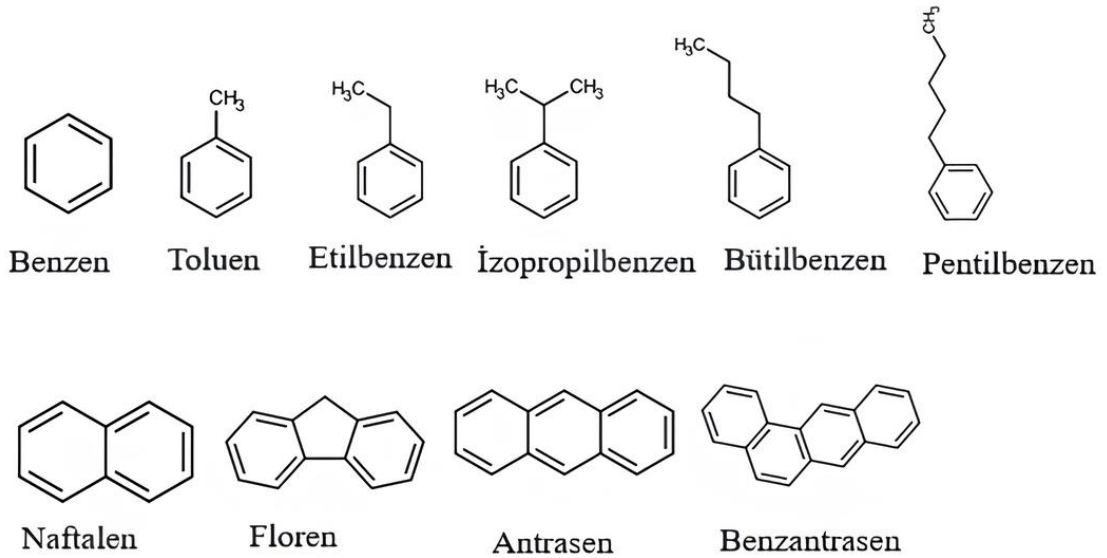
Analitler neden durağan fazdaki amin grubu gibi protonlanmıyor? Numune çözeltisinin saf suda hazırlanması, mobil fazın sadece %10'unun sudan oluşması ve tamponun 5 mM'deki düşük iyonik konsantrasyonu, analitlerin kısa bir süre içinde tamamen protonlanmasını engelleyen bariyer görevi görür. Sonuç olarak, analiz süresi toplam 15 dakikadır ve analitler, 5-15 dakika boyunca %10 seyreltilmiş bir tampon içeren ACN ile muamele edilirken, sabit faz saatlerce mobil faz ile şartlandırılır. Analiz, mobil faz kolon üzerine iyice yerleştikten sonra başlar. Bu nedenle, 5 mM %10 sulu tampon-ACN çözücüsünün sabit faz üzerindeki protonlama etkisi önemlidir. Bu etki, durağan fazda güçlü bir katyonik yapıya yol açar ve analitlerin kısmen protonlanmasına ancak yine de serbest amin grupları taşınmasına neden olur. Bu da analitler ve durağan faz arasında katyon-dipol etkileşimleri ile sonuçlanır.

pH 5'ten 4'e hareket ettikçe analiz sürelerindeki hızlı artış, ek bir değişikliğin meydana geldiğini gösterir. EK-1'de görüldüğü gibi, çoğu analitin ilk pKa değerleri yaklaşık olarak 4 civarındadır. Bu nedenle, pH 5'in altında, protonlanmış formlar baskın olmaya başlar, bu da hem sabit fazın katyonik amini ile iyonik olarak etkileşime giren aminlerin hem de anyonik ve/veya dipol etkileşimlerinin varlığına ve ayrıca analitlerdeki katyonik grupların protonlanmış aminlerin oranındaki artışa bağlı olarak durağan fazın hidroksil oksijen atomları ile etkileşime girme olasılığına neden olur. Yani, pH 4-5 bölgesinde, çift yönlü anyon-katyon, katyon-dipol ve hidrojen bağı aynı anda meydana gelebilir. pH 3.0'da, analitlerin protonasyonu daha belirgin hale geldiğinde, durağan faz ile anyon-katyon ve dipol-katyon etkileşimleri azalabilir ve hatta belki de katyon-katyon itmeleri başlayabilir. Bu, pH 4.0'dan 3.0'a geçerken analiz sürelerinde hafif bir azalmaya neden olabilir.

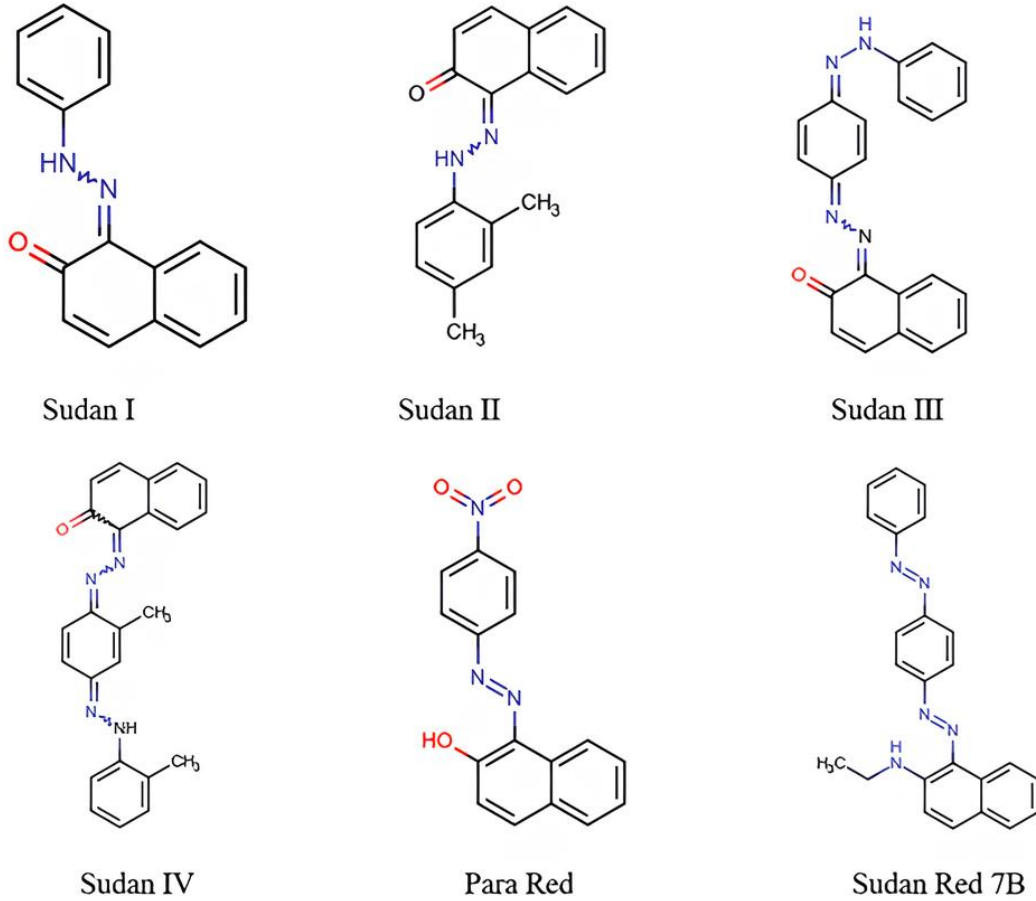
pH ile sürelerindeki değişiklikler ile logD (EK-18) ve logS (EK-19) değerleri arasında makul bir korelasyon yoktur. Analitlerin çoğunun logD ve logS değerleri 2-8 pH aralığında değişmezken, adenosin, adenin ve sitozinin logD değerleri pH 3-6 arasında azalır ve logS değerlerinde paralel bir artış olur. Kısmen, sitidinin sadece logD ve logS değerleri pH 3-4 aralığında değişiklikler gösterir. EK-18 ve EK-7'de açıkça görüldüğü gibi, pH değişikliklerinden en çok etkilenen dört analit özellikle adenin'dir. PH 3-4 arasında, guanin ve sitidin ile adenin ve adenosin örtüşür. Sitidin ve guanin pH 5'ten başlayarak ayrılırken, adenosin-adenin-sitozin arasındaki etkileşim sadece pH 6.5'te sona erer.

Bu sonuçlar, pH değışikliklerinin etkileşim mekanizması üzerindeki etkisinin, logD ve logS ile açıklanamayacak kadar karmaşık olduğunu ve çeşitli etkileşim türlerinin rol oynadığını göstermektedir. Sabit faz, analit ve mobil faz arasında sürekli bir etkileşim vardır. İyonik etkileşimler düşük pH'ta baskınken, durağan fazın iyonik karakteri daha yüksek pH'da bastırılır. Sonuç olarak, en iyi seçiciliği elde etmek için en uygun koşul pH 7.5'tir. Bu koşul altında, 9 analitin başarıyla ayrıldığı 20 dakikalık bir analiz süresi gözlemlendi. pH optimizasyon deneyleri 1.0 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Tamponsuz mobil faz ile yapılan optimizasyon deneylerinde, akış hızı 2.0 mL/dk olarak seçildi ve analiz süresi 12 dakika oldu. Bu nedenle, 2.0 mL/dk'lık bir akış hızına sahip pH optimizasyon deneylerinden elde edilen optimum koşul altında yeniden analiz gerçekleştirildi ve şekil 4.3'te sunulan ikinci optimum koşul ile sonuçlandı.

4.1.2. Alkilbenzenler, PAH'lar ve Sudan Boyaların HPLC değeriendirme



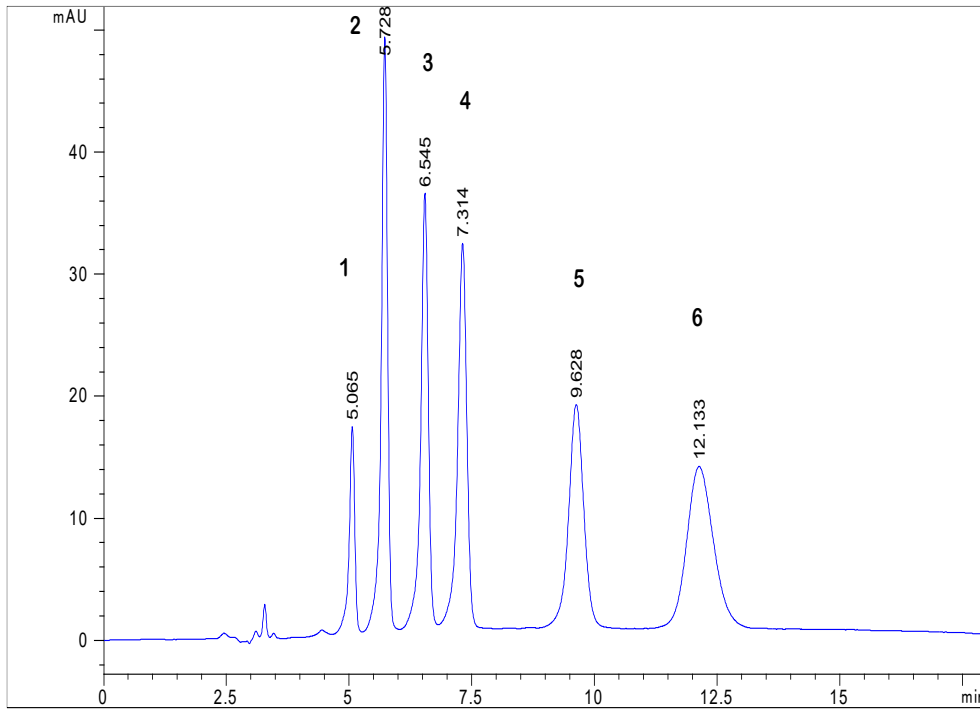
Şekil 4.4: Bu çalışmada incelenen apolar bileşiklerin (Alkilbenzenler ve PAH'lar) yapıları



Şekil 4.5: Bu çalışmada incelenen Sudan boyalarının yapıları

Alkil benzenler ve PAH'lar (Şekil 4.4), tamamen hidrofobik ve nötr yapıda olan bileşik sınıflarıdır. Bu özelliklerinden dolayı, yeni geliştirilen kolonların ters faz kromatografik davranışını değerlendirmek için kullanılan birincil model analitler arasında yer alırlar. Bu bileşikler RPLC kolonları kullanılarak etkili bir şekilde ayrılabilirken, tamamen HILIC kolonları üzerinde ayrılmaları önemli ölçüde daha zordur. Bu çalışmada, DEA-Mix SP kolonunun ters faz performansını değerlendirmek için benzen, toluen, etilbenzen, kümen, butilbenzen ve pentilbenzen olmak üzere altı farklı alkilbenzen türevi içeren bir karışım kullanıldı. Çeşitli mobil faz bileşimleri, akış hızları ve sıcaklıklarla yapılan testlerin ardından, 20 °C'de 40/60'luk bir ACN/su oranı kullanılarak, 210 nm'lik bir algılama dalga boyu ve 1.0 mL/dk'luk bir akış hızı kullanılarak optimum ayırma elde edildi. Şekil 4.6'da gösterildiği gibi, bu optimize edilmiş koşullar altında, altı alkilbenzen bileşiğinin tümü 13 dakika içinde başarıyla ayrıldı. Analitlerin elüsyon sırası, daha fazla hidrofobik bileşiğin (yani, daha yüksek logD değerlerine sahip olanların) kolon üzerinde daha uzun süre tutulduğu klasik ters faz kromatografi

prensipleriyle tutarlıydı (EK-1). Ek olarak, benzen halkasına bağlı alkil zincirinin uzunluğu arttıkça, bileşiklerin alıkonma süresinin de arttığı gözlemlenmiştir.



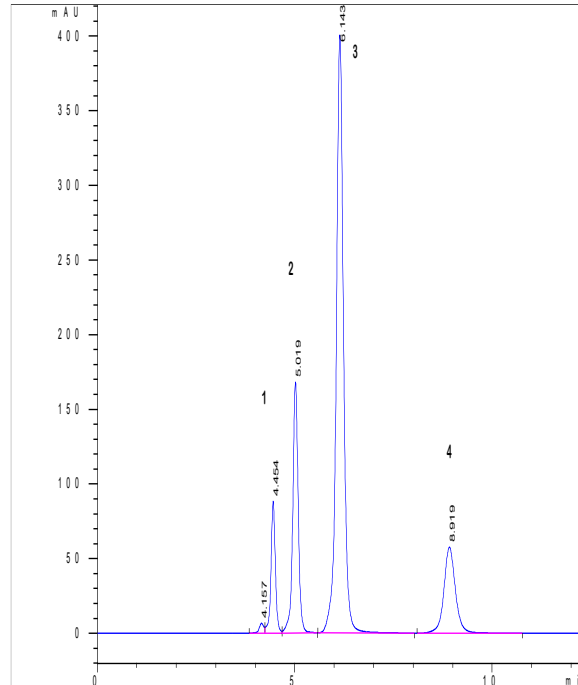
Şekil 4.6: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde alkil benzenlerin ayrımı. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 40–60, akış hızı: 1.0 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 3 µL, dedeksiyon dalga boyu: 210 nm. Analitler: 1; Benzen, 2; Toluen, 3; Etilbenzen, 4; Kümen, 5; Bütilbenzen, 6; Pentilbenzen.

Kolonun RPLC özelliklerini değerlendirmek için kullanılan ikinci sınıf analitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlardan (PAH'lar) oluşuyordu. Bu bileşikler, çok yüksek hidrofobiklik ile sonuçlanan çoklu aromatik halkalar içerir. Sonuç olarak, durağan faz güçlü hidrofobik etkileşimler sağlamadıkça, bunların tutulması ve ayrılması oldukça zor hale gelir. Bu çalışmada naftalin, floren, antrasen ve benz[a]antrasen içeren bir test karışımı kullanılmıştır. Şekil 4.7'de gösterildiği gibi, ACN/su (55/45), 20 °C, 1.0 mL/dk akış hızı ve 254 nm algılama dalga boyu koşulları altında, bu dört bileşik 11 dakika içinde başarıyla ayrıldı. Analitlerin elüsyon sırası, klasik ters faz kromatografisi mekanizmaları ile net bir hizalama göstererek, ilgili logD değerleri ile tam korelasyon sergiledi.

DEA-Mix SP kolonunun RPLC performansını değerlendirmek için kullanılan üçüncü analit sınıfı, Sudan boyalarından oluşuyordu (Şekil 4.5). Bu bileşikler yapılarında aromatik halkalar içerir ve sağlığa zararlı etkileri ile bilinir, ancak gıda endüstrisinde renklendirici olarak sıklıkla kullanılır. Yüksek hidrofobik yapıları ve geniş konjuge

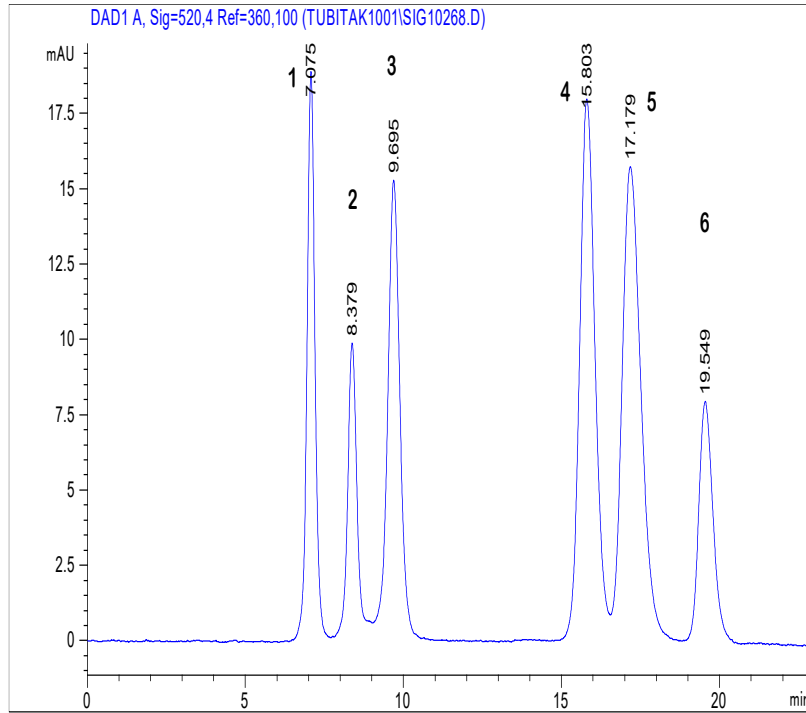
aromatik sistemleri nedeniyle, geleneksel ters fazlı kolonlar kullanılarak kolayca ayrılabilirler, ancak HILIC kolonları kullanılarak ayrılmaları çok zordur. Bu nedenle, bu tür bileşikler karışık modlu bir kolon kullanarak ayırma yeteneği büyük önem taşımaktadır. Önceki çalışmalarımızda, orta tip karma modlu kolonların (Aral vd., 2014; Mümin vd., 2022) dört bileşenli bir Sudan I-IV karışımını 12-13 dakika içinde başarıyla ayırdığını gösterdik. Ancak dörtten fazla analitin ayrılması sağlanamamıştır. Bu çalışmada, DEA-Mix SP'nin RPLC kabiliyetini daha fazla değerlendirmek ve ayırma mekanizmasını daha iyi anlamak için test karışımı olarak altı Sudan boyası (Şekil 4.5) seçilmiştir.

Deney koşullarının optimizasyonunu takiben, altı Sudan boyası, 15 ° C'de, 1.0 mL/dk'lık bir akış hızı ve 520 nm'de algılama ile bir gradyan mobil ACN / su fazı kullanılarak yaklaşık 20 dakika içinde başarıyla ayrıldı (Şekil 4.8). Elüsyon sırası, logD değerlerine uygun olarak, en hidrofobik bileşiğin en son ayrıştırıldığı klasik ters faz kromatografik davranışı ile tutarlıydı. Bu sonuçlar, DEA-Mix SP'nin bu yüksek derecede apolar bileşikler klasik bir RPLC etkileşim mekanizması yoluyla ayırmada oldukça etkili olduğunu göstermektedir.



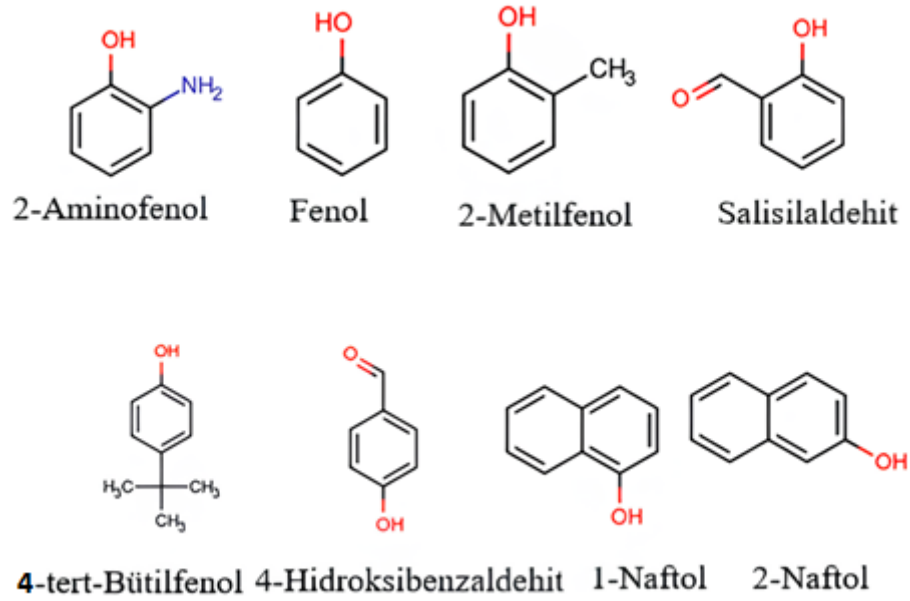
Şekil 4.7: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde PAH'ların ayrımı. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 55/45, sıcaklık: 20 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 3 µL, dedeksiyon dalga boyu: 254 nm. Analitler: 1; Naftalen, 2; Florén, 3; Antrasen, 4; Benz(a)antrasen.

Kromatografik parametreler, yeni kolonun apolar bileşiklere karşı yüksek performansını açıkça göstermektedir. Alkil benzen grubunda, pentilbenzen ve butilbenzen sırasıyla 18.871 ve 9.692 N/m teorik plaka sayıları sergilerken, geri kalan analitler 30.000 ila 40.000 N/m aralığında değerler gösterdi. PAH'lar için plaka numaraları 20.000 ila 36.000 N/m arasında değişirken, Sudan boyaları için 16.000 ila 40.000 N/m arasında değerler elde edildi. Genel olarak, N/m değerlerinin çoğu 30.000'i aştı ve bu da yüksek kolon verimliliğini gösterdi. Analitlerin butilbenzen hariç pik asimetri (As) değerleri çoğunlukla 1.00 ile 1.20 arasındaydı ve çoğunluğu 1.10'un altına düşüyordu. Sadece butilbenzen, 1.36 gibi nispeten yüksek bir As değeri sergiledi. Bununla birlikte, tek tek analiz edildiğinde, butilbenzen 1.20'nin altında As değerleri verdi ve daha da yüksek N / m değerleri gösterdi. Bununla birlikte, tutarlılığı korumak için, sadece karışım için kullanılan ayırma koşulları altında elde edilen değerler EK-1'de sunulmuştur. Sonuç olarak, 40.000'e ulaşan teorik plaka sayıları ve 1.00'e yaklaşan pik simetri değerleri ile DEA-Mix SP kolonu, yüksek apolar bileşiklerin üç sınıfına karşı da mükemmel performans gösterdi. Polar nükleobazları/nükleositleri ayırmadaki olağanüstü performansına ek olarak, bu apolar bileşikleri verimli bir şekilde çözme yeteneği, kolonun karışık modlu HILIC/RPLC işlevselliğini güçlü bir şekilde doğrular.



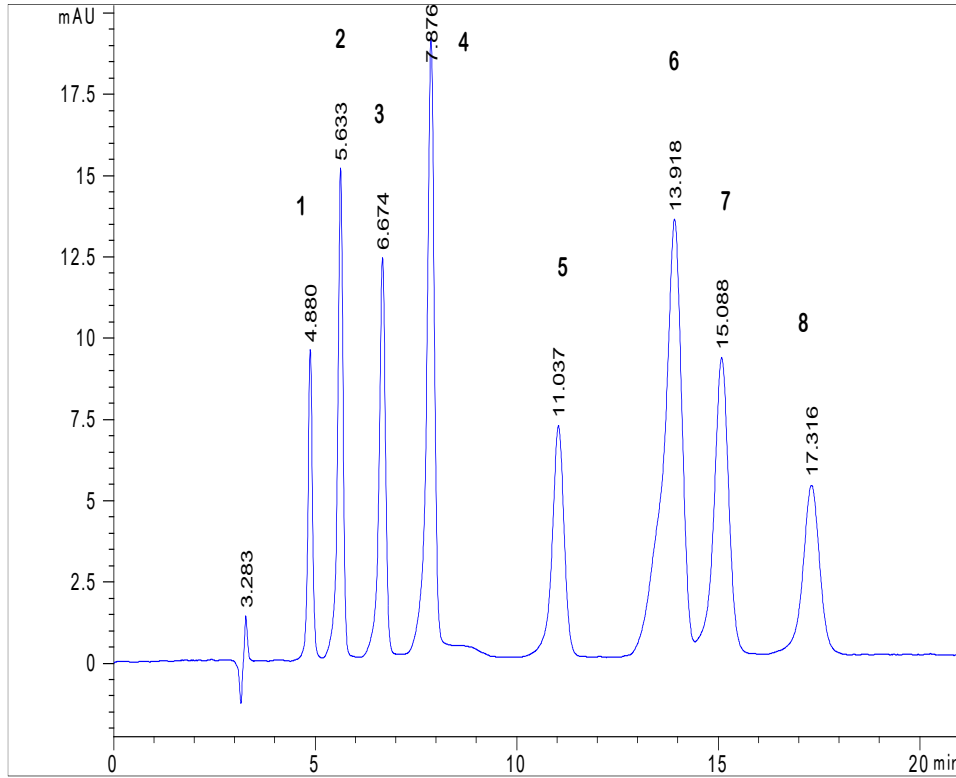
Şekil 4.8: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde Sudan boyalarının ayrımı. Gradyan koşulları: ACN/su: 50/50; 0–10 dk, 70/30; 10–20 dk, sıcaklık: 15 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 520 nm. Analitler: 1; Sudan I, 2; Para Red, 3; Sudan II, 4; Sudan III, 5; Sudan IV, 6; Sudan Red 7B.

4.1.3. Fenollerin HPLC değerlendirmesi



Şekil 4.9: Bu çalışmada incelenen substitüe fenol bileşiklerinin yapıları.

Fenoller, zayıf asitlik ve ağırlıklı olarak apolar davranış ile karakterize edilen orta derecede polar aromatik bileşiklerdir. Bu özelliklerinden dolayı fenoller, yeni geliştirilen durağan fazların ayırma performansını değerlendirmek için en yaygın kullanılan model bileşikler arasındadır (Aral, Çelik, Altındağ ve Aral, 2017). Bu bağlamda, DEA-Mix SP kolonunun bu tür bileşikler için ayırma kapasitesini değerlendirmek ve orta derecede polar ve zayıf asidik analitlere karşı alıkonma davranışını araştırmak için, sekiz analitin bir karışımı olan fenol, 2-aminofenol, o-kresol, 1-naftol, 2-naftol, 4-tert-butilfenol, salisilazdehit ve 4-hidroksibenzaldehit test çözeltisi olarak kullanılmıştır. Aşağıdaki koşullar altında: tamponsuz ACN/su (22/78, h/v), 30 °C kolon sıcaklığı, 1.0 mL/dk akış hızı, 5 µL enjeksiyon hacmi, 50 ppm analit konsantrasyonu ve 270 nm'de UV tespiti, sekiz analit yaklaşık 18 dakika içinde başarıyla ayrıldı. Yakın zamanda geliştirilen karışık modlu kolonlarla karşılaştırıldığında, DEA-Mix SP kolonu, fenollerin ve diğer orta derecede polar asidik bileşiklerin ayrılmasında yüksek verimlilik göstermiştir.



Şekil 4.10: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde türev fenollerin ayrımı. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 22/78, sıcaklık: 30 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 5 µL (50 ppm), dedeksiyon dalga boyu: 270 nm. Analitler: 1; 2-aminofenol, 2; Fenol, 3; O-krezol, 4; 4-hidroksibenzaldehit, 5; tert-bütilfenol, 6; O-hidroksibenzaldehit, 7; 1-naftol, 8; 2-naftol.

Şekil 4.10'da sunulan kromatografik veriler, analitlerin elüsyon sırası ile bunlara karşılık gelen logD değerleri arasında açık bir ilişki olduğunu göstermektedir. Genel olarak, daha yüksek logD değerlerine sahip analitler, ters faz kromatografisinin beklentileriyle iyi bir uyum sağlayan kolon üzerinde daha uzun süre alıkonma sergilemiştir. Örneğin, en düşük logD'ye sahip olan 2-aminofenol ilk önce ayrıştırılırken, her ikisi de önemli ölçüde daha yüksek logD değerlerine sahip olan 1-naftol ve 2-naftol daha uzun süre tutuldu ve daha sonra ayrıştırıldı.

Bununla birlikte, 4-hidroksibenzaldehit ile dikkate değer bir istisna gözlemlendi. Nispeten düşük logD değerine rağmen, bu bileşik önemli ölçüde uzun bir alıkonma süresi gösterdi. Bu tutarsızlık, durağan fazın kutupsal ve iyonik bölgelerinde meydana gelen etkileşimlerin, yalnızca hidrofobiklik tarafından tahmin edilen alıkonma eğilimlerini geçersiz kılabileceğini düşündürmektedir. Özellikle, 4-hidroksibenzaldehitin pKa'sı 7.32'dir ve bu da onu karışımdaki en asidik bileşik yapar. Deneysel koşullar altında (saf suyun pH'ının 7'ye yakın olduğu durumlarda), bu analitin yaklaşık 50/50 nötr / anyonik

formlarda bulunması beklenir. Sonuç olarak, muhtemelen aynı anda elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı ve durağan faz ile hidrofobik bölümlere ile meşgul olur.

Beklenmeyen bir başka bulgu, en yüksek logD değerine (3.21) sahip olan ve bu nedenle en son elüte olması beklenen 4-tert-butilfenol ile ilgiliydi. Şaşırtıcı bir şekilde, beşincilikten kurtulurken, her iki naftol da daha sonra kurtuldu. Durağan faz herhangi bir aromatik kısım içermemesine rağmen, naftoların daha uzun süre tutulması yapısal faktörlere bağlanabilir. 4-tert-butilfenoldeki hacimli sikloheksil grubunun, diaksiyel itme yoluyla sterik engel oluşturan ve böylece tutulmasını azaltan bir sandalye konformasyonunu benimsemesi akla yatkındır.

Sabit faz içinde polar hidroksil gruplarının, katyonik aminlerin, alifatik sikloheksil kısımlarının ve diğer karbon bazlı işlevlerin eşzamanlı varlığı, alıkonma mekanizmalarının karmaşık bir etkileşimine katkıda bulunur. Bu çok yönlü etkileşimler, logD ile süresi arasındaki doğrudan ilişkiyi karmaşıklarlaştırır ve sırayla, durağan faza önemli bir seçicilik kazandırır. Örneğin, 1-naftol ve 2-naftol çok benzer logD değerlerine ve karşılaştırılabilir asitliğe sahip olmasına rağmen, kolon bunları belirgin bir şekilde çözdü. Bu ayırım yalnızca pKa'daki küçük farklılıklarla açıklanamaz. Fenolik OH grubunun konumsal izomerizminin, durağan faz ile hem çekici hem de itici spesifik etkileşimlerin modüle edilmesinde kritik bir rol oynaması muhtemeldir.

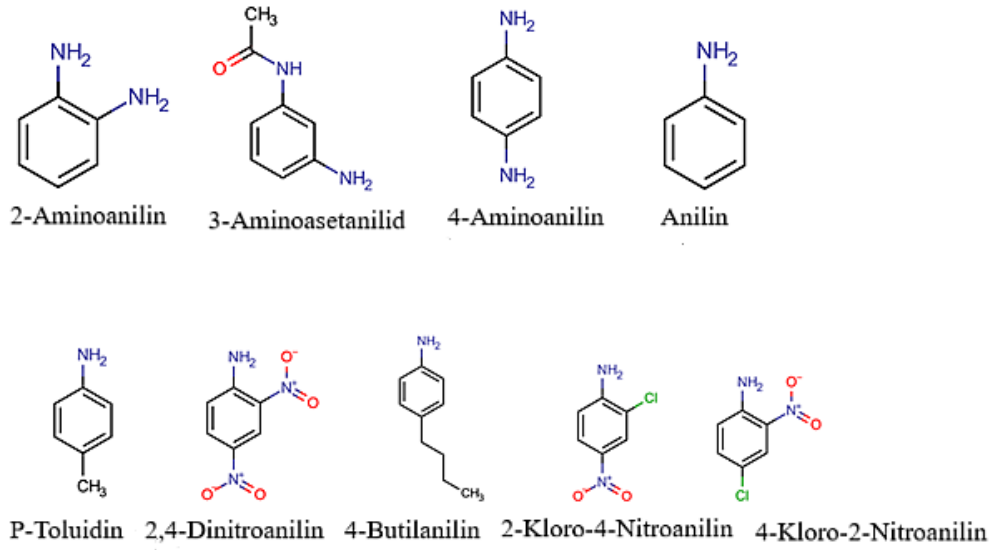
Yukarıda sunulan veriler, logD değerlerinin DEA-Mix SP kolonunda yöntem geliştirme sırasında analit elüsyon davranışını tahmin etmek için değerli bir parametre olarak hizmet etmesine rağmen, tek başına düşünüldüğünde yetersiz olduğunu vurgulamaktadır. Şekil 4.10'da gösterildiği gibi, alıkonma davranışı yalnızca hidrofobiklik tarafından değil, polar, iyonik ve hidrofobik kuvvetler dahil olmak üzere çoklu etkileşimlerin karmaşık bir etkileşimi tarafından yönetilir. Buna göre, bu kolon üzerindeki kromatografik davranışın kapsamlı bir şekilde anlaşılması, analit yapısı ve pKa gibi ek moleküler özelliklerin dikkate alınmasını gerektirir.

DEA-Mix SP kolonu, sübstitüe edilmiş fenollerin etkili bir şekilde ayrıldığını göstermesine rağmen, gözlenen alıkonma mekanizmaları geleneksel ters faz etkileşimleriyle tam olarak tutarlı değildi. Bu, muhtemelen kolonun karışık modlu yüzey kimyasından kaynaklanan çok modlu davranışların varlığını gösterir.

EK-1'deki destekleyici veriler bu gözlemi daha da doğrulamaktadır. Teorik plaka sayısı (N/m) ve pik asimetri faktörü (As) gibi parametreler, kolon verimliliği ve yöntem performansı hakkında önemli bilgiler sağlar. 2-Aminofenol, 38.929 N / m ve 1.03'lük neredeyse ideal bir As değeri ile en yüksek performansı sergiledi, bu da yüksek verimli ayırma ve simetrik pik şeklini yansıtıyor. Fenol ve o-kresol de sırasıyla 35,585 ve 35,456 N / m değerleri ile iyi performans gösterdi; bununla birlikte, her ikisi de biraz daha geniş pikler gösterdi ($As = 1.24$), bu da küçük asimetriyi gösterir. Salisilaldehit, yüksek bir teorik plaka sayısı (36,615 N / m) verirken, 1.29'luk bir As değeri ile pik şeklinde daha fazla sapma gösterdi. Buna karşılık, 4-tert-butilfenol daha düşük bir verimlilik (28,281 N / m) sundu, ancak nispeten simetrik bir pik profilini korudu ($As = 1.14$). Kayda değer bir aykırı değer, belirgin şekilde azaltılmış bir verimlilik (18.033 N/m) ve önemli pik distorsiyonu ($As = 1.94$) gösteren 4-hidroksibenzaldehit idi ve bu da yöntemin güvenilirliğini olumsuz yönde etkileyen önemli etkileşim karmaşıklıklarını düşündürdü. Bu arada, hem 1-naftol hem de 2-naftol, yüksek plaka sayıları (sırasıyla 35.456 ve 35.023 N/m) ve mükemmel simetri ($As = 1.14$ ve 1.08) sergiledi ve bu da kolonun bu analitlerle olan sağlam performansının altını çizdi.

Genel olarak, test edilen sekiz analit için teorik plaka sayıları 18.033 ila 38.929 arasında değişmekte ve pik simetri faktörleri 1.03 ila 1.94 arasında değişmektedir. Bu bulgular, DEA-Mix SP kolonunun, bir sınıf olarak süstitüe edilmiş fenoller için yüksek verimlilik ve yeterli pik şekilleri sağladığını doğrulamaktadır. Bununla birlikte, 4-hidroksibenzaldehit gibi güçlü iyonik etkileşimlere sahip analitler, bu tür bileşiklerle uğraşırken ek yöntem optimizasyonuna duyulan ihtiyacın altını çizerek performans zorlukları sunabilir.

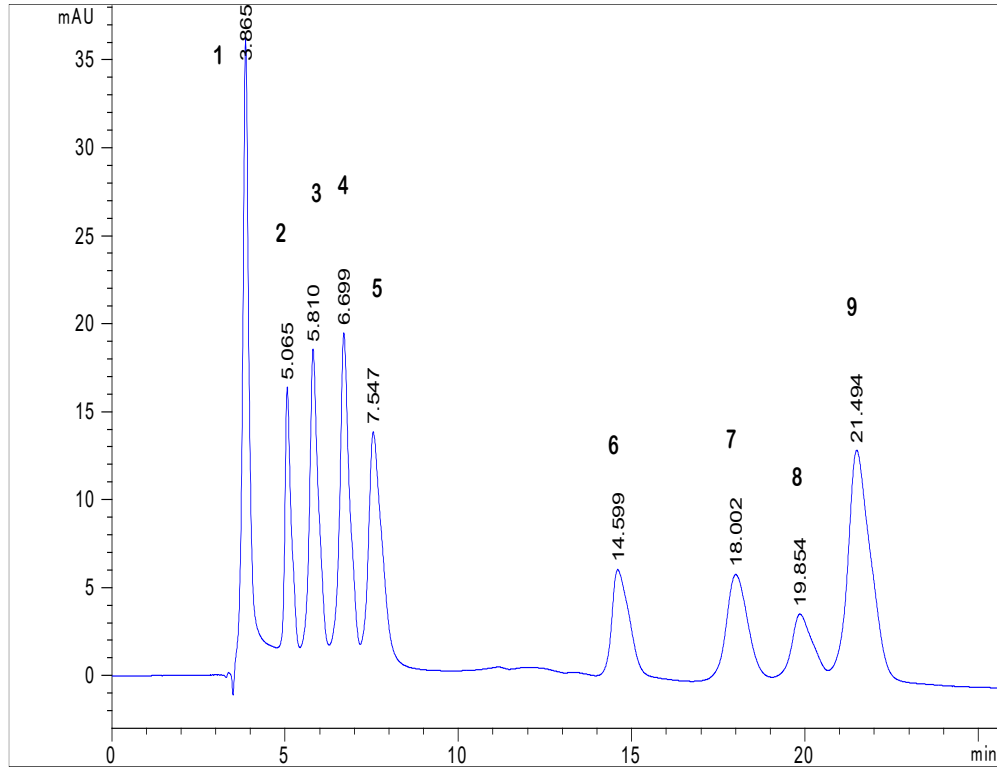
4.1.4. Anilinlerin HPLC değerlendirmesi



Şekil 4.11: Bu çalışmada incelenen süstitüe anilinlerin yapıları

Anilinler, ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) kullanılarak etkili bir şekilde ayrılabilen, zayıf bazik, orta derecede polar aromatik bileşiklerdir (Aral, Çelik, Altındağ ve Aral, 2017). Bu orta polarite analitlerinin yeni geliştirilen karma modlu durağan fazlarda nasıl davrandığını araştırmak, altta yatan alıkonma mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlar. Bu doğrultuda, literatürde yer alan bir dizi çalışma, süstitüe edilmiş anilinlerin çeşitli yeni fazlarda ayrılmasını incelemiştir. Örneğin, 80 dakika içinde 13 anilin türevinin, 30 dakikada yedi türevin ve sadece 8 dakika içinde beş türevin ayrılması rapor edilmiştir (Aral, Çelik, Altındağ ve Aral, 2017). Daha yakın zamanlarda, organik çerçeve bazlı bir sabit faz kullanan bir çalışma, 10 dakika içinde beş anilin bileşiğinin ayrılmasını sağlamıştır (Zheng vd., 2021).

Bu çalışmada, DEA-Mix-SP durağan fazının karma modlu (RPLC-IEX) alıkonma davranışını değerlendirmek için dokuz süstitüe edilmiş anilin türevi (Şekil 4.11) seçilmiştir. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi, bu dokuz bileşik, 20 ° C'de bir MeOH-ACN / su mobil fazı kullanılarak, 1 mL / dak akış hızı ve 240 nm'de UV tespiti ile gradyan elüsyon koşulları altında 23 dakika içinde başarıyla ayrıldı.



Şekil 4.12: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde türev anilinlerin ayrımı. Koşullar: Elüent A; MeOH/ACN: 90/10. A'nın sudaki yüzdesi: 0–7. dakikalar arasında %7, 7–8. dakikalar arasında %27, 8–30. dakikalar arasında %27. Sıcaklık: 20 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 240 nm. Analitler: 1; 2-aminoanilin, 2; 3-aminoasetanilid, 3; 4-aminoanilin, 4; anilin, 5; p-toluidin, 6; 2,4-dinitroanilin, 7; 4-bütülanilin, 8; 2-kloro-4-nitroanilin, 9; 4-kloro-2-nitroanilin.

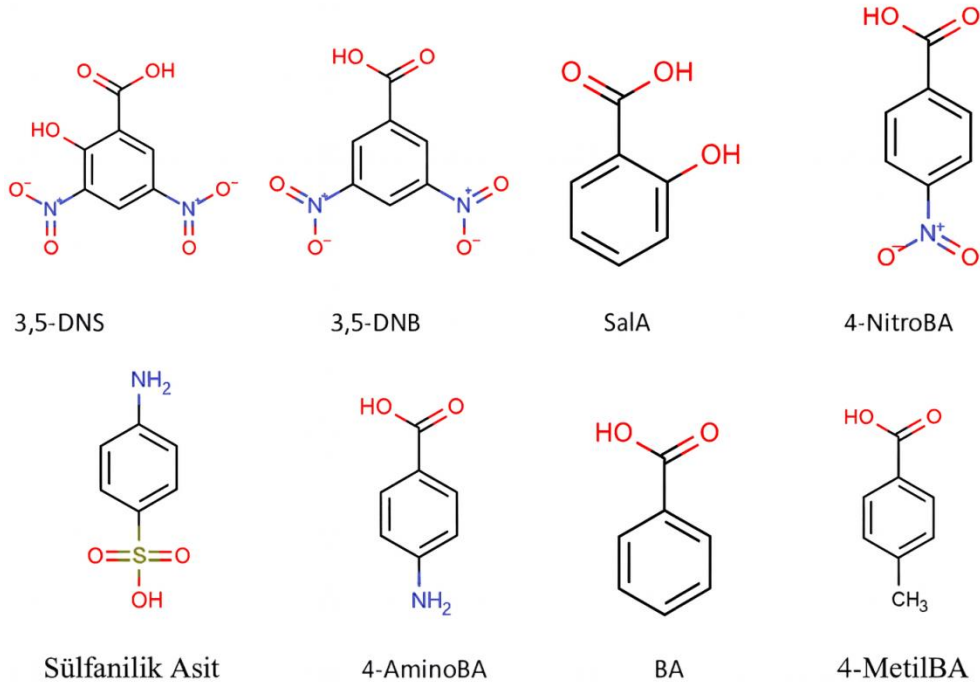
EK-1, araştırılan anilin türevleri için alıkonma sırasını, logD değerlerini, normalleştirilmiş teorik plaka numaralarını (N/m) ve pik asimetrisi (As) faktörlerini özetlemektedir. Genel olarak, daha düşük logD değerlerine sahip bileşikler daha yüksek polaritenin göstergesi olup kolondan daha erken ayrılırken, daha yüksek logD değerlerine sahip daha hidrofobik bileşikler daha uzun alıkonma gösterdi.

Analitler arasında en hidrofilik özellik gösterenler o-aminoanilin, p-aminoanilin ve 3-aminoasetanilid olup, bu bileşikler kromatogramda ilk üç sırada ayrılmıştır. İlginç bir şekilde, biraz daha düşük bir logD'ye sahip olmasına rağmen, p-aminoanilin, o-aminoanilin'den daha uzun bir alıkonma süresi sergiledi. Bu, para pozisyonundaki amino grubunun, durağan faz ile daha güçlü hidrojen bağı veya dipolar etkileşimler kurabileceğini, orto izomerin ise faz ile etkileşimini azaltan molekül içi hidrojen bağları oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, gözlemlenen alıkonma davranışı, tek başına klasik bir ters faz modeli ile tam olarak açıklanamaz. Örneğin, en yüksek logD değerine (2.99) sahip olan 4-bütülanilin, güçlü hidrofobik karakteri nedeniyle en son elüe olması beklenir. Bunun aksine, yedinci pozisyonda elendi. Bu anomali, sadece hidrofobik etkileşimlere değil, aynı zamanda durağan faz ile polar veya iyonik etkileşimlere de katılıyor gibi görünen diğer bazı analitler üzerindeki kloro ve nitro süstitüe edicilerinin varlığına bağlanabilir. Bu çok yönlü etkileşimler muhtemelen 4-bütülaniline kıyasla uzun süreli tutulmalarına katkıda bulunmuştur.

Teorik plaka numarası (N/m) değerleri, her bir analitin ayırma kalitesi hakkında bilgi sağlar. P-toluidin için 18.449 değeri, analitin kolon üzerinde keskin ve iyi çözölmüş pikler oluşturduğunu gösterir. Buna karşılık, 6.521 değerine sahip o-aminoanilin, nispeten daha düşük bir kolon verimliliğini gösterir. Diğer analitler için N/m değerleri orta-yüksek aralıktadır. Bu, kolon performansı veya analitik koşullarla ilgili önemli bir sorun olmamasına rağmen, bireysel analitler arasında separasyon kalitesinde farklılıklar olduğunu gösterir. Pik asimetrisi (As) açısından, o-aminoanilin (0.69) değeri normal aralığın altındadır ve bu da bir ön pik oluşumunu düşöndürür. Bu, analitin erken elüsyonuna bağlı olabilir ve bu da solventin neden olduğu piklerle örtüşmeye neden olabilir. 3-aminoasetanilid (1.44), 4-aminoanilin (1.25) ve anilin (1.50) için değerler daha dengelidir ve simetrik zirveleri gösterir. 1.68 değerine sahip p-toluidin, hafif bir kuyruklanma eğilimi gösterir. Bu farklılıklar, analitlerin kolonla olan etkileşim profillerinde, yapısal özelliklerinden kaynaklanan değışimlerin etkisini yansıtmaktadır. Genel olarak, eğilimler büyük ölçüde ters faz prensipleriyle uyumlu olsa da, bazı analitlerde gözlemlenen sapmalar, analitler ve durağan faz arasındaki karmaşık etkileşimlerin (hidrofobik, iyon-dipol, hidrojen bağı, vb.) analit ayırımında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

4.1.5. Benzoik asitlerin HPLC değerlendirmesi

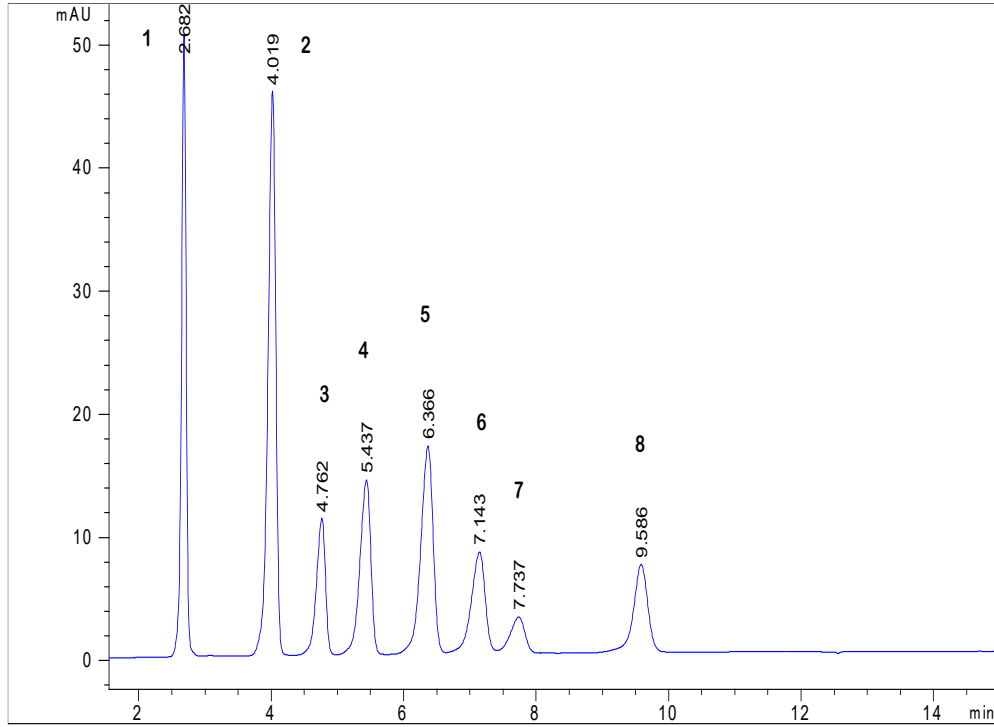


Şekil 4.13: Çalışmada incelenen benzoik asitlerin yapıları

Benzoik asitler, aromatik yapıları ve orta polariteleri nedeniyle ters faz kromatografi sistemlerinde kolayca ayrılabilen asidik bileşiklerdir. Ek olarak, belirli pH aralıklarındaki iyonlaşma özellikleri, bu bileşikleri kromatografik analizlerde kullanım için avantajlı kılmaktadır. Bu bağlamda, DEA-Mix SP adı verilen yeni fazın hem ters faz hem de iyon değişim özelliklerini anlamak için benzoik asit türevlerinin model bileşik olarak kullanılması tercih edilmiştir.

DEA-Mix SP'nin yapısındaki ikincil amin grubu, pH 10'un altında protonlanır ve amonyum iyonuna dönüşür. Bu nedenle, çalışılan koşullar olan 2-8 pH aralığında tamamen katyon oluşturunca olması beklenir. Bu iyonik form, özellikle negatif yüklü moleküllerle güçlü elektrostatik etkileşimler kurarak anlamlı bir anyon değişim kapasitesi yaratır. Bu iki modlu (ters faz ve iyon değişimi) ayrılma potansiyelini değerlendirmek için, farklı yapısal özelliklere sahip bazı benzoik asit türevleri seçildi (Şekil 4.13). Bu amaçla sülfanilik asit , benzoik asit (BA), 3,5-dinitrobenzoik asit (3,5-DNB), 3,5-dinitrosalisilik asit (3,5-DNS), p-aminobenzoik asik (PABA), 4-metilbenzoik (4-

metilBA) asit ve salisilik asitten (SalaA) oluşan bileşiklerin bir karışımı hazırlanmış ve DEA-Mix SP'nin ayırma performansı test edilmiştir. Böylece hem hidrofobik hem de iyonik etkileşimlere dayalı olarak bu yeni fazın etkileşim mekanizmaları hakkında daha derinlemesine bilgi elde edilmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 4.14: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde benzoik asit türevlerinin optimum koşullarda ayırma. Koşullar: Mobil faz; ACN/tampon (20 mM, pH 6.5 fosfat tamponu): 85/15, sıcaklık: 40 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu:240 nm.. Analitler: 1; 3,5-DNS, 2; 3,5-DNB, 3; SalaA, 4; 4-NitroBA, 5; SulfaA, 6; 4-aminoBA, 7; BA, 8; 4-metilBA

Çözücü ve pH optimizasyon deneylerinde, analitlerin saf su/ACN karışımında, ACN konsantrasyonları %100'e yaklaşırsa bile kolondan elüe etmediği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, pH 6'nın altında, analitler kolondan elüe olmadı veya çıkarılması çok zordu, ancak 6.00'ın üzerindeki pH değerlerinde elüe olmaya başladılar. Bununla birlikte, pH 6'nın üzerinde bile, düşük ACN konsantrasyonlarında, analitler kolon üzerinde güçlü bir alıkonma sergiledi ve bu da analiz süresini önemli ölçüde artırdı. ACN ve pH'nın etkileri sonraki bölümlerde daha ayrıntılı olarak tartışılmaktadır. Katyonik DEA-Mix SP sabit fazının, test edilen koşullar altında, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler yoluyla hem anyonik hem de protonlanmış formlarda benzoik asit türevleri ile etkileşime girdiğine dikkat etmek önemlidir. Ek olarak, sabit faz, HILIC/RPLC/WAX özelliklerini gösteren zayıf anyon değiştirme (WAX) özellikleri sergiler. Sonuç olarak, Şekil 4.14'te gösterildiği gibi, bir ACN/fosfat tamponu (pH 6.5, 20 mM) kullanılarak: 85/15 mobil faz,

40 °C sıcaklık, 1 mL/dk akış hızı ve izokratik koşullar altında 240 nm algılama dalga boyu, sekiz benzoik asit türevi sadece 9 dakika içinde başarıyla ayrıldı. 50.000'e yaklaşan elde edilen N/m değerleri ve 1,05 ile 1,18 arasında değişen t-pik asimetri (As) değerleri, kolonun bu iyonik analitlere karşı mükemmel performansını daha da doğrulamaktadır.

pH 6.5'te elde edilen optimum koşullarda, analitlerin kolon üzerindeki alıkonma sırası, logD değerleri ile yakın bir paralellik gösterir. EK-1'de sunulan verilere göre, analitlerin logD değerleri, sabit faz üzerinde uyguladıkları hidrofobik etkileşim kuvvetinin bir göstergesi olarak hizmet ederek, alıkonma sırası ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. En düşük logD değerine sahip analit, -3.27 (3,5-dinitrosalisilik asit), ilk olarak RT 1'de ortaya çıkar. Buna karşılık, en yüksek hidrofobikliğe sahip analit olan 4-metilbenzoik asit (logD = -0.25), RT 8'de en son elüe eder ve bu da kolon üzerinde en uzun alıkonma süresini gösterir. Saklama sırası aşağıdaki gibidir: 3,5-DNS (LogD = -3.27) < 3,5-DNB (LogD = -1.72) << SalBA (LogD = -1.46) < 4-NitroBA (LogD = -1.33) < 4-AminoBA (LogD = -0.95) < BA (LogD = -0.76) < 4-MetilBA (LogD = -0.25). Bu sıra, klasik ters faz prensiplerine uygun olarak, daha yüksek logD değerlerine sahip türevlerin, durağan faz ile daha güçlü hidrofobik etkileşimler nedeniyle daha sonra elüe olduğunu açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, ilginç bir gözlem, alıkonma sırasında beşinci sırada yer alan sülfanilik asidin konumudur. 3,5-dinitrobenzoik asit (-1.72) veya SalA (-1.46) ile karşılaştırıldığında -2.00 gibi daha düşük bir logD değerine sahip olmasına rağmen, Sülfanilik asit alıkonma dizisinde daha sonra ortaya çıkar. Bu, ek polar ve elektrostatik etkileşimlerin alıkonma süresini etkilediğini göstermektedir. Aslında, Sülfat yapısındaki üç oksijen atomu, mezomerik etkiler nedeniyle kısmi negatif yükler taşır ve bu da muhtemelen katyonik durağan faz ile daha güçlü anyon-katyon etkileşimlerine neden olur.

Teorik plaka sayısı (N/m) ve pik asimetrisi (As) değerleri, mükemmel ve ideale yakın kolon performansını açıkça göstermektedir. N/m değerleri, 3,5-DNS için 26.360 ile BA için 49.493 arasında değişir ve yüksek teorik plaka numaraları, kolonun yüksek verimli ayırma sağladığını gösterir. Özellikle, pik asimetrisi (As) değerleri 1.04 ile 1.18 arasında değişir, bu da pik noktalarının neredeyse simetrik ve ideal forma yakın olduğunu gösterir. İdeal pik simetrisinin 1 civarında olması beklendiğinden, değerlerin buna bu kadar yakın olması kolon üzerindeki ayırımın net ve keskin olduğunu göstermektedir. Bu,

kolonun karma modlu WAX mekanizmasının, analitlerin elüsyon profillerinde önemli olumsuz yan etkiler yaratmadan yüksek verimli ve simetrik pikler ürettiğini gösterir.

4.1.5.1. Mobil içeriğin etkisi

Mobil faz bileşiminin benzoik asit türevlerinin tutulması üzerindeki etkisini değerlendirmek için, %25 ila %90 arasında değişen 10 farklı ACN konsantrasyonu ile analizler yapıldı ve kolon, mobil faz ve analitler arasındaki etkileşimlerin oldukça karmaşık olduğu ortaya çıktı (EK-20). Grafiksel olarak incelendiğinde, tüm bileşikler için U şeklinde bir alıkonma davranışı gözlenmiştir (EK-8). Düşük ACN konsantrasyonlarında, özellikle %20-40 aralığında, tüm bileşiklerin sürelerinin oldukça yüksek olduğu bulundu, bu da polar etkileşimlerin ve elektrostatik bağın baskın bir rol oynadığını gösteriyor. ACN konsantrasyonu %20'den %40'a çıktıkça analiz süresi kısaldı. Bu aralık sırasında, analitler genellikle ters faz davranışı gösterdi, ancak yüksek alıkonma süreleri, zayıf iyonik etkileşimlerin (WAX) varlığını gösterdi.

Bu bağlamda, %45-55 ACN aralığı daha kısa analiz süreleri gösterdi, ancak bileşikler verimli bir şekilde ayrılmadı ve tüm analitler üst üste bindi. Sürelerindeki azalma ve bu aralıktaki minimum seçicilik, artan çözücü gücü ve analitlerin maksimuma yakın çözünürlüğü ile açıklanabilir. Sulu çözeltide pH 6.5'te, tüm analitler ağırlıklı olarak anyonik formdadır (yaklaşık %100 iyonize olmuş) ve EK-24'te açıkça görülebileceği gibi sudaki çözünürlükleri maksimumdandır. Ayrıca, incelenen benzoik asit türevleri ağırlıklı olarak apolar bir karaktere sahiptir ve ACN'de yüksek çözünürlük sergiler. Bu nedenle, %50-60 ACN-su karışımı muhtemelen analitlerin çözünürlüğü için en uygun konsantrasyon aralığını temsil eder.

Bu aralıkta bazı analitlerin alıkonma davranışı değişmeye başlamıştır. Örneğin, %25 ACN'de en son ortaya çıkan 3,5-DNS (1) ve yedinci olan SalA (3), ACN konsantrasyonu arttıkça önemli ölçüde ileri doğru hareket etti. Bu iki analit, muhtemelen yüksek asitliklerinden dolayı ACN oranındaki değişikliklerden en çok etkilenmiştir. En düşük pKa değerlerine sahip olduklarından, hem pH 6.5'teki sulu tampondan hem de ACN içeriğindeki değişimden daha hızlı etkilenmişlerdir.

Öte yandan, %65'in üzerindeki ACN konsantrasyonlarında, bazı analitler için sürelerinde kademeli bir artış gözlenirken, 3,5-DNS (3) ve 3,5-DNB (2) gibi diğerleri için

azalma devam etmiştir. Böylece, %65'in üzerindeki ACN konsantrasyonlarında, toplam analiz süresi arttı ve seçicilik artmaya başladı. Bu eğilim, analiz sürelerinin önemli ölçüde daha uzun olduğu %90 ACN'de özellikle fark edilir hale geldi. Klasik ters faz beklentilerinden sapan bu davranış, yüksek miktarda ACN içeren mobil fazın çözünme kapasitesindeki değişikliklerle açıklanabilir. Analitlerin anyonik formlarına geçişini kolaylaştıran sulu tampon oranındaki azalma, muhtemelen analitlerin çözünürlüğünü azalttı ve durağan faz ile etkileşimlerini artırdı. Ayrıca, sulu tampon ile daha zengin olan mobil faz, durağan fazdaki iyonik etkileşimleri bastırmış olabilir. Sulu faz azaldıkça, bu bastırma etkisi muhtemelen azaldı ve analitlerin durağan faz ile bir kez daha daha güçlü iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları oluşturmalarına izin verdi.

Sonuç olarak, kolondaki karışık modlu yapı ile analiz edilen benzoik asit türevlerinin yapısal çeşitliliği birlikte değerlendirildiğinde, tüm analitlerin bazal düzeyde ayrımı için en uygun mobil faz bileşiminin %85 ACN oranı olduğu belirlenmiştir. Bu bileşim, hem kısa analiz süresi hem de ayırma verimliliği açısından en uygun koşulları sağlar. Hem yüksek hem de düşük ACN konsantrasyonlarında gözlenen alıkonma artışları, çoklu etkileşim mekanizmalarının çözücüye bağlı olarak değiştiğini doğrular.

4.1.5.2. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın benzoik asitlerin alıkonma davranışı üzerindeki etkisini araştırmak için, 10 ila 40 °C arasında değişen beş farklı sıcaklıkta analizler yapıldı (EK-21). Sıcaklığın alıkonma üzerindeki etkisini değerlendirmek için, analitlerin alıkonma faktörleri ($\ln k$), sıcaklığın tersine ($1/T$) karşı çizilmiştir (EK-9). Sabit entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) değerlerini varsayan klasik Van't Hoff denkleminde göre, $\ln k$ ile $1/T$ arasında doğrusal bir ilişki beklenir. Bununla birlikte, ortaya çıkan çizimler doğrusallıktan ziyade gözle görülür bir eğrilik sergiledi.

Bu doğrusal olmayan davranış, kolonun alıkonma mekanizmasının tek bir termodinamik parametre ile yeterince tanımlanamadığını gösterir. Yeni geliştirilen karma modlu kolon, polar etkileşimlerin, hidrojen bağının, elektrostatik kuvvetlerin ve hidrofobik etkilerin karmaşık bir etkileşimini kapsar. Bu etkileşimlerin her birinin katkısındaki sıcaklığa bağlı değişim, sabit olmayan ΔH ve ΔS değerlerine yol açar ve bu da klasik Van't Hoff analizinin öngördüğü doğrusallığı bozar.

İncelenen sıcaklık aralığı boyunca termodinamik parametrelerdeki bu tür değişkenlik, lokalize termodinamik değerlendirmeler (yani, daha dar sıcaklık aralıklarında ΔH ve ΔS 'nin belirlenmesi) kullanılarak alıkonmanın daha ayrıntılı bir araştırmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler, kolon-analit alıkonma etkileşimlerinin sıcaklığa bağımlılığının karmaşıklığını açıkça göstermektedir. Bu, analitik metot geliştirme sırasında sabit ve kontrollü bir sıcaklık aralığının seçilmesinin önemini vurgulamaktadır, çünkü dar bir sıcaklık penceresi içinde alıkonma mekanizmasının optimize edilmesi gerekli hale gelmektedir. Dahası, sonuçlar klasik Van't Hoff yaklaşımının tüm sıcaklık aralığı boyunca tek, tutarlı bir entalpi ve entropi değeri sağlayamadığını göstermektedir. Bunun yerine, termodinamik etkileşimlerin sıcaklığa bağlı doğası, bu varyasyonları açıklayan daha kapsamlı modelleme yaklaşımlarını gerektirir.

4.1.5.3. Tampon konsantrasyonunun etkisi

pH optimizasyonuna devam etmeden önce, alıkonma davranışı ve ayırma seçiciliği üzerindeki etkisini değerlendirmek için 5-30 mM aralığında bir tampon konsantrasyon çalışması yapılmıştır. Analizler, pH 6.5'te bir fosfat tamponu kullanılarak 5, 10, 15, 20 ve 30 mM'lik tampon konsantrasyonlarında, 65:35 oranında bir ACN/su (fosfat tamponu, pH 6.5) mobil fazı, 1 mL/dk'lık bir akış hızı ve 240 nm'de UV tespiti ile gerçekleştirildi. Sonuçlar, tampon konsantrasyonunun arttırılmasının tüm analitlerin sürelerinde belirgin bir azalmaya yol açtığını açıkça göstermektedir (EK-10 ve EK-22).

Bu gözlem, durağan fazın elektrostatik etkileşim kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. DEA-Mix SP kolonu katyonik bir karakter sergiler ve zayıf bir anyon değiştirici görevi görür. Bu nedenle, negatif yüklü benzoik asit türevleri ile güçlü elektrostatik etkileşimler oluşturur. Daha düşük tampon konsantrasyonlarında, mobil fazdaki fosfat iyonlarının sayısı sınırlıdır, bu da analitler ile sabit fazın pozitif yüklü bölgeleri arasında daha güçlü elektrostatik etkileşimlere neden olur. Bu, uzun alıkonma sürelerine yol açar.

Bununla birlikte, tampon konsantrasyonu arttıkça, mobil fazın iyonik kuvveti de artar ve bu elektrostatik etkileşimleri zayıflatır. Fazla fosfat iyonları, etkileşim bölgeleri için analitlerle rekabet edebilir veya sabit faz üzerindeki pozitif yükleri tarayabilir,

böylece alıkonmayı azaltabilir. Sonuç olarak, analitler durağan faz ile daha az güçlü etkileşime girer ve daha hızlı elüe olur.

DEA-Mix SP sabit fazı, iyon değiştirme kapasitesine ek olarak, karışık modlu doğasını yansıtan hidrofobik özelliklere de sahiptir. Bununla birlikte, bu çalışmanın deneysel koşulları altında özellikle pH 6.5'te benzoik asit türevleri ağırlıklı olarak iyonize formlarındadır ve benzer aromatik yapıları paylaşır. Sonuç olarak, elektrostatik etkileşimlerin alıkonma davranışlarında baskın rol oynadığı görülmektedir. Tampon konsantrasyonundaki artış, öncelikle bu elektrostatik etkileşimleri zayıflatarak daha kısa analiz sürelerine katkıda bulundu. Bu, analitler ile pozitif yüklü sabit faz arasındaki elektrostatik çekimdeki bir azalmanın yanı sıra mobil faz içindeki iyonik rekabetin artmasıyla açıklanabilir.

İlginç bir şekilde, tampon konsantrasyonunun artırılması sadece alıkonma sürelerini kısaltmakla kalmadı, aynı zamanda ayırma seçiciliğini de iyileştirdi. 5 mM ile 20 mM arasında seçicilikte gözle görülür bir artış gözlemlendi ve en iyi çözünürlük 20 mM fosfat tamponunda elde edildi. pKa değerleri 1.77 ila 4.77 arasında değişen benzoik asit türevleri, ortamın yükselen iyonik kuvvetine farklı tepki verdi. İyonik değişikliklere karşı bu değişen hassasiyet dereceleri, analitler arasındaki alıkonma farklılıklarını artırdı ve sonuçta kromatografik seçiciliği artırdı.

4.1.5.4. pH'nin etkisi

DEA-Mix SP sabit fazının benzoik asit türevlerine karşı alıkonma davranışlarını araştırmak ve etkileşim mekanizması hakkında daha derin bir bilgi edinmek için, pH'nin etkisi 2.75 ila 7.50 aralığında incelenmiştir. EK-11'de gösterildiği gibi pH, benzoik asitlerin kolon içinde tutulması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. ACN içeriğinin ayırma üzerindeki etkisi daha önce ayrıntılı olarak tartışılmıştı, burada anlamlı ayırma ve makul analiz sürelerinin yalnızca nispeten yüksek ACN konsantrasyonlarında elde edilebileceği gösterilmişti. Bu bulgular, analitler ve durağan faz arasındaki güçlü ve çok yönlü etkileşimleri vurgulamaktadır. Bu davranış öncelikle sadece katyon-anyon elektrostatik etkileşimlerinin varlığına değil, aynı zamanda sistem içindeki hidrojen bağı ve hidrofobik kuvvetlere de bağlanabilir. pH'a karşı süresini gösteren grafik (EK-11), bu çoklu etkileşim mekanizmalarının gücünü ve karmaşıklığını daha da ortaya koymaktadır.

Grafikte gösterildiği gibi, tüm analitler 6.0'ın altındaki pH değerlerinde önemli ölçüde uzun süreli alıkonma sergilerken, pH 6.0'ın üzerinde alıkonma süreleri sadece hafif düşüşlerle nispeten sabit kalmıştır. pH düştükçe, genel analiz süreleri arttı ve bazı analitler pH 4 civarında maksimum kalıcılıklarına ulaştı. Bu analitler, ters U şeklinde bir alıkonma profili sergiledi. Diğerleri, pH 2.75'e kadar uzun alıkonma süreleri göstermeye devam etti. Bu eğilim, bu çalışmada kullanılan benzoik asit türevlerinin yaklaşık 1.5 ila 4.8 arasında değişen farklı pKa değerleri ile yakından bağlantılıdır (EK-1).

pH 6.0'ın altında, analitler tipik olarak protonlanmış (nötr) ve protondan arındırılmış (anyonik) formları arasında bir dengede bulunur. Bu denge, hidrojen bağı ve elektrostatik (anyon-katyon) etkileşimlerin bir arada bulunmasına izin verir ve her ikisi de aynı anda alıkonmaya katkıda bulunur. Özellikle, pH bir analitin pKa'sına yakın olduğunda, bu iki form arasında 50/50'lik bir dağılım beklenir ve bu da her iki etkileşimi de yoğunlaştırır. Bu noktada, çift modlu kutupsal etkileşimler zirveye ulaşır ve bu da kolon içinde maksimum alıkonma ile sonuçlanır.

DeneySEL bulgular bu açıklamayı güçlü bir şekilde desteklemektedir. Örneğin, pKa değerleri sırasıyla 4.2 ve 4.26 civarında olan BA (7) ve 4-MBA (8), 4.0 ile 4.5 arasındaki pH değerlerinde en uzun kalıcılığı sergiledi. Bununla birlikte, kalıcılıkları pH 2.75'te tekrar azaldı. Bu sonuçlar, analit alıkonma süresinin esas olarak elektrostatik ve hidrojen bağlama mekanizmalarının eşzamanlı katkısı nedeniyle, pKa değerleri yakınında belirgin şekilde arttığını doğrulamaktadır.

DEA-Mix SP sabit fazı, güçlü hidrojen bağı yapabilen hidroksil grupları, bir katyonik amin grubu ve önemli derecede hidrofobik karakter içeren karma modlu bir yüzeye sahiptir. 6.0'ın altındaki pH değerlerinde, analitler ağırlıklı olarak protondan arındırılmış karboksilat ($-\text{COO}^-$) formunda bulunur ve sabit fazın pozitif yüklü bölgeleri ile güçlü elektrostatik etkileşimleri teşvik eder. Bu iyonik etkileşimler, hidrojen bağlarından önemli ölçüde daha güçlüdür ve uzun süreli tutulmaya katkıda bulunur. Ek olarak, benzoik asit türevlerinin aromatik doğası, sabit faz üzerinde polar olmayan gruplarla hidrofobik etkileşimlere izin vererek ikincil bir alıkonma mekanizması sağlar. Birlikte, bu etkileşimler analitlerin asidik koşullar altında neden çok daha uzun süre tutulduğunu açıklar.

pH, analitlerin ilgili pKa değerlerinin altına düştüğünde, protonlanmış (nötr) formlar baskın hale gelir. Bu gibi durumlarda iyonik etkileşimler azalır ve hidrojen bağı ve iyon-dipol etkileşimleri daha belirgin hale gelir. Sonuç olarak, belirgin olmasa da alıkonma süresinde hafif bir azalma gözlemlenmiştir. Tüm analitlerin tam protonasyonunun sağlanabileceği yeterince düşük bir pH'da (örneğin, 0 ile 2 arasında) çalışmak deneysel olarak mümkün olsaydı, iyonik etkileşimler tamamen bastırılırdı. Bu koşullar altında, yalnızca polar ve hidrofobik etkileşimler alıkonmaya katkıda bulunacaktır ve muhtemelen önemli ölçüde daha kısa analiz süreleri elde edilebilir. Bununla birlikte, silika bazlı kolonların sınırlı kimyasal stabilitesi nedeniyle, pH 2'nin altında çalışmak doğası gereği risklidir ve pH 1'in altına inmek neredeyse imkansızdır.

Deneysel gözlemler bu yorumu güçlendirmektedir. Örneğin, BA (pKa 4.20), 4-MBA (4.26), PABA (4.77) ve SulfaA (3.39) en uzun kalıcılıklarını pH 4.0 civarında sergiledi, ardından pH 2.75'te alıkonma süresinde bir düşüş izledi. Buna karşılık, 3,5-DNS (pKa 1.57), 3,5-DNB (2.86), SalA (3.31) ve 4-NBA (2.79) gibi analitler, pH 2.75'te bile artan kalıcılık sergilemeye devam etti. Veriler daha da düşük pH değerlerine genişletilirse, 3,5-DNS hariç tüm analitler için sürelerinin sonunda azalması ve 3,5-DNS'nin potansiyel olarak pH 1.5 civarında maksimum maksimumuna ulaşması muhtemeldir.

Öte yandan, analitlerin 6'nın üzerindeki pH değerlerinde elüsyonu, yalnızca iyonlaşma durumlarındaki değişikliklerle açıklanamaz, bu aynı zamanda mobil fazın kimyasal bileşimindeki değişikliklerden de etkilenir. Daha yüksek pH seviyelerinde, mobil fazda bulunan tuzlar ve diğer iyonik bileşenler, sabit fazın yüzeyindeki pozitif yükleri kısmen maskeleyebilir. Bu maskeleme etkisi, analit ile sabit faz arasındaki elektrostatik çekimi azaltır. Ayrıca, pH arttıkça, benzoik asit türevlerinin suda çözünürlüğü artar. pH 6'nın ötesinde, bu çözünürlük, çözünürlüğü artmaya devam eden PABA dışındaki tüm analitler için bir platoya ulaşır (EK-24). Bu gözlem, literatürde tarif edilen, geliştirilmiş çözünürlüğün analitin durağan faz ile etkileşimini zayıflattığı ve daha erken elüsyonu kolaylaştırdığı tuzlanma etkisi (salting-out effect) ile tutarlıdır.

Bu nedenle, pH sadece analitlerin iyonlaşma durumunu değil, aynı zamanda çözünürlüklerini ve sabit faz üzerindeki yüzey yükleri ile etkileşime girme yeteneklerini de etkiler. LogS (çözünürlük) ve pKa gibi parametrelerin, pH seviyelerinde gözlemlenen alıkonma davranışını yorumlamada özellikle yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, 3,5-

DNS, pH 4.0 civarında maksimum çözünürlüğüne (logS) ulaşır ve ardından çözünürlük stabilize olur. Bununla birlikte, logD değeri artmaya devam eder ve pH 6.0'a kadar alıkonma süresinde keskin bir düşüşü yansıtır, bunun ötesinde daha fazla değişiklik minimumdur. logD zaman zaman bir rol oynasa da, logS çoğu durumda baskın faktör gibi görünmektedir. Bununla birlikte, pKa, analitler ve yeni durağan faz arasındaki etkileşim mekanizmalarını aydınlatmak için en kritik parametre olmaya devam etmektedir.

Bu çok boyutlu karma modlu etkileşim modeli, bekletme davranışının tek bir parametreye atfedilemeyeceğini pekiştirir. Bunun yerine, kapsamlı bir anlayış iyonik etkileşimleri, hidrofobik alıkonmayı ve analit-mobil faz uyumluluğunu dikkate almalıdır. Örneğin, SalA ve SulfaA'nın tüm pH koşullarında en yüksek logS değerlerini sergilemesine rağmen (EK-24), hiçbir koşulda ilk veya son olarak ayrıldı. Analit elüsyon sırası, 6.0-7.0 pH aralığındaki logD değerleri ile iyi bir korelasyon gösterirken ters faz davranışını düşündürür ve bu ilişki diğer pH değerlerinde giderek daha karmaşık hale gelir. Bu bulgular, pH'ın yalnızca doğrudan iyonizasyon yoluyla değil, aynı zamanda kromatografik sistem içindeki çözünürlüğü, yük maskeleyi ve diğer fizikokimyasal etkileşimleri modüle ederek dolaylı olarak da ayrılmayı etkilediğini açıkça göstermektedir.

4.1.6. Tekrarlanabilirlik çalışmaları

Kolonun tekrarlanabilirliğini ve dayanıklılığını aynı anda değerlendirmek için, dokuz nükleobaz ve nükleozitten oluşan bir karışım aşağıdaki kromatografik koşullar altında analiz edildi: mobil faz ACN/su (10/90), 0,8 mL/dk akış hızı ve 20 °C'lik bir kolon sıcaklığı. Aynı analiz, kolon bir dizi asidik ve bazik stres koşuluna tabi tutulduktan sonra tekrarlandı (EK-25). İlk kromatogramı takiben (EK-25-A), kolon 24 saat boyunca ACN/su (50/50) içinde pH 5.0'a (20 mM amonyum asetat/asetik asit) maruz bırakıldı, ardından sistem orijinal analiz koşullarına geri döndürüldü ve kromatogram B elde edildi.

Daha sonra, kolon 24 saat boyunca pH 3.0 (20 mM amonyum format/formik asit)/ACN (50/50) ile muamele edildi, kromatogram C üretildi, ardından pH 8.0'a (20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄)/ACN'ye (50/50) 24 saat maruz bırakılarak kromatogram D üretildi. Aşırı bir durum olarak, kolon daha sonra 2 saat boyunca pH 11.7 (suda% 0.5 TEA) ile muamele edildi ve kromatogram E'yi elde etmek için aynı analiz tekrarlandı. Her koşul için, dokuz analitin tümünün süreleri kaydedildi ve %RSD (bağıl standart sapma)

değerleri hesaplandı. EK-26'da gösterildiği gibi, %RSD değerleri %0.04 ile %1.77 arasında değişmektedir. Guanin ve guanozin %1'in biraz üzerinde %RSD değerleri sergilerken, diğer tüm analitler bu eşiğin altında değerlere sahipti.

pH 3.0, 8.0 ve 11.7'ye 24 saatlik maruziyetler, durağan faz için önemli kimyasal stres testlerini temsil eder. Özellikle, pH 11.7'ye kısa ama aşırı 2 saatlik maruz kalma, silika bazlı sabit fazların oldukça bazik koşullar altında hızla bozunduğunun bilindiği göz önüne alındığında, kritik bir dayanıklılık testi görevi görür. Bununla birlikte, EK-26 ve EK-25 ve EK-27'de gösterildiği gibi, alıkonma sürelerinde önemli bir kayma gözlenmemiştir. Kromatogram A'dan D'ye kadar minimal değişiklikler meydana geldi ve kromatogram E'deki pH 11.7 işleminden sonra sürelerinde sadece hafif bir azalma kaydedildi. Bu bulgular, zorlu pH koşullarında bile hem performansı hem de tekrarlanabilirliği koruyan DEA-Mix SP kolonunun olağanüstü kimyasal kararlılığını ve sağlamlığını vurgulamaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışma, DEA-Mix SP'nin karışık modlu kromatografideki davranışını kapsamlı bir şekilde araştırdı, özellikle tampon konsantrasyonu, pH ve mobil faz bileşimi gibi değişen koşullar altında alıkonma ve ayırma performansına odaklandı. Sonuçlar, sürelerinin tampon konsantrasyonu, pH ve iyonik etkileşimlerdeki değişikliklerden önemli ölçüde etkilendiğini gösterdi. Artan tampon konsantrasyonları, analitler ve sabit faz arasındaki elektrostatik etkileşimlerin zayıflaması nedeniyle alıkonma sürelerinin azalmasına neden oldu. pH ayarlamaları, alıkonma süresinin analitlerin iyonlaşma durumlarından büyük ölçüde etkilendiğini ve maksimum alıkonma süresinin pKa değerleri civarında gözlemlendiğini gösterdi. Sabit faz ve analitler arasındaki etkileşimler sadece elektrostatik kuvvetler tarafından değil, aynı zamanda özellikle düşük pH değerlerinde hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler tarafından da yönlendirildi.

DEA-Mix SP, katyonik yapısı nedeniyle, HILIC, RPLC ve WAX prensiplerini birleştiren karma modlu bir mekanizmada analitlerle etkileşime giren zayıf bir anyon değiştirici görevi görür. Bu, kolonun özellikle HILIC koşulları altında, nükleobazların ve nükleositlerin etkileyici bir şekilde ayrılmasıyla mükemmel performans sergilemesini sağlar. Ayrıca, kolon polar olmayan ve orta derecede polar bileşikler için mükemmel ayırma verimliliği gösterdi. Kolonun 50.000'e yakın teorik plaka elde etme yeteneği ve 1.0'a yaklaşan pik simetrisi, üstün performansını vurgulamaktadır. Bu özellikler, değişen pH koşulları altında sağlamlığı ve tekrarlanabilirliği ile birlikte, DEA-Mix SP'nin çok yönlülüğünü ve güvenilirliğini göstermektedir. Kısa, pratik ve uygun maliyetli sentezi, çekiciliğini daha da artırarak onu hem hidrofilik hem de hidrofobik ortamlarda yüksek stabilite, olağanüstü tekrarlanabilirlik ve üstün ayırma gücü gerektiren karmaşık ayırmalar için ideal bir seçim haline getirir.

5.2 Öneriler

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular, DEA-Mix SP sabit fazının, özellikle iyonik karakter taşıyan analitlerin ayrılmasında yüksek seçicilik ve kararlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Karışık modlu kromatografi mekanizmalarını aynı anda etkinleştirebilen bu sabit faz, hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin ayrılmasında başarılı bir performans sergilemiş; iyonik etkileşim, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerin kombinasyonu ile analitlerin alıkonma davranışını etkili bir şekilde yönlendirmiştir. Özellikle pH ve tampon konsantrasyonu gibi koşullara duyarlı süreleri, DEA-Mix SP'nin etkileşim mekanizmasının çok yönlü ve ayarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Bu kapsamda ileride yapılacak çalışmalarda, DEA-Mix SP'nin farklı fonksiyonel gruplarla yeniden modifiye edilmesiyle ayırma performansının daha da iyileştirilebileceği düşünülmektedir. İyonik sıvı yapıların farklı yapısal varyantlarının sabit faz yüzeyine bağlanmasıyla, elektrostatik kuvvetlerin yoğunluğu ve yönü kontrol altına alınabilir, böylece seçicilik hedeflenen analit sınıfına göre optimize edilebilir. Özellikle protonasyon dereceleri pH'a duyarlı olan ilaç etken maddeleri, biyolojik aminler, peptitler ve küçük moleküllü biyomarker bileşikler gibi analitlerle yapılacak uygulamalar, bu sabit fazın biyolojik ve farmasötik analizlerdeki potansiyelini açığa çıkarabilir.

Ayrıca, DEA-Mix SP'nin performansının yalnızca model analitler üzerinde değil, gerçek örnek matrislerinde (kan plazması, idrar, çevresel su örnekleri, farmasötik formülasyonlar, gıda ekstraktları vb.) test edilmesi, sabit fazın matriks etkilerine karşı dayanıklılığını değerlendirmek açısından önemlidir. Bu tür kompleks matrislerdeki uygulamalar, sabit fazın pratikteki sürdürülebilirliğini ve geniş kapsamlı kullanılabilirliğini değerlendirmeye olanak sağlayacaktır.

Diğer yandan, bu sabit fazın uzun vadeli dayanıklılığı, yeniden kullanım kapasitesi ve farklı mobil faz sistemleriyle uyumluluğu üzerine gerçekleştirilecek sistematik çalışmalar, endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğine dair kapsamlı veri sağlayacaktır. Ayrıca, farklı sıcaklık ve akış hızı koşullarında kolon verimliliği, pik simetrisi ve teorik plaka sayısı gibi parametrelerin izlenmesiyle performans istikrarı detaylı olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, DEA-Mix SP sabit fazı, çoklu etkileşim mekanizmalarını aynı platformda birleştiren hibrit karakterli yapısıyla, yalnızca model bileşiklerin değil, aynı

zamanda karmaşık ve zorlu analit gruplarının ayrılmasında da önemli bir potansiyele sahiptir. Kolay ve ekonomik sentezlenebilirliği, yüksek derecede tekrarlanabilir sonuçlar üretmesi ve geniş uygulama alanı ile DEA-Mix SP, modern analitik kromatografi yöntemlerine entegre edilebilecek güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmelidir. Bu nedenle, hem akademik araştırmalarda hem de kalite kontrol, biyolojik analiz ve çevre kimyası gibi uygulamalı alanlarda DEA-Mix SP'ye yönelik kapsamlı çalışmaların sürdürülmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahn, J., Bones, J., Yu, Y. Q., Rudd, P. M., & Gilar, M. (2010). Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 μm sorbent. *Journal of Chromatography B*, 878(3–4), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.013>
- Alpert, A. J. (1983). Cation-exchange high-performance liquid chromatography of proteins on poly(aspartic acid)–silica. *Journal of Chromatography A*, 266, 23–37. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90876-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90876-3)
- Alpert, A. J. (2008). Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 80(1), 62–76. <https://doi.org/10.1021/ac070997p>
- Aral, H., Aral, T., Çelik, K. S., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2014). HPLC separation of different groups of small polar compounds on a novel amide-embedded stationary phase. *Chromatographia*, 77, 771–781. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2678-9>
- Aral, H., Aral, T., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2013). Development of a novel amide-silica stationary phase 94xchang reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones. *Talanta*, 116, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.034>
- Aral, H., Çelik, K. S., Altındağ, R., & Aral, T. (2017). Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. *Talanta*, 174, 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.014>
- Aral, H., Çelik, K. S., Altındağ, R., & Aral, T. (2017). *Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography*. *Talanta*, 174, 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.014>
europepmc.org+15pubmed.ncbi.nlm.nih.gov+15dergipark.org.tr+15
- Aral, T., Aral, H., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2015). Synthesis of a mixed-mode stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta*, 131, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.055>
- Aral, T., Aral, H., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2015). Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta*, 131, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.060>
- Aral, T., Aral, H., Ziyadanoğulları, B., & Ziyadanoğulları, R. (2015). Synthesis of a glutamine-derived mixed-mode stationary phase for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: Applications in HILIC and reversed-phase modes. *Talanta*, 131, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.060>
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488–494. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
- Association of Clinical Scientists. (2022, May). Abstracts of presentations at the Association of Clinical Scientists 143. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 52(3), 143.

- Berezkin, V. G. (Ed.). (1990). *Chromatographic adsorption analysis: Selected 95xcha of M. S. Tswett*. New York: Ellis Horwood.
- Bicker, W., Wu, J. Y., Yeman, H., Albert, K., & Lindner, W. (2011). Retention and selectivity effects by bonding a polar urea-type ligand to silica: A study on mixed-mode retention mechanisms and the key role of solute–silanol interactions in hydrophilic interaction chromatography elution mode. *Journal of Chromatography A*, 1218(7), 882–895. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.073>
- Bo, C. M., & Wei, Y. M. (2017). *Preparation and evaluation of surface-grafted block copolymers and random copolymers via surface-initiated atom transfer radical polymerization for hydrophilic/ion-exchange stationary phases*. *RSC Advances*, 7, 46812–46822. <https://doi.org/10.1039/C7RA09124A>
- Bo, C. M., Wang, X. M., Wang, C. Z., & Wei, Y. M. (2017). *Preparation of hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with adjustable selectivity by controlling different ratios of the co-monomers*. *Journal of Chromatography A*, 1487, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.061>
- Boersema, P. J., Divecha, N., Heck, A. J. R., & Mohammed, S. (2007). Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy. *Journal of Proteome Research*, 6(3), 937–946. <https://doi.org/10.1021/pr060589m>
- Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>
- Bui, N. T. H., Verhage, J. J., & Irgum, K. (2010). Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 33, 2965–2976. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000154>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—A powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Cai, X., Guo, Z., Xue, X., Xu, J., Zhang, X. Ve Liang, X. (2012). Two-dimensional liquid chromatography separation of peptides using reversed-phase/weak cation-exchange mixed-mode column in first dimension. *Journal of Chromatography A*, 1228, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.042>
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (1998). *Synthesis of biosurfactants in extreme conditions*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520–529. <https://doi.org/10.1007/s002530051329>
- Charifson, P. S., & Walters, W. P. (2014). Acidic and basic drugs in medicinal chemistry: A perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 9701–9717. <https://doi.org/10.1021/jm501000a>
- Chen, J., Peng, H., Zhang, Z., Zhang, Z., Ni, R., Chen, Y., Chen, P., & Peng, J. (2021). Facile fabrication of silica@covalent organic polymers core-shell composites as the mixed-mode stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase/ion-exchange chromatography. *Talanta*, 233, 122524. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122524>
- Chen, M., & Chen, L. (2018). A novel high hydrothermal stability amino-functionalized stationary phase prepared by a vapour deposition method. *Analytical Methods*, 10(12), 1538–1546. <https://doi.org/10.1039/C8AY00133B>
- Cheng, X. D., Peng, X. T., Yu, Q. W., Yuan, B. F., & Feng, Y. Q. (2013). Preparation and chromatographic evaluation of a novel phosphate ester-bonded stationary phase with complexation and hydrophobic interactions retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, 1302, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.013>

- Cheng, X. D., Peng, X. T., Yu, Q. W., Yuan, B. F., ve Feng, Y. Q. (2013). Preparation and chromatographic evaluation of a novel phosphate ester-bonded stationary phase with complexation and hydrophobic interactions retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, 1302, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.013>
- Cheng, X.-D., Peng, X.-T., Yu, Q.-W., Yuan, B.-F., & Feng, Y.-Q. (2013). Preparation of a novel amino-phosphate zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Chromatographia*, 76, 1569–1576. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2534-3>
- Cong, H. L., Yu, B., Tian, C., Zhang, S., & Yuan, H. (2017). *Monodispers silica mikrokürelerin sentezi ve karışık modlu ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi ayrımları için diazoresin ile modifikasyon*. *Journal of Separation Science*, 40(22), 4320–4328. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700382>
- Coşkun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Dabre, R., Azad, N., Schwämmle, A., Lämmerhofer, M., ve Lindner, W. (2011). Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion 96xchange material by HPLC-UV. *Journal of Separation Science*, 34(7), 761–772. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000793>
- Dembek, M., & Bocian, S. (2023). Phosphodiester stationary phases as universal chromatographic materials for separation in RP LC, HILIC, and 96xch aqueous mobile phase. *Materials*, 16(9), 3539. <https://doi.org/10.3390/ma16093539>
- Ding, L., Guo, Z. M., Hu, Z., & Liang, X. M. (2017). *Mixed-mode reversed phase/positively charged repulsion chromatography for intact protein separation*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.004>
- Dinh, N. P., Jonsson, T., & Irgum, K. (2011). Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5880–5891. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.037>
- Dolzan, M. D., Spudeit, D. A., Breitbach, Z. S., Barber, W. E., Micke, G. A., & Armstrong, D. W. (2014). Comparison of superficially porous and fully porous silica supports for a cyclofructan 6 hydrophilic interaction liquid chromatographic stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1365, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.010>
- Essader, A. S., Cargile, B. J., Bundy, J. L., & Stephenson, J. L. (2005). A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation 96xchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics*, 5(1), 24–34. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400888>
- Ettre, L. S. (1993). Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 819–872. <https://doi.org/10.1351/pac199365040819>
- Gao, J., Luo, G., Li, Z., Li, H., Zhao, L., & Qiu, H. (2020). A new strategy 96xchang preparation of mixed-mode chromatographic stationary phases based on modified dialdehyde cellulose. *Journal of Chromatography A*, 1634, 460885. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460885>
- Gao, J., Wang, K. Y., & Chung, T.-S. (2020). Design of nanofiltration (NF) hollow fiber membranes made from functionalized bore fluids containing polyethyleneimine (PEI) for heavy metal removal. *Journal of Membrane Science*, 603, 118022. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118022>
- Gao, L., & Wei, Y. (2016). *Fabrication of a novel hydrophobic/ion-exchange mixed-mode adsorbent 96xchang dispersive solid-phase extraction of*

- chlorophenols from environmental water samples. *Journal of Separation Science*, 39(16), 3186–3194. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501299>
- Gargano, A. F., Leek, T., Lindner, W. & Lämmerhofer, M. (2013). Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction. *Journal of Chromatography A*, 1317, 12–21. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8400-9>
- Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E., & Gebler, J. C. (2005). Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science*, 28(14), 1694–1703. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500116>
- Guo, Y., & Gaiki, S. (2005). Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>
- Han, H., Zhang, Y., Lu, R., & Zhang, M. (2019). An alternative approach for preparation of amide-embedded stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1593, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.018>
- Han, H., Zhang, Y., Lu, R., & Zhang, M. (2019). An alternative approach for preparation of amide-embedded stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1593, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.054>
- Harper, D. (n.d.). *Chromatography*. Online Etymology Dictionary. <https://www.etymonline.com/word/chromatography>
- He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X., & Jiang, S. (2003). Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1007(1–2), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00987-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00987-7)
- Heaton, J. C., & McCalley, D. V. (2014). Comparison of kinetic performance and retention of sub-2 µm core–97xcha, hybrid and fully porous silica phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1371, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.013>
- Hesse, G., & Weil, H. (Eds.). (1954). *Michael Tswett's first paper on chromatography*. Eschwege: M. Woelm.
- Hinterwirth, H., Lämmerhofer, M., Preinerstorfer, B., Gargano, A., Reischl, R., W., Trapp, O., Brecker, L., & Lindner, W. (2010). Selectivity issues in targeted metabolomics: Separation of phosphorylated carbohydrate isomers by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion exchange chromatography. *Journal of Separation Science*, 33(21), 3273–3282. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000412>
- Hosseini, E. S., & Tabar Heydar, K. (2021). Preparation of two amide-bonded stationary phases and comparative evaluation under mixed-mode chromatography. *Journal of Separation Science*, 44(17), 2888–2897. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100291>
- Hou, Y., Zhang, F., Liang, X., Yang, B., Liu, X., & Dasgupta, P. K. (2016). Poly(vinyl alcohol) modified porous graphitic carbon stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 88(9), 4676–4681. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04384>
- Hu, K., Feng, S., Wu, M., Wang, S., Zhao, W., Jiang, Q., Yu, A., & Zhang, S. (2014). Development of a V-shape bis(tetraoxacalix[2]arene[2]triazine) stationary phase for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 130, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.054>

- Hu, K., Zhang, W., Yang, H., Cui, Y., Zhang, J., Zhao, W., Yu, A., & Zhang, S. (2016). Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography. *Talanta*, 152, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.038>
- Hu, K., Zhang, W., Yang, H., Cui, Y., Zhang, J., Zhao, W., Yu, A. & Zhang, S. (2016). Calixarene ionic liquid modified silica gel: a novel stationary phase for mixed-mode chromatography. *Talanta*, 152, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.038>
- Hu, K., Zhang, Y., Liu, J., Chen, K., Zhao, W., Zhu, W., & diğerleri. (2013). Development and application of a new 25,27-bis(L-phenylalaninemethylester-N-carboxylmethoxy)-26,28-dihydroxy-para-tert-butylcalix[4]arene stationary phase. *Journal of Separation Science*, 36(3), 445–453. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100733>
- Hu, K., Zhao, G., Liu, J. W., Jia, L. Z., Xie, F. W., Zhang, S. S., Liu, H. M., & Liu, M. Y. (2018). Simultaneous quantification of three alkylated-purine adducts in human urine using sulfonic acid poly(glycidyl methacrylate–divinylbenzene)-based microspheres as sorbent combined with LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1081, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.028>
- Hu, Y., Cai, T., Zhang, H., Chen, J., Li, Z., Zhao, L., Li, Z., & Qiu, H. (2020). Two copolymer-grafted silica stationary phases prepared by surface thiol-ene click reaction in deep eutectic solvents for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1609, 460446. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460446>
- Jandera, P. (2008). Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science*, 31(8), 1421–1437. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800051>
- JASCO Corporation. (n.d.). *Principles of HPLC (1) – HPLC as a separation analysis method*. <https://www.jasco-global.com/principle/principles-of-hplc-1-hplc-as-a-separation-analysis-method/>
- Ji, S., Zhang, F., Wu, S., Yang, B., & Liang, X. (2014). Facile preparation of polyvinyl alcohol coated SiO₂ stationary phases for high performance liquid chromatography. *Analyst*, 139(21), 5594–5599. <https://doi.org/10.1039/C4AN01021C>
- Jiang, J., Wang, Y., & Wang, C. (2023). Preparation and characterization of mixed-mode hydrophilic stationary phase based on triple hydrophilic functionalized moieties and its application to traditional Chinese herbal compound. *Microchemical Journal*, 191, 108863. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108863>
- 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*, 79, 1437–1443. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3166-1>
- Jiang, W., Fischer, G., Girmay, Y., & Irgum, K. (2006). Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *Journal of Chromatography A*, 1127(1–2), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.080>
- Jin, H., Liu, Y., Guo, Z., Yang, F., Wang, J., Li, X. Ve diğerleri. (2015). High-performance liquid chromatography separation of cis-trans anthocyanin isomers from wild *Lycium ruthenicum* Murr. Employing a mixed-mode reversed-

- phase/strong anion-exchange stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 500–508. <https://doi.org/10.1021/ac5013267>
- Jin, S., Qiao, Y., & Xing, J. (2018). Ternary mixed-mode silica sorbent of solid-phase extraction for determination of basic, neutral and acidic drugs in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(16), 3731–3742. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1037-3>
- Kaliszan, R. (2007). QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chemical Reviews*, 107, 3212–3246. <https://doi.org/10.1021/cr068412z>
- Kikta, E. J., Jr., & Grushka, E. (1977). Peptide-bonded stationary phases 99xchange separation of amino acids and peptides by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 135(2), 367–376. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88377-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88377-6)
- Kotani, D., D'Acquarica, I., Ciogli, A., Villani, C., & Capitani, D. (2012). Reversed-phase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases for liquichromatography: Preparation, characterization, and chromatographic evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1232, 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.028>
- Lämmerhofer, M., Nogueira, R. Ve Lindner, W. (2011). Multi-modal applicability of a reversed-phase/weak-anion 99xchange material in reversed-phase, anion-exchange, ion-exclusion, hydrophilic interaction and hydrophobic interaction chromatography modes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 2517–2530. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4755-3>
- Lämmerhofer, M., Richter, M., Wu, J., Nogueira, R., Bicker, W. Ve Lindner, W. (2008). Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *Journal of Separation Science*, 31, 2572–2588. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800178>
- Lemasson, E., Richer, Y., Bertin, S., Hennig, P., & West, C. (2018). Characterization of retention mechanisms in mixed-mode HPLC with a bimodal reversed-phase/cation-exchange stationary phase. *Chromatographia*, 81, 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3477-5>
- Li, J., Li, Y., Chen, T., Xu, L., Liu, X., Zhang, X., & Zhang, H. (2013). Preparation, chromatographic evaluation and comparison between linear peptide- and cyclopeptide-bonded stationary phases. *Talanta*, 109, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.005>
- Li, T., Wang, W., Zhao, H., He, F., Zhong, K., Yuan, S., & Wang, Z. (2016). National continuous surveys on internal quality control for HbA1c in 306 clinical laboratories of China from 2012 to 2016: Continual improvement. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(5), e22099. <https://doi.org/10.1002/jcla.22099>
- Li, Y., Ali, M. A., Chen, S.-M., Yang, S.-Y., Lou, B.-S., & Al-Hemaid, F. M. A. (2014). Poly(basic red 9)-doped functionalized multi-walled carbon nanotubes as composite films for neurotransmitter biosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.004>
- Li, Y., Feng, Y., Chen, T. Ve Zhang, H. (2011). Imidazoline type stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5987–5994. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.023>
- Li, Y., Xu, Z., Feng, Y., Liu, X., Chen, T., & Zhang, H. (2011). Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-

- phase mixed-mode chromatography. *Chromatographia*, 74(7–8), 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-2120-5>
- Li, Y., Xu, Z., Feng, Y., Liu, X., Chen, T., & Zhang, H. (2011). Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography. *Chromatographia*, 74(9–10), 523–530. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10337-011-2120-5>
- Li, Y., Yang, J., Jin, J., Sun, X., Wang, L., & Chen, J. (2014). New reversed-phase/anion-exchange/hydrophilic interaction mixed-mode stationary phase based on dendritic polymer-modified porous silica. *Journal of Chromatography A*, 1337, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.044>
- Li, Y., Yang, J., Jin, J., Sun, X., Wang, L., & Chen, J. (2014). New reversed-phase/anion-exchange/hydrophilic interaction mixed-mode stationary phase based on dendritic polymer-modified porous silica. *Journal of Chromatography A*, 1337, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.044>
- Li, Y., Zhu, N., Chen, T., Wei, M., & Ma, Y. (2016). Stationary phase based on β -cyclodextrin and poly(N-isopropylacrylamide) for HILIC and RPLC. *Chromatographia*, 79, 29–36. <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2989-5>
- Liang, T., Fu, Q., Shen, A., Wang, H., Jin, Y., Xin, H. Ve diğerleri. (2015). Preparation and chromatographic evaluation of newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1388, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019>
- Liang, T., Fu, Q., Shen, A., Wang, H., Jin, Y., Xin, H., Ke, Y., Guo, Z., & Liang, X. (2015). Preparation and chromatographic evaluation of newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1388, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019>
- Liang, T., Fu, Q., Shen, A., Wang, H., Jin, Y., Xin, H., Ke, Y., Guo, Z., & Liang, X. (2015). Preparation and chromatographic evaluation of a novel steviol glycoside-modified silica stationary phase in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1388, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019>
- Liu, H. M., Chen, J., Li, Z., Takafuji, M., Ihara, H., & Qiu, H. D. (2017). A new route for synthesis of N-methylimidazolium-grafted silica stationary phase and reevaluation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, 164, 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.037>
- Liu, H., Chen, J., Takafuji, M., Ihara, H., & Qiu, H. (2017). A new route for synthesis of N-methylimidazolium-grafted silica stationary phase and reevaluation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, 164, 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.037>
- Liu, M., Jia, L., Zhao, Z., Han, Y., Li, Y., Peng, Q., & Zhang, Q. (2020). Fast and robust lead (II) removal from water by bioinspired amyloid lysozyme fibrils conjugated with polyethyleneimine (PEI). *Chemical Engineering Journal*, 390, 124667. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124667>
- Liu, S., Xu, H., Yu, J., Li, D., Li, M., Qiao, X. Ve diğerleri. (2015). Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 8989–8997. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9064-9>

- Liu, S., Xu, H., Yu, J., Li, D., Li, M., Qiao, X., Qin, X., & Yan, H. (2015). Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 8989–8997. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9064-9>
- Liu, X., & Pohl, C. (2008). New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *Journal of Chromatography A*, 1191, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.012>
- Liu, X., & Pohl, C. A. (2010). HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column. *Journal of Separation Science*, 33(6–7), 779–786. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900645>
- Liu, X., & Pohl, C. A. (2010). HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimode column. *Journal of Separation Science*, 33(6–7), 779–786. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900645>
- Liu, X., & Pohl, C. A. (2012). Comparison of reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimodal stationary phases and their use in active pharmaceutical ingredient and counterion determinations. *Journal of Chromatography A*, 1232, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.009>
- Liu, X., Pohl, C., Woodruff, A., & Chen, J. (2011). Chromatographic evaluation of reversed-phase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases prepared by electrostatically driven self-assembly process. *Journal of Chromatography A*, 1218(21), 3407–3412. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.035>
- Liu, Y., Du, Q., Yang, B., Zhang, F., Chu, C. Ve Liang, X. (2012). Silica based click amino stationary phase for ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analyst*, 137, 1624–1628. <https://doi.org/10.1039/C2AN16277F>
- Liu, Z., Cai, B. D., & Feng, Y. Q. (2012). Rapid determination of endogenous cytokinins in plant samples by combination of magnetic solid phase extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 891–892, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.015>
- Lowe, A. B. (2010). Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry*, 1(1), 17–36. <https://doi.org/10.1039/B9PY00216B>
- Lu, J., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, W., Hu, K., Yu, A. Ve diğerleri. (2014). A new stationary phase for high performance liquid chromatography: Calix[4]arene derivatized chitosan bonded silica gel. *Journal of Chromatography A*, 1350, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.021>
- Lurie, I. S., Li, L., & Toske, S. G. (2011). Hydrophilic interaction chromatography using sub-2 µm particle columns 101xchang analysis of seized drugs and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9336–9344. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.067>
- Lü, Q. N. (2017). Preparation and evaluation of hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatographic packing based on polysilsesquioxane microspheres. *Chinese Journal of Chromatography*, 35(9), 927–933.
- Manadas, B., Mendes, V. M., English, J., & Dunn, M. J. (2010). Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert Review of Proteomics*, 7(5), 655–663. <https://doi.org/10.1586/epr.10.46>

- McCalley, D. V. (2009). The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *Journal of Chromatography A*, 1217(6), 858–880. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.068>
- Meyer, V. R. (2010). Practical high-performance liquid chromatography (5th ed.). Wiley.
- Mizukami, Y., Iwamatsu, A., Aki, T., Kimura, M., Nakamura, K., Nao, T., Okusa, T., Matsuzaki, M., Yoshida, K.-I., & Kobayashi, S. (2004). ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 50120–50131. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402299200>
- Mumin, M. Y., Aral, H., Sunkur, M., & Aral, T. (2022). A new mixed-mode stationary phase derived from [2-(3,4-epoxycyclohexyl)ethyl]trimethoxysilane as a coupling reagent and its RPLC/HILIC/IEC applications. *ChemistrySelect*, 7(36), e202204069. <https://doi.org/10.1002/slct.202204069>
- Nogueira, R., Lämmerhofer, M. Ve Lindner, W. (2005). Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1089, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.093>
- Novaková, L., Havlíková, L., & Vlčková, H. (2014). Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds using UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.004>
- Ohyama, K., Inoue, Y., Kishikawa, N. Ve Kuroda, N. (2014). Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1371, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.073>
- Ohyama, K., Inoue, Y., Kishikawa, N., & Kuroda, N. (2014). Short communication: Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1371, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.073>
- Ohyama, K., Oyamada, K., Kishikawa, N., Ohba, Y., Wada, M., Maki, T., Nakashima, K., & Kuroda, N. (2008). Short communication: Preparation and characterization of chiral stationary phases with poly(L-phenylalanine) of varying peptide lengths. *Journal of Chromatography A*, 1208(1–2), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.121>
- Ohyama, K., Takasago, S., Kishikawa, N. Ve Kuroda, N. (2015). Poly(L-lactic acid)-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 38, 720–723. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401243>
- Oliver, R. W. A. (1991). *HPLC of macromolecules: A practical approach*. IRL Press.
- Opallo, M., & Lesniewski, A. (2011). A review on electrodes modified with ionic liquids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656(1–2), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.01.008>
- Örtel, R., Renner, S., & Kirch, B. (2004). Short communication: Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(3), 633–638. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.01.018>
- Padivitage, N. L. T., Dissanayake, M. K., & Armstrong, D. W. (2013). Separation of nucleotides by hydrophilic interaction chromatography using the FRULIC-N

- column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(27), 8837–8848. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7315-1>
- Peng, X.-T., Feng, Y.-Q., Hu, X.-Z., & Hu, D.-J. (2013). Preparation and characterization of a neomycin-bonded silica stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Chromatographia*, 76, 459–465. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2406-4>
- Peng, X.-T., Liu, T., Ji, S.-X., & Feng, Y.-Q. (2013). Preparation of a novel carboxyl stationary phase by “thiol-ene” click chemistry for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 36(14), 2274–2280. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300150>
- Qiao, L., Dou, A., Shi, X., Li, H., Shan, Y., Lu, X., & Xu, G. (2013). Development and evaluation of novel imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1286, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.066>
- Qiao, L., Duou, A., Shi, X., Li, H., Shan, Y., Lu, X., & Xu, G. (2013). Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1286, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.066>
- Qiao, L., Li, H., Shan, Y., Wang, S., Shi, X., Lu, X., & Xu, G. (2014). Investigation of surface-bonded dicationic ionic liquids as stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1330, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.020>
- Qiao, L., Shi, X., Lu, X. & Xu, G. (2015). Preparation and evaluation of surface-bonded tricationic ionic liquid silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1396, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.081>
- Qiao, L., Wang, S., Li, H., Shan, Y., Dou, A., Shi, X., & Liu, Y. (2014). A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1360, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.096>
- Qiao, L., Wang, S., Li, H., Shan, Y., Dou, A., Shi, X., & Xu, G. (2014). A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1360, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.096>
- Qiao, X., Tao, D., Qu, Y., Sun, L., Gao, L., Zhang, X. & diğerleri. (2011). Large-scale N-glycoproteome map of rat brain tissue: Simultaneous characterization of insoluble and soluble protein fractions. *Proteomics*, 11, 4274–4278. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000715>
- Qiao, X., Zhang, L., Zhang, N., Wang, X., Qin, X., Yan, H., & diğerleri. (2015). Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1400, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.060>
- Qiao, X., Zhang, L., Zhang, N., Wang, X., Qin, X., Yan, H., & Liu, H. (2015). Imidazolium-embedded C8-based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1400, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.060>
- Qiu, H., Loukotková, L., Sun, P., Tesařová, E., Bosáková, Z., & Armstrong, D. W. (2011). Cyclofructan 6 based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.027>

- Qiu, H., Mallik, A. K., Takafuji, M., Jiang, S. & Ihara, H. (2012). New poly(ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analyst*, 137, 2553–2555. <https://doi.org/10.1039/C2AN35348B>
- Qiu, H., Mallik, A. K., Takafuji, M., Jiang, S., & Ihara, H. (2012). New poly(ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion-exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analyst*, 137, 2553–2555. <https://doi.org/10.1039/C2AN35348B>
- Qiu, H., Wanigasekara, E., Zhang, Y., Tran, T., & Armstrong, D. W. (2011). Development and evaluation of novel zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases based on 3-p,p-diphenylphosphonium-propylsulfonate. *Journal of Chromatography A*, 1218(44), 8075–8082. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.016>
- Qiu, H., Zhang, M., Gu, T., Takafuji, M. & Ihara, H. (2013). A sulfonic-azobenzene-grafted silica amphiphilic material: A versatile stationary phase for mixed-mode chromatography. *Chemistry – A European Journal*, 19, 18004–18010. <https://doi.org/10.1002/chem.201302746>
- Ray, S., Takafuji, M., & Ihara, H. (2012). Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: Mixed mode behavior. *Journal of Chromatography A*, 1266, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.004>
- 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 co-functionalized with ionic liquid embedded C18 and an aryl sulfonate group. *Journal of Chromatography A*, 1564, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.017>
- Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., & Berthod, A. (2006). Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers. *Journal of Chromatography A*, 1119(1–2), 202–208. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00987-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00987-7)
- Shen, A., Guo, Z., Cai, X., Xue, X., & Liang, X. (2012). Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1228, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.086>
- Shen, A., Guo, Z., Yu, L., Cao, L., & Liang, X. (2011). A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol–ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica. *Chemical Communications*, 47(15), 4458–4460. <https://doi.org/10.1039/C1CC10692A>
- 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. *Journal of Chromatography A*, 1314, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.002>
- 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. *Journal of Chromatography A*, 1314, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.002>
- Shen, G., Zhang, F., Yang, B., Chu, C., & Liang, X. (2013). A novel amide stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and ion chromatography. *Talanta*, 115, 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.046>

- Shen, Q., Tang, C., Xu, X., Liu, G., Shao, S., Yao, W., & Dong, S. (2024). Novel PEI/zein core–105xcha composite as mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1730, 465159. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465159>
- Sheng, Q., Su, X., Li, X., Ke, Y., & Liang, X. (2014). Dextran-bonded stationary phase 105xchang separation of saccharides. *Journal of Chromatography A*, 1345, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.076>
- Shi, X., Qiao, L. Ve Xu, G. (2015). Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1420, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.090>
- Shon, Y. S. (2010). In K. E. Geckeler & H. Nishide (Eds.), *Advanced nanomaterials* (p. 743). Wiley.
- Shundo, A., Mallik, A. K., Sakurai, T., Takafuji, M., Nagaoka, S., & Ihara, H. (2009). Controllable shape selectivity based on highly ordered carbonyl and methyl groups in a simple β -structured polypeptide on silica. *Journal of Chromatography A*, 1216(34), 6170–6176. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.075>
- Silvester, D. S. (2011). Recent advances in the use of ionic liquids for electrochemical sensing. *Analyst*, 136(23), 4871–4882. <https://doi.org/10.1039/C1AN15699C>
- Simpson, R. J., Moritz, R. L., Nice, E. E., & Grego, B. (1987). A high-performance liquid chromatography procedure for recovering subnanomole amounts of protein from SDS-gel electroeluates for gas-phase sequence analysis. *European Journal of Biochemistry*, 165(2), 469–475. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11189.x>
- Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2006). *Liquid chromatography*. In D. A. Skoog, J. F. Holler, & S. R. Crouch (Eds.), *Principles of instrumental analysis* (6th ed., pp. 816–855). Thomson Brooks/Cole.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>
- Strege, M. A., Stevenson, S., & Lawrence, S. M. (2000). Mixed-mode anion–cation 105xchange/hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray mass spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery. *Analytical Chemistry*, 72(19), 4629–4633. <https://doi.org/10.1021/ac000338b>
- Su, J., Yang, L. M., & Wang, Q. Q. (2018). *Dual polyhedral oligomeric silsesquioxanes polymerization approach to mutually-mediated separation mechanisms of hybrid monolithic stationary and mobile phases towards small molecules*. *Journal of Chromatography A*, 1533, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.033>
- Sun, H.-F., Cui, Y.-Y., Zhen, C.-Q., & Yang, C.-X. (2023). Monomer-mediated fabrication of microporous organic network@silica microsphere for reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography. *Talanta*, 251, 123763. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123763>
- Sun, M., Feng, J., Liu, S., Xiong, C., Liu, X. Ve Jiang, S. (2011). Dipyrindine modified silica – A novel multi-interaction stationary phase for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3743–3749. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.036>
- Sun, M., Feng, J., Luo, C., Liu, X., & Jiang, S. (2013). Benzimidazole modified silica as a novel reversed-phase and anion-exchange mixed-mode stationary phase for HPLC. *Talanta*, 105, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.077>
- Sun, M., Feng, J., Luo, C., Liu, X., ve Jiang, S. (2014). Quinolinium ionic liquid-modified silica as a novel stationary phase for high-performance liquid chromatography.

- Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2651–2658. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-014-7680-4>
- Sun, M., Feng, J., Wang, X., Duan, H., Li, L. & Luo, C. (2014). Dicationic imidazolium ionic liquid modified silica as a novel reversed-phase/anion-exchange mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 37, 2153–2159. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400176>
- Sun, M., Qiu, H., Wang, L., Liu, X. & Jiang, S. (2009). Poly(1-allylimidazole)-grafted silica, a new specific stationary phase for reversed-phase and anion-exchange liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3904–3909. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.089>
- Svrkota, B., Krmar, J., Protić, A., & Otašević, B. (2023). The secret of reversed-phase/weak cation ion-exchange retention mechanisms in mixed-mode liquid chromatography applied for small drug molecule analysis. *Journal of Chromatography A*, 1690, 463776. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463776>
- Sýkora, D., Řezanka, P., Záruba, K., & Král, V. (2018). Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases. *Journal of Separation Science*, 41(18), 3889–3903. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801048>
- Tong, H. F., Lin, D. Q., Chu, W. N., Zhang, Q. L., Gao, D., Wang, R. Z., & Yao, S. J. (2016). Multimodal charge-induction chromatography for antibody purification. *Journal of Chromatography A*, 1429, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.047>
- Wan, Q.-H. (2021). *Mixed-Mode Chromatography: Principles, Methods, and Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-5485-5>
- Wang, H. J., Hu, W. L., Zheng, Q., Bian, W., & Lin, Z. (2017). One-pot preparation of mercaptotetrazole-silica hybrid monoliths by the thiol-ene click reaction for mixed-mode capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 40(11), 2344–2354. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700220>
- Wang, H. Z., Zhang, L., Ma, T., Zhang, L. Y., & Qiao, X. Q. (2016). Imidazolium-embedded iodoacetamide-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography. *Journal of Separation Science*, 39(18), 3498–3504. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600448>
- Wang, J. B., Wu, F. L., Xia, R. R., Zhao, Q., Lin, X. C., & Xie, Z. H. (2016). Rapid fabrication of ionic liquid-functionalized monolithic column via in-situ urea-formaldehyde polycondensation for pressurized capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1449, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.069>
- Wang, J. B., Ding, C. Y., Xiao, J. H., Jia, W. C., Chen, Y. X., Lin, X. C., & Xie, Z. H. (2018). Quinine-modified polymer monolithic column with reversed-phase/strong anion-exchange mixed-mode for pressurized capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 39, 1504–1511. <https://doi.org/10.1002/elps.201800003>
- Wang, L., Wei, W., Xia, Z., Jie, X., & Xia, Z. Z. (2016). Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.001>
- Wang, Q., Long, Y., Yao, L., Xu, L., Shi, Z. G., & Xu, L. (2016). Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase. *Talanta*, 146, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.009>

- Wang, Q., Ye, M., Xu, L. & Shi, Z. G. (2015). A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications. *Analytica Chimica Acta*, 888, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.058>
- Wang, Q., Ye, M., Xu, L., & Shi, Z. G. (2015). A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications. *Analytica Chimica Acta*, 888, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.058>
- Wang, X., Zhang, Y., Liu, J., & Zhang, S. (2024). Development of a mixed-mode stationary phase modified with dicationic ionic liquids for liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 343018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343018>
- Wang, Y., Wahab, M. F., Breitbach, Z. S., & Armstrong, D. W. (2016). Carboxylated cyclofructan 6 as a hydrolytically stable high efficiency stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and mixed-mode separations. *Analytical Methods*, 8(31), 6038–6045. <https://doi.org/10.1039/C6AY01246A>
- Wolrab, D., Fruehauf, P., Kolderova, N., & Kohout, M. (2021). Strong cation- and zwitterion-exchange-type mixed-mode stationary phases for separation of pharmaceuticals and biogenic amines in different chromatographic modes. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461751. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461751>
- Wu, Q. C., Lin, D. Q., Shi, W., Zhang, Q. L., & Yao, S. J. (2016). A mixed-mode resin with tryptamine ligand for human serum 107xchang separation. *Journal of Chromatography A*, 1431, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.066>
- Xiong, C. F., Wang, Z. Y., Wang, S. Y., Yuan, C. C., & Wang, L. L. (2018). Preparation and evaluation of a hydrophilic interaction and cation-exchange chromatography stationary phase modified with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Journal of Chromatography A*, 1546, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.059>
- Xu, L., Zhao, T., Guan, X. M., Tang, W. J., Liu, X. Y., & Zhang, H. X. (2014). Preparation, chromatographic evaluation and comparison of cystine- and cysteine-bonded stationary phases. *Analytical Methods*, 6, 2205–2214. <https://doi.org/10.1039/C3AY42218F>
- Xue, M., Huang, H., Ke, Y., Chu, C., Jin, Y., & Liang, X. (2009). “Click 107xchange107”: A novel stationary phase for application in two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(49), 8623–8629. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.019>
- Yang, B., Liu, H., Chen, J., Guan, M., & Qiu, H. (2016). Preparation and evaluation of 2-methylimidazolium-functionalized silica as a mixed-mode stationary phase for hydrophilic interaction and anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1468, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.021>
- Yang, F., Bai, Q., Zhao, K., Gao, D. & Tian, L. (2015). Preparation of a novel weak cation 107xchange/hydrophobic interaction chromatography dual-function polymer-based stationary phase for protein separation using “thiol-ene click chemistry”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 1721–1734. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8379-4>
- Yang, F., Shen, Y., Camp, D. G., & Smith, R. D. (2012). High-pH reversed-phase chromatography with fraction concatenation for 2D proteomic analysis. *Expert Review of Proteomics*, 9(2), 129–134. <https://doi.org/10.1586/epr.12.15>
- Yang, Y., Zhou, J., Liang, Q., Dai, X., Yang, H., Wan, M., Ou, J., Liao, M., & Wang, L. (2023). Comparing the separation performance of poly(ethyleneimine) embedded butyric and octanoic acid based chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1706, 464268. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464268>

- Yu, B., Zhang, H. B., Cong, H. L., Gu, C. T., Gao, L. L., Yang, B., & Usman, M. (2017). *Diazo-resin modified monodisperse porous poly(glycidylmethacrylate-co-divinylbenzene) microspheres as the stationary phase for high performance liquid chromatography*. *New Journal of Chemistry*, 41(11), 4637–4643. <https://doi.org/10.1039/C6NJ04001B>
- Yu, Y., Wu, X. L., Li, Y., Huang, Y. K., Jiang, C. W., Zhao, F. F., Wu, J. & Zhang, R. Y. (2016). *Preparation of mix-mode chromatographic supports based on gigaporous polymer microspheres*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(11), 1874–1879. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60979-9](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60979-9)
- Zeng, Y., Zou, R., & Zhao, Y. (2016). Covalent organic frameworks for CO₂ capture. *Advanced Materials*, 28(15), 2855–2873. <https://doi.org/10.1002/adma.201505004>
- Zhang, K., & Liu, X. (2016). Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>
- Zhang, L., Dai, Q., Qiao, X., Yu, C., Qin, X., & Yan, H. (2016). Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.011>
- Zhang, L., Dai, Q., Qiao, X., Yu, C., Qin, X., & Yan, H. (2016). Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 82, 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.011>
- Zhang, M., Liang, X., Jiang, S., & Qiu, H. (2014). Preparation and applications of surface-confined ionic-liquid stationary phases for liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 53, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.011>
- Zhang, M., Mallik, A. K., Takafuji, M., Ihara, H. & Qiu, H. (2015). Versatile ligands for high-performance liquid chromatography: An overview of ionic liquid-functionalized stationary phases. *Analytica Chimica Acta*, 887, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.022>
- Zhang, T., Creek, D. J., Barrett, M. P., Blackburn, G., & Watson, D. G. (2012). Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Analytical Chemistry*, 84(4), 1994–2001. <https://doi.org/10.1021/ac2030738>
- Zhang, Y., & Carr, P. W. (2011). Novel ultra stable silica-based stationary phases for reversed phase liquid chromatography – Study of a hydrophobically assisted weak acid cation 108xchange phase. *Journal of Chromatography A*, 1218(6), 763–777. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.009>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, G., Chen, W., He, P., & Wang, Q. (2016). Simultaneous separation of polar and non-polar mixtures by capillary HPLC based on an octadecylsilane and taurine derivatized silica continuously packed column. *Talanta*, 161, 762–768. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.022>
- Zhang, Y., Zhong, H., Cao, Z. A., Zhou, S., Zhang, D., Lu, R., Han, H., Zhang, M., & Qiu, H. (2020). Design and evaluation of polar-embedded stationary phases containing triacontyl group for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461035. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461035>
- Zhang, Y., Zhong, H., Zhou, S., Han, H., Zhang, M., & Qiu, H. (2021). A docosyl-terminated polyamine amphiphile-bonded stationary phase for multimodal separations in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1642, 462045. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462045>

- Zhao, H. Q., Lyu, H. X., Qin, W. F., & Xie, Z. H. (2018). *One-pot synthesis of boronate-functionalized organic-inorganic hybrid monolithic column 109xchange separation of cis-diol-containing compounds at low pH. Electrophoresis*, 39(7), 924–932. <https://doi.org/10.1002/elps.201700337>
- Zhao, K., Yang, F., Xia, H., Wang, F., Song, Q., ve Bai, Q. (2015). Preparation of a weak anion 109xchange/hydrophobic interaction dual-function mixed-mode chromatography stationary phase for protein separation using click chemistry. *Journal of Separation Science*, 38(4), 703–710. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401020>
- Zhao, L., Zhu, K., Huang, Y. D., Li, Q., Li, X. N., Zhang, R. Y., Su, Z. G., Wang, Q. B., & Ma, G. H. (2017). *Enhanced binding by dextran-grafting to Protein A affinity chromatographic media. Journal of Separation Science*, 40(7), 1493–1499. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601196>
- Zhao, Q., Fang, F., Liang, Y., Yuan, H., Yang, K., Wu, Q. Ve diğerleri. (2014). 1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride-assisted sample preparation method for efficient integral membrane proteome analysis. *Analytical Chemistry*, 86, 7544–7550. <https://doi.org/10.1021/ac501337s>
- Zhao, W. J., Lou, X. H., Guo, J. Z., Sun, P. J., Jia, Y. Z., Zheng, L. M., He, L. J., & Zhang, S. S. (2018). *Investigation of the chromatographic regulation properties of benzyl groups attached to bridging nitrogen atoms in a calixtriazine-bonded stationary phase. Journal of Separation Science*, 41(10), 2110–2118. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701185>
- Zhao, Y., Law, H. C., Zhang, Z., Lam, H. C., Quan, Q., Li, G., & diğerleri. (2015). Online coupling of hydrophilic interaction/strong cation 109xchange/reversed-phase liquid chromatography with porous graphitic carbon liquid chromatography for simultaneous proteomics and N-glycomics analysis. *Journal of Chromatography A*, 1415, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.017>
- Zheng, Y., Wan, M., Zhou, J., Luo, Q., Gao, D., Fu, Q., Zeng, J., Zu, F., & Wang, L. (2021). Striped covalent organic frameworks modified stationary phase for mixed mode chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1649, 462186. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462186>
- Zhou, H., Chen, J., Li, H., Quan, K., Zhang, Y., & Qiu, H. (2020). Imidazolium ionic liquid-enhanced poly(quinine)-modified silica as a new multi-mode chromatographic stationary phase for separation of achiral and chiral compounds. *Talanta*, 211, 120743. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120743>
- Zhou, X., Li, X., Cao, A., Qiao, L., Yu, A., Zhang, S., ve diğerleri. (2015). Development of N-ferrocenyl(benzoyl)amino-acid esters stationary phase for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 144, 1044–1051. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.063>
- Zhou, Y., Wan, Y., & Liu, Z. (2022). Polar-embedded phenyl dendritic stationary phase for multi-mode chromatographic separation. *Microchemical Journal*, 185, 108303. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108303>
- Zhu, B. Y., Mant, C. T., ve Hodges, R. S. (1991). Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography*, 548, 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88590-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88590-3)
- Zhu, B.-Y., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (1991). Hydrophilic interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 548, 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88590-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88590-3)

- Zhu, G., Sun, L., Keithley, R. B., ve Dovichi, N. J. (2013). Capillary isoelectric focusing-tandem mass spectrometry and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitative proteomic analysis of differentiating PC12 cells by eight-plex isobaric tags for relative and absolute quantification. *Analytical Chemistry*, 85, 7221–7229. <https://doi.org/10.1021/ac4009868>
- Zimmermann, A., Greco, R., Walker, I., Horak, J., Cavazzini, A., ve Lämmerhofer, M. (2014). Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1354, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.048>
- Zimmermann, A., Horak, J., Sánchez-Muñoz, O. L. Ve Lämmerhofer, M. (2015). Surface charge fine tuning of reversed-phase/weak anion-exchange type mixed-mode stationary phases for milder elution conditions. *Journal of Chromatography A*, 1409, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.036>

EKLER

EK-1: Bu çalışmada incelenen tüm analitler için hesaplanan QSRR değerleri ve kromatografik parametreler.

	RT sırası	Analitler	N / m	Gibi	LogD (Günlük)	pKa
PAH'lar	1	Naftalin	36266	0.97	2.96	
	2	Floren	24809	0.93	3.74	
	3	Antrasen	28492	0.97	3.95	
	4	Benzantrasen	19591	0.90	4.95	
Alkilbenzenler	1	Benzen	39401	1.36	1.97	
	2	Toluen	39922	1.30	2.49	
	3	Etilbenzen	37137	1.26	2.93	
	4	Kümen	32802	1.22	3.22	
	5	Butilbenzen	18871	1.00	3.82	
	6	Pentylbenzen	9692	0.84	4.26	
Nükleobazlar/Nükleositler	1	Timin	28842	0.90	-0.52	pKa1 = 10.61 olur. pKa2 = 11 olur
	2	Urasil	28719	0.91	-1.06	10.64
	3	üridin	30337	1.00	-2.42	10.64
	4	Adenozin	27089	1.11	-0.58	pKa1= 5.03 olur. pKa2> 12
	5	Sitozin	29272	0.85	-1.24	pKa 1= 4.16 olur. pKa2 >12
	6	Adenin	26646	0.99	-2.13	pKa1= 4.73 pKa2>12
	7	Sitidin	29453	0.99	-2.80	pKa1= 3.59 olur. pKa2 >12
	8	Guanin	32345	1.06	-1.15	pKa1= 10.70 olur. pKa2 >12
	9	Guanozin	30191	.99	-2.71	pKa1= 10.60 olur. pKa2 >12
Sudan Boyaları	1	Sudan I	16386	0.93	4.32	
	2	Para Kırmızı	19849	0.96	5.01	
	3	Sudan II	13680	0.93	5.35	
	4	Sudan III	23040	0.89	5.41	
	5	Sudan IV	19420	0.72	6.32	
	6	Sudan Kırmızı 7B	40027	0.80	7.60	

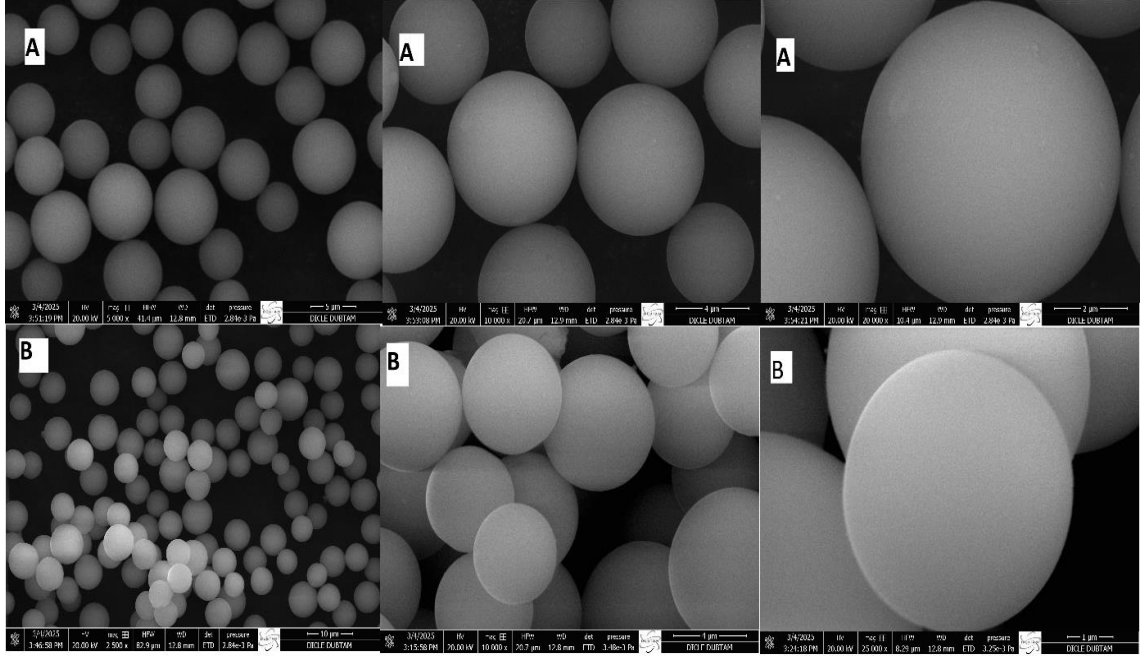
Tablo bir sonraki sayfada yer aldı...

Tablo 1'in devamı...

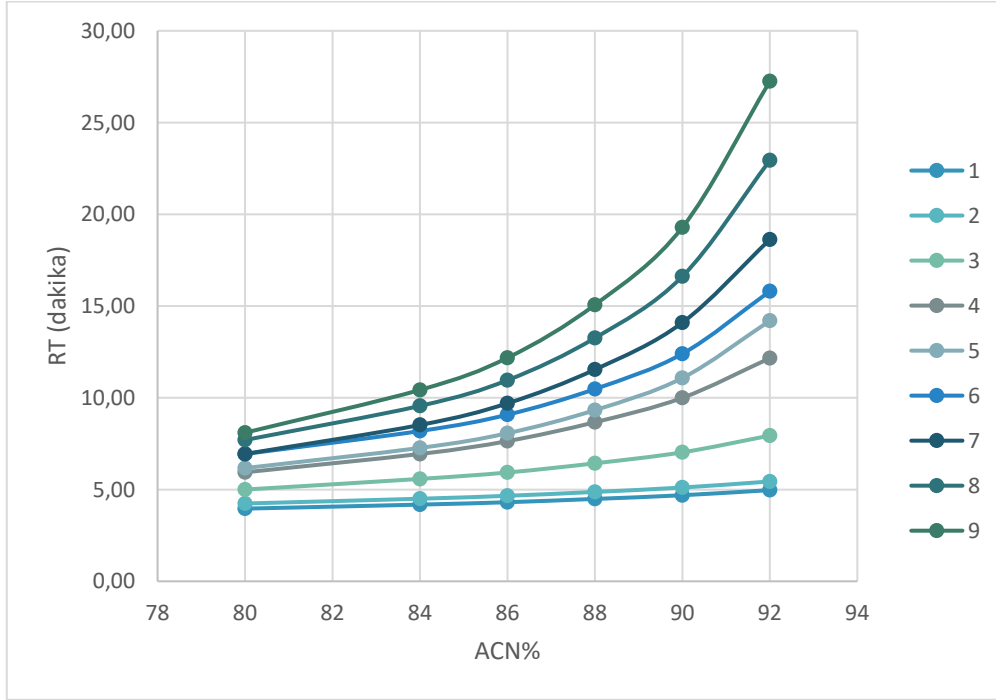
	RT siparişi	Analitler	N / m	Gib i	LogD (Günlük)	pKa
Süstitüe edilmiş fenoller	1	2-Aminofenol	38929	1.0 3	0.84	10.35
	2	Fenol	35585	1.2 4	1.67	10.02
	3	O-Kresol	35456	1.2 4	2.18	10.37
	4	Salisiladehit	36615	1.2 9	2.03	9.00
	5	4-tert-butilfenol	28281	1.1 4	3.21	10.24
	6	4-Hidroksibenzaldehit	18033	1.9 4	1.22	7.32
	7	1-Naftol	35456	1.1 4	2.66	9.60
	8	2-Naftol	35023	1.0 8	2.66	9.78
Benzoik asitler	1	3.5-DNS Sertifikası	26360	1.0 8	-3.27	pKa1 = 1.57 olur. pKa2 = 4.54
	2	3.5-DNS Sertifikası	38787	1.1 1	-1.72	2.86
	3	Sala		1.0 5	-1.46	3.31
	4	4-NitroBA	46462	1.1 1	-1.33	2.79
	5	Sülfat	43589	1.1 0	-2.00	3.39
	6	4-aminoBA	45471	1.1 2	-0.95	4.77
	7	BA	49493	1.0 4	-0.76	4.20
	8	4-metilBA	42429	1.1 8	-0.25	4.26
Süstitüe Edilmiş Anilinler	1	2-Aminoanilin	6521.97 8	0.6 9	0.31	
	2	3-Aminoasetanilid	11616.7 9	1.4 4	0.38	
	3	4-Aminoanilin	8833.56 6	1.2 5	0.20	
	4	Anilin	10089.2 8		0.00	
	5	P-Toluidin	18449.0 7	1.6 8	1.65	
	6	2.4-Dinitroanilin	11524.5 8	1.5 4	1.67	

		8501.95	1.3	
7	4-Butilanilin	8	1	0.00
		11544.4	1.4	
8	2-Kloro-4-Nitroanilin	9	2	1.69
		11305.7	1.3	
9	4-Kloro-2-Nitroanilin	3	7	2.34

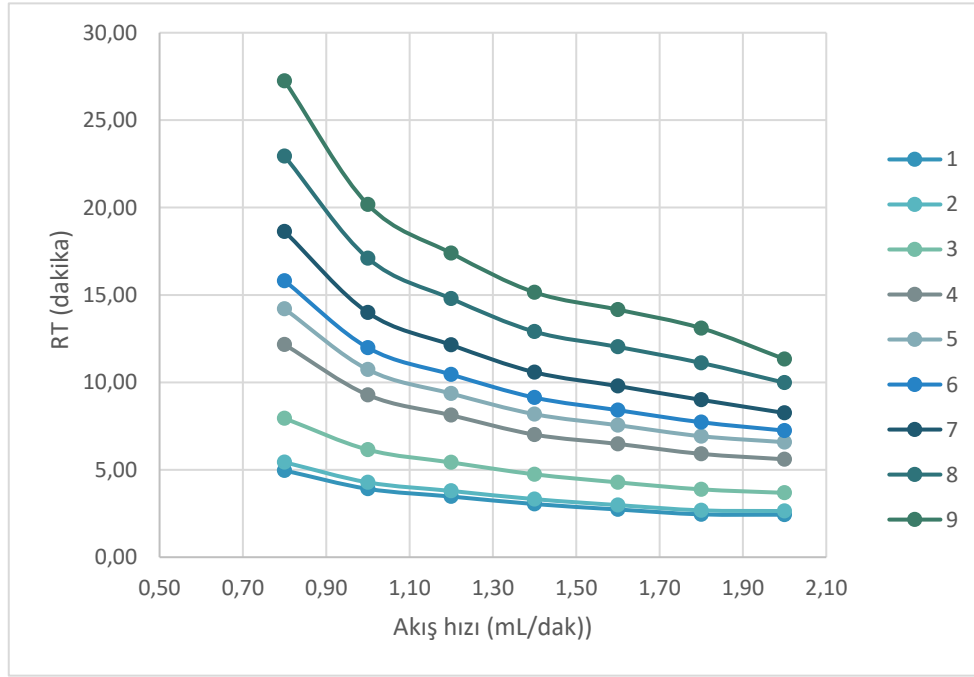
EK-2: Boş silika (A) ve DEA-Mix SP'nin (B) SEM görüntüleri



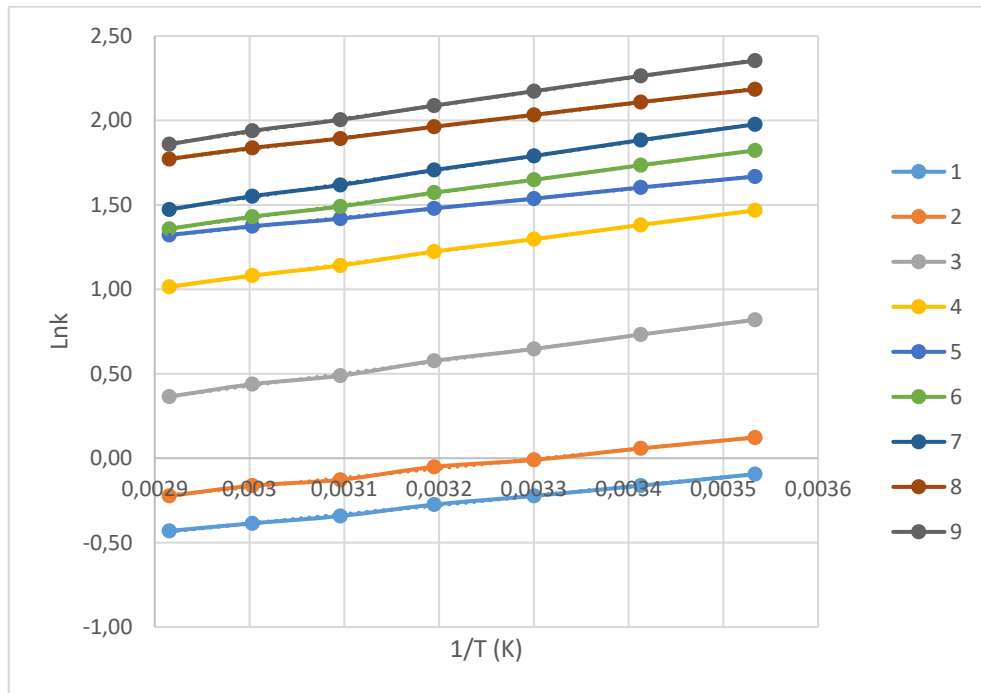
EK-3: ACN yüzdeliğinin DEA-Mix SP üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: akış hızı: 0.8 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, 2 µL, 265 nm. Diğer koşullar Şekil 2.2'de verilmiştir. Diğer koşullar Şekil 4.3'te verilmiştir.



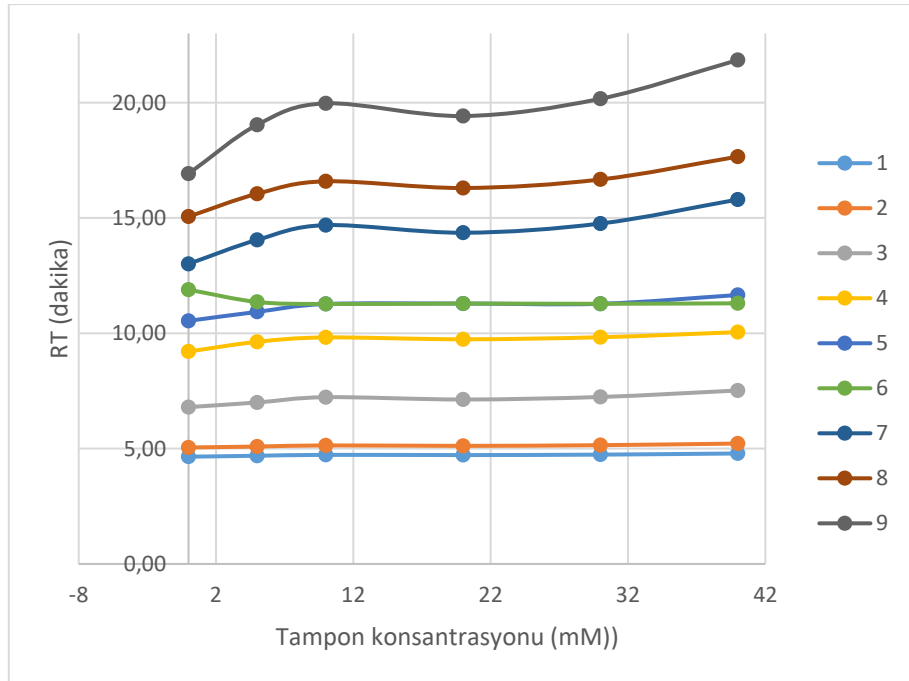
EK-4: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde nükleobazların ve nükleositlerin ayırımına akış hızının etkisi. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 92/8, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm. Diğer koşullar Şekil 4.3'te belirtilmiştir.



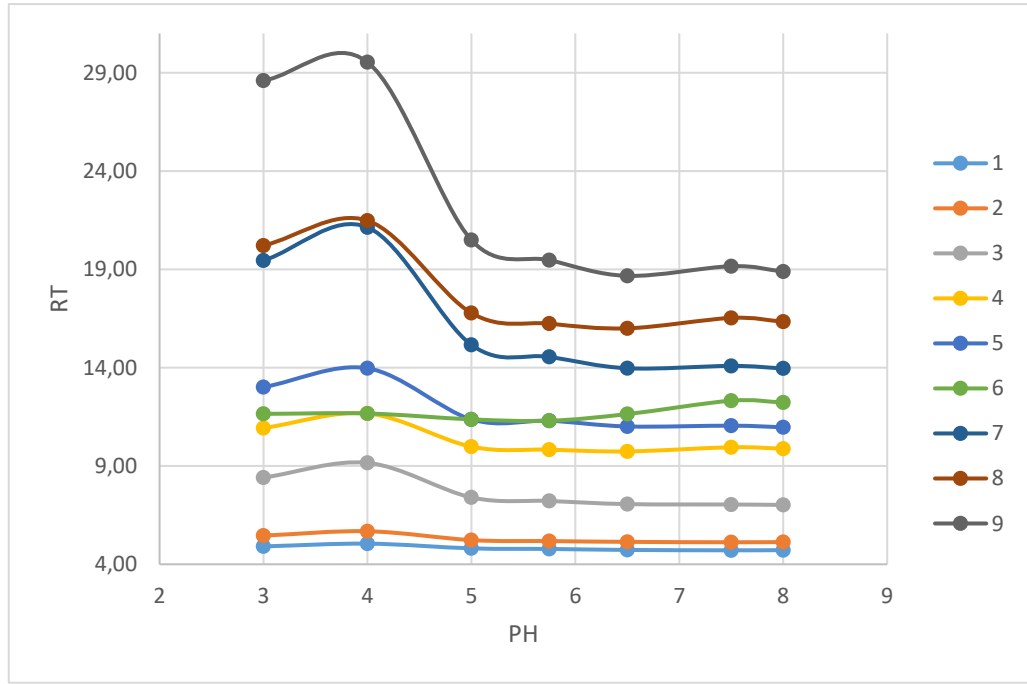
EK-5: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde nükleobazların ve nükleositlerin ayırımına sıcaklığın etkisi. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 92/8, akış hızı: 2.0 mL/dak, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm. Diğer koşullar Şekil 2.3 ve Şekil 2.4 altında verilmiştir.



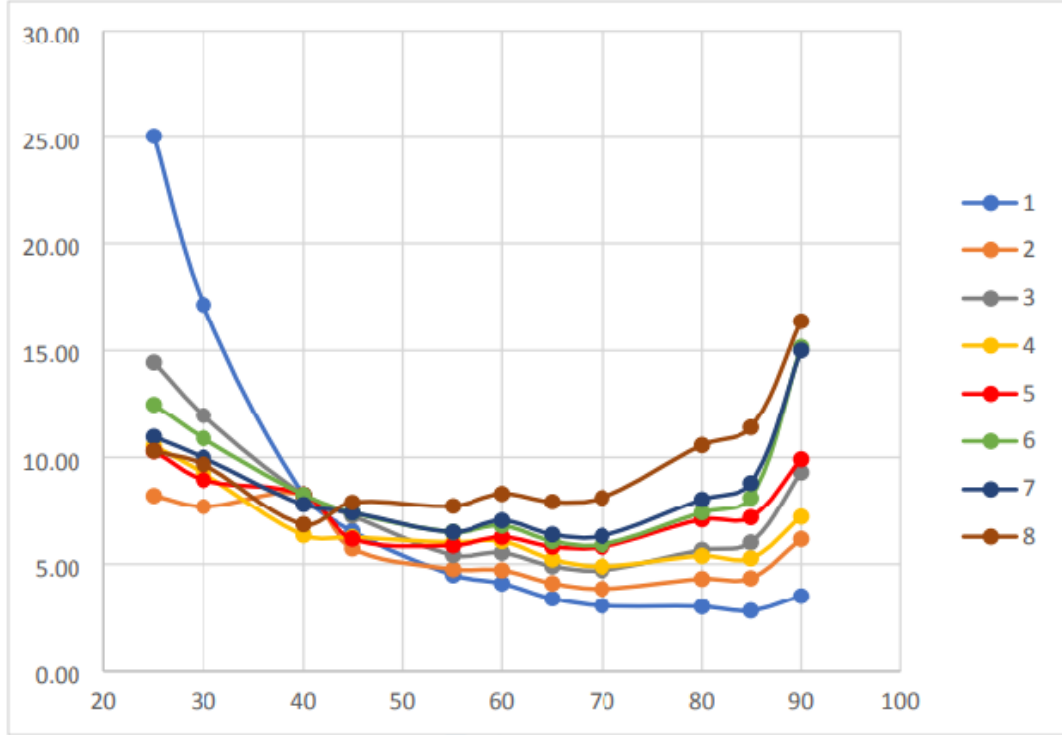
EK-6: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde nükleobazların ve nükleositlerin ayırımına tampon derişiminin etkisi. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 90/10 (amonyum asetat, pH 5.0), akış hızı: 1.0 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm. Diğer koşullar Şekil 4.3 ve EK-4 altında belirtilmiştir.



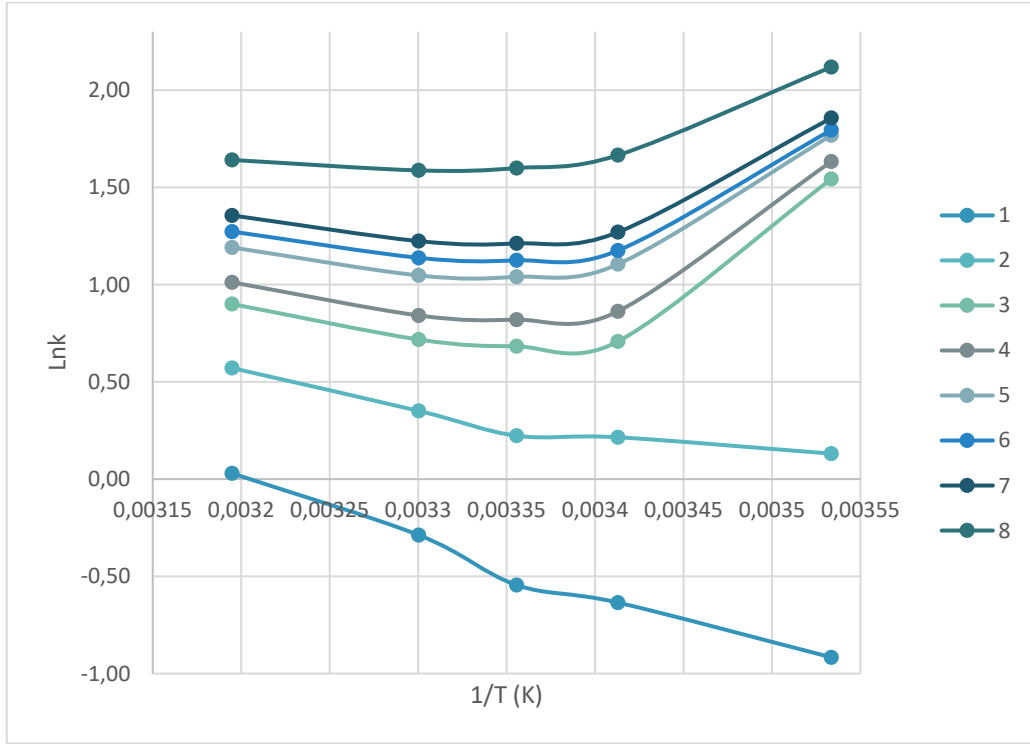
EK-7: DEA-Mix SP sabit fazı üzerinde nükleobazların ve nükleositlerin ayırımına pH'nın etkisi. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 90/10 (5 mM format, asetat veya fosfat tamponları), akış hızı: 1.0 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm. Diğer koşullar Şekil 4.3'ün altında belirtilmiştir.



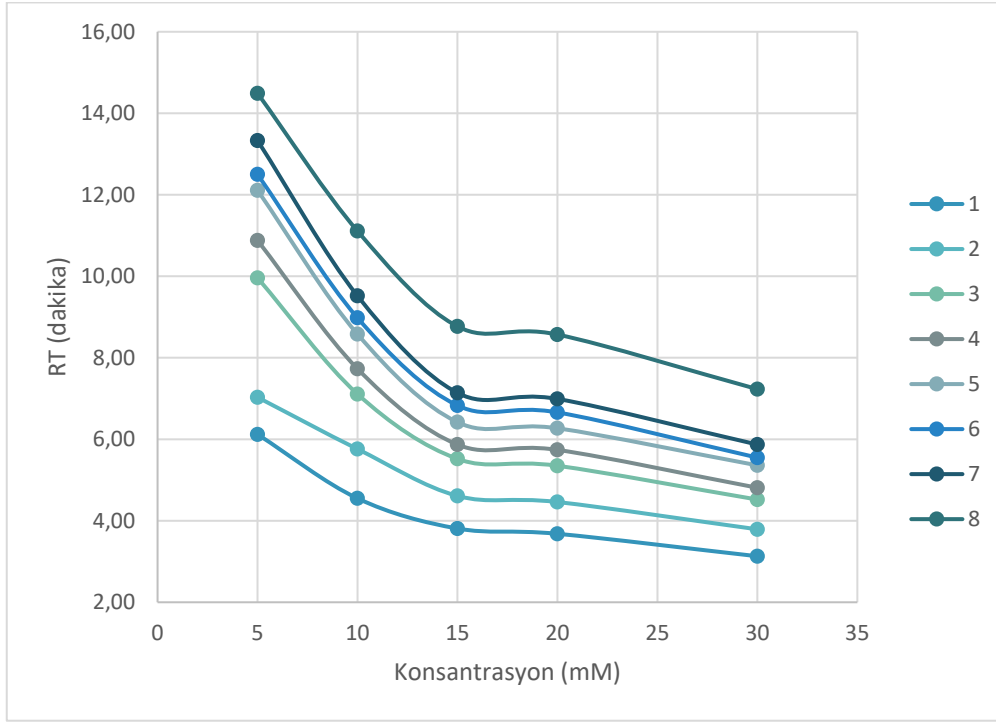
EK-8: ACN yüzdesinin DEA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: (20 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1 mL/dak, 25 °C, 2µL, 240 nm. Analitler: 1; 3,5-DNS, 2; 3,5-DNB, 3; SalA, 4; 4-NitroBA, 5; SulfaA, 6; 4-aminoBA, 7; BA, 8; 4-metilBA



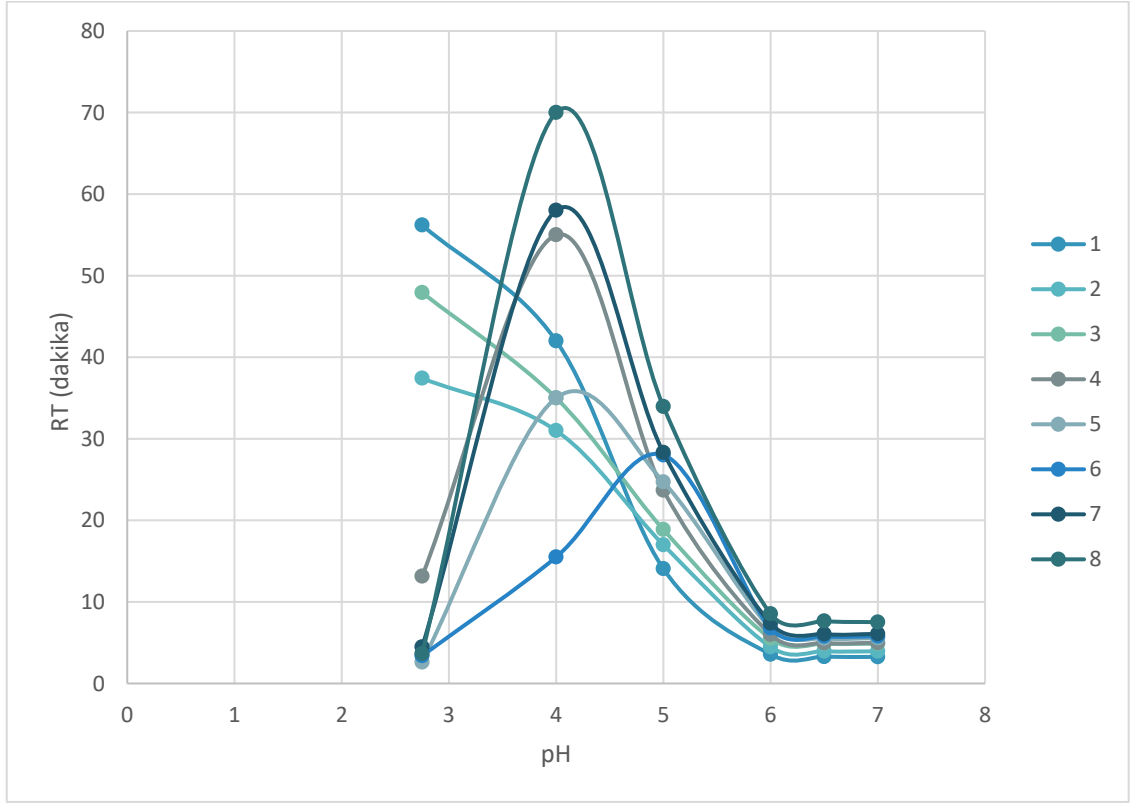
EK-9: Sıcaklığın DEA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/su (20 mM, pH 6.5 fosfat tamponu): 65/45, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 4.14'te verilmiştir.



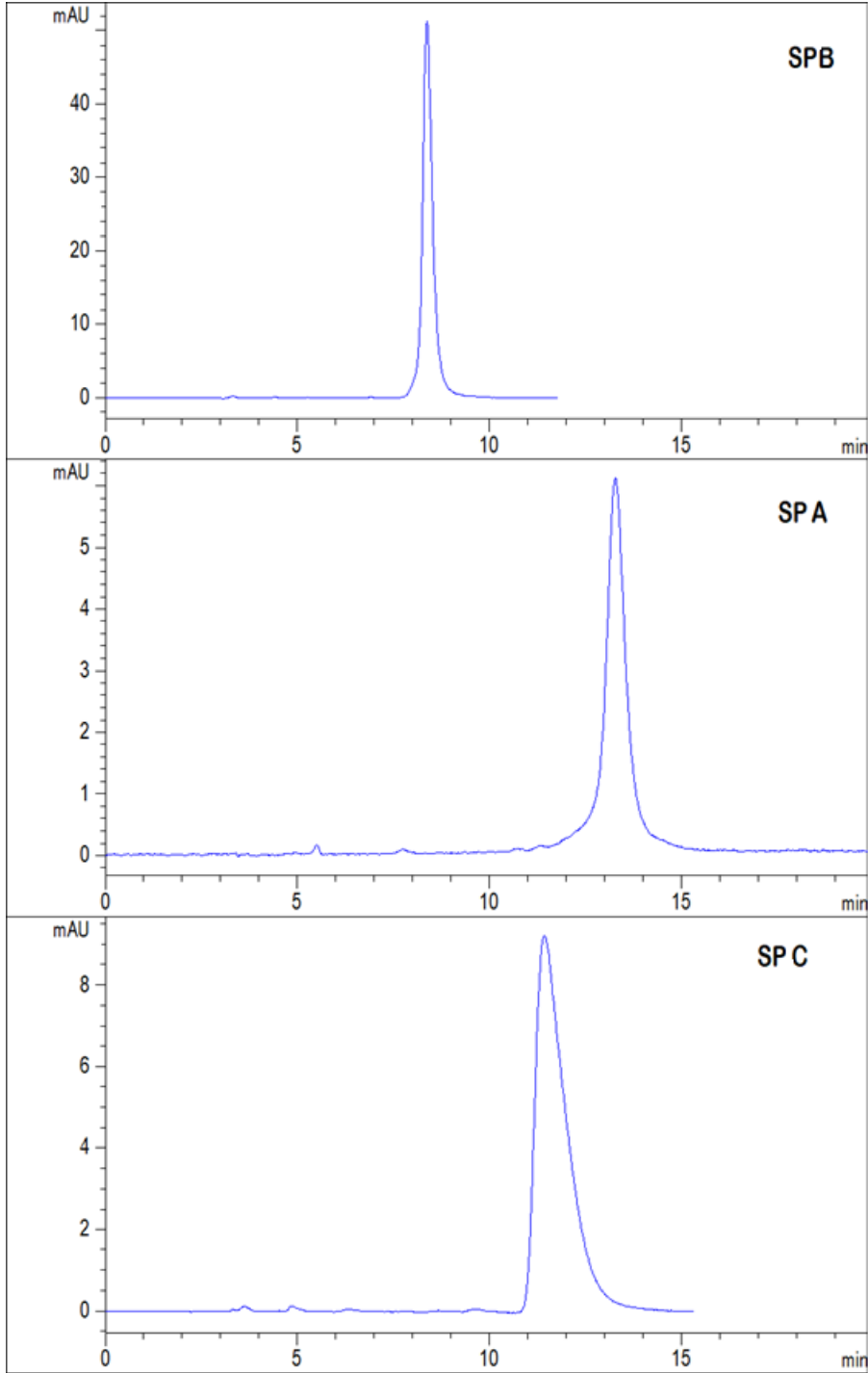
EK-10: Tampon konsantrasyonunun ayırma benzoik asitleri üzerindeki etkisi DEA-Mix sabit fazı üzerinde. Koşullar: ACN/su (pH 6.5 fosfat tamponu): 65/45, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 4.14'te verilmiştir.



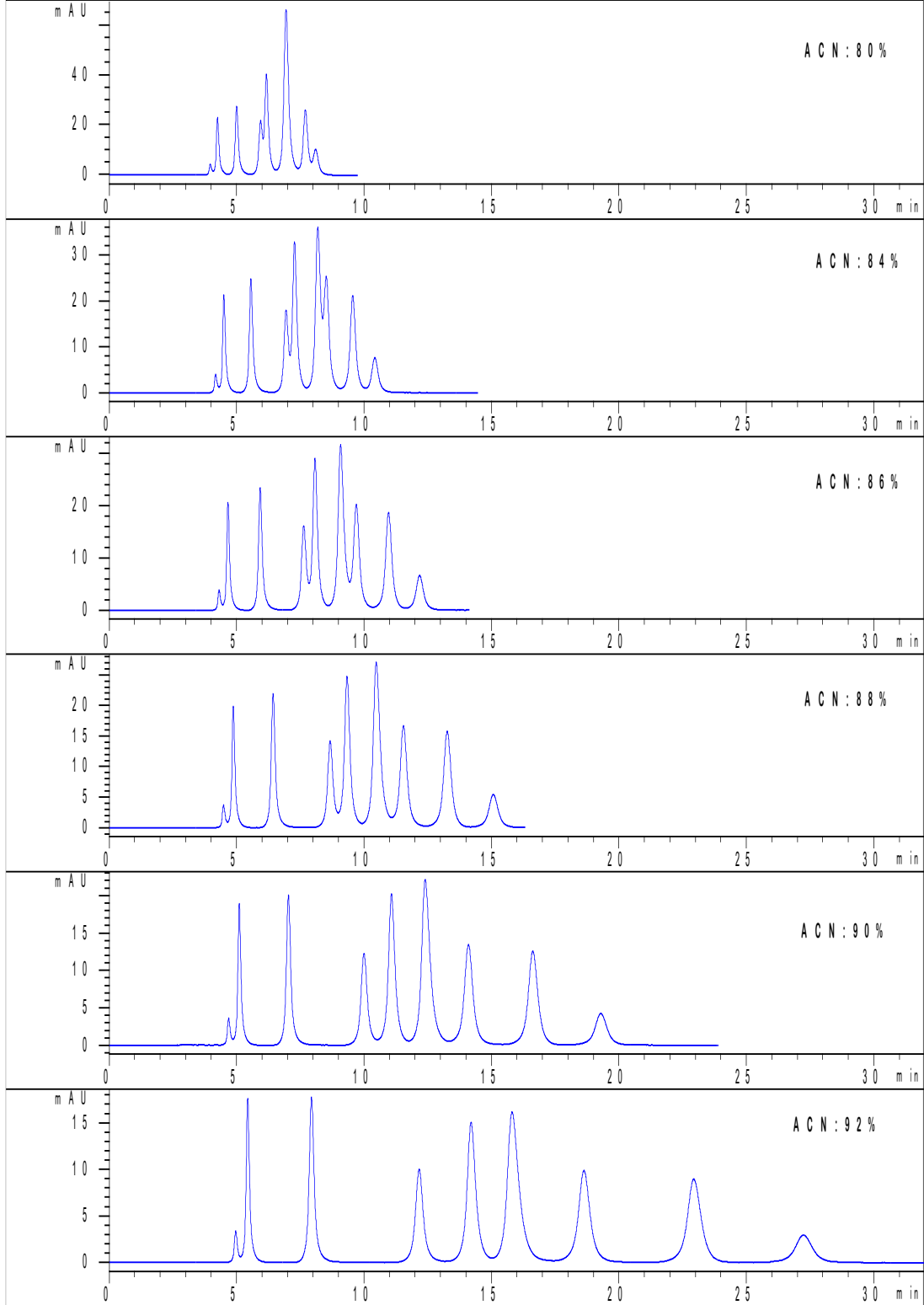
EK-11: pH'in DEA-Mix sabit fazı üzerindeki benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/su (20 mM formatı, asetat veya fosfat tamponları): 65/45, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 4.14'te verilmiştir.



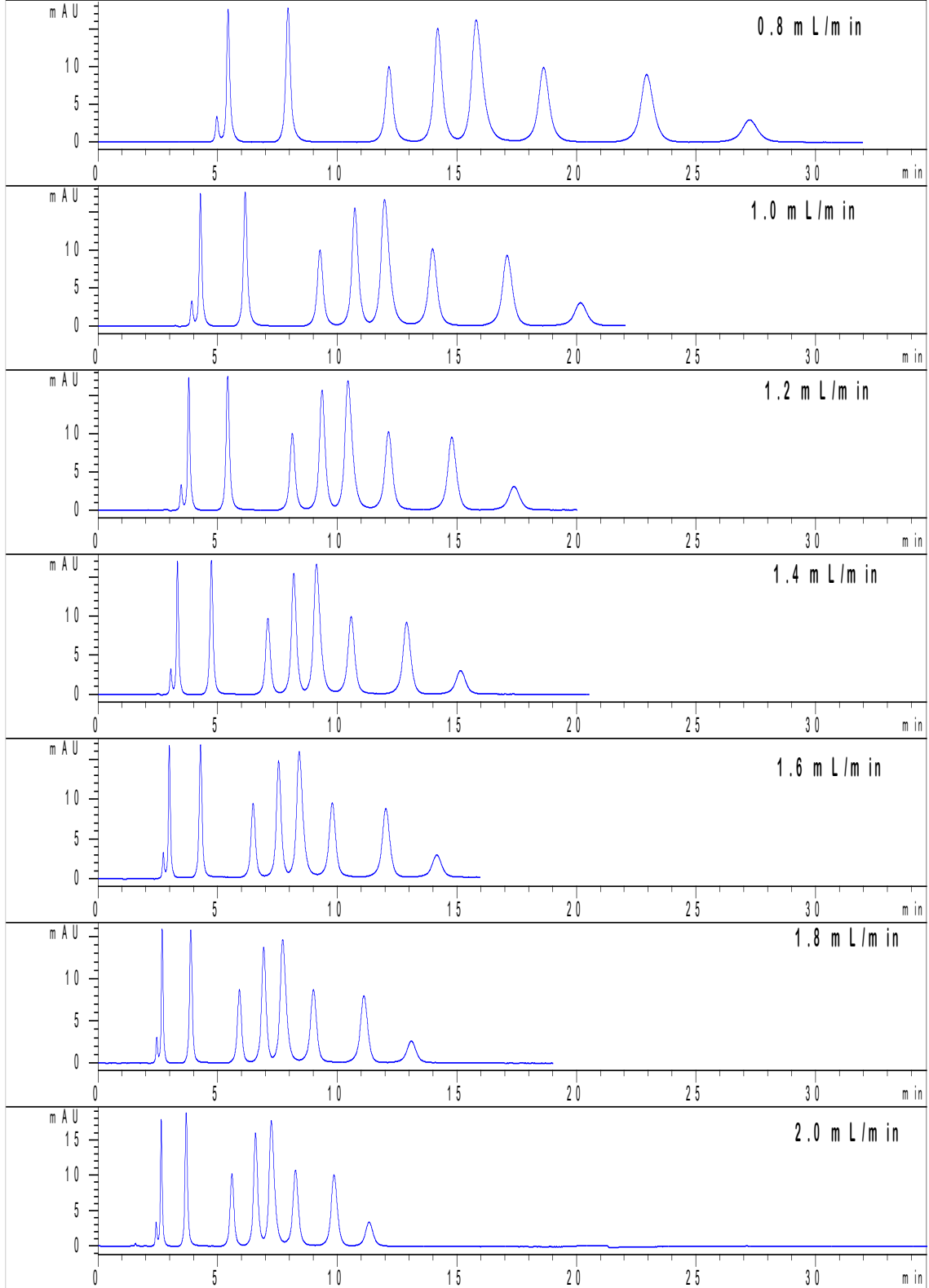
EK-12: SPA-C için ilk testler. Prob; Adenin. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 15/85, akış hızı: 1 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm.



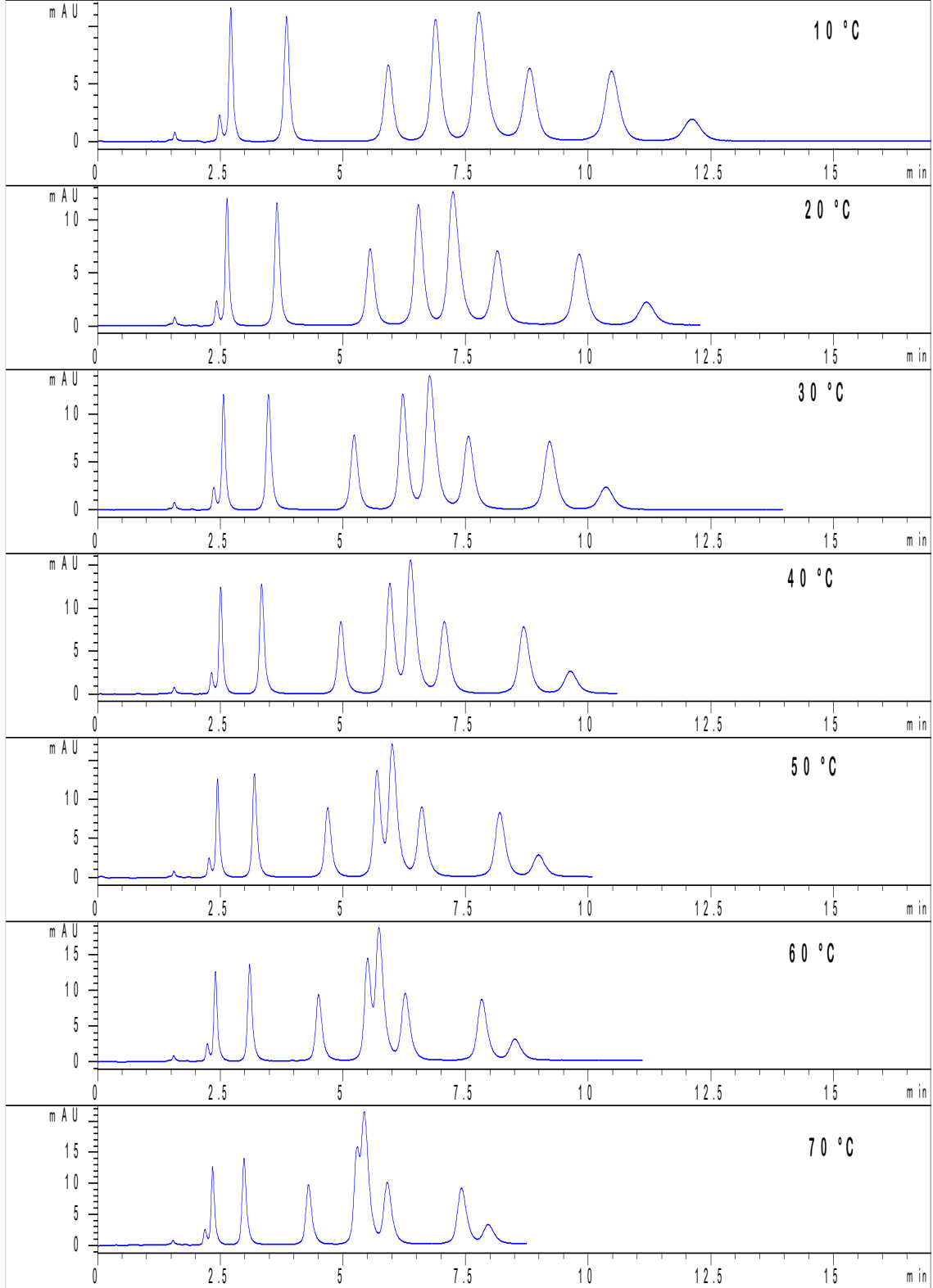
EK-13: ACN yüzdesinin DEA-Mix durağan faz üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: akış hızı: 0.8 mL/dak, sıcaklık: 20 °C diğer koşullar Şekil 4.3'te verilmiştir.



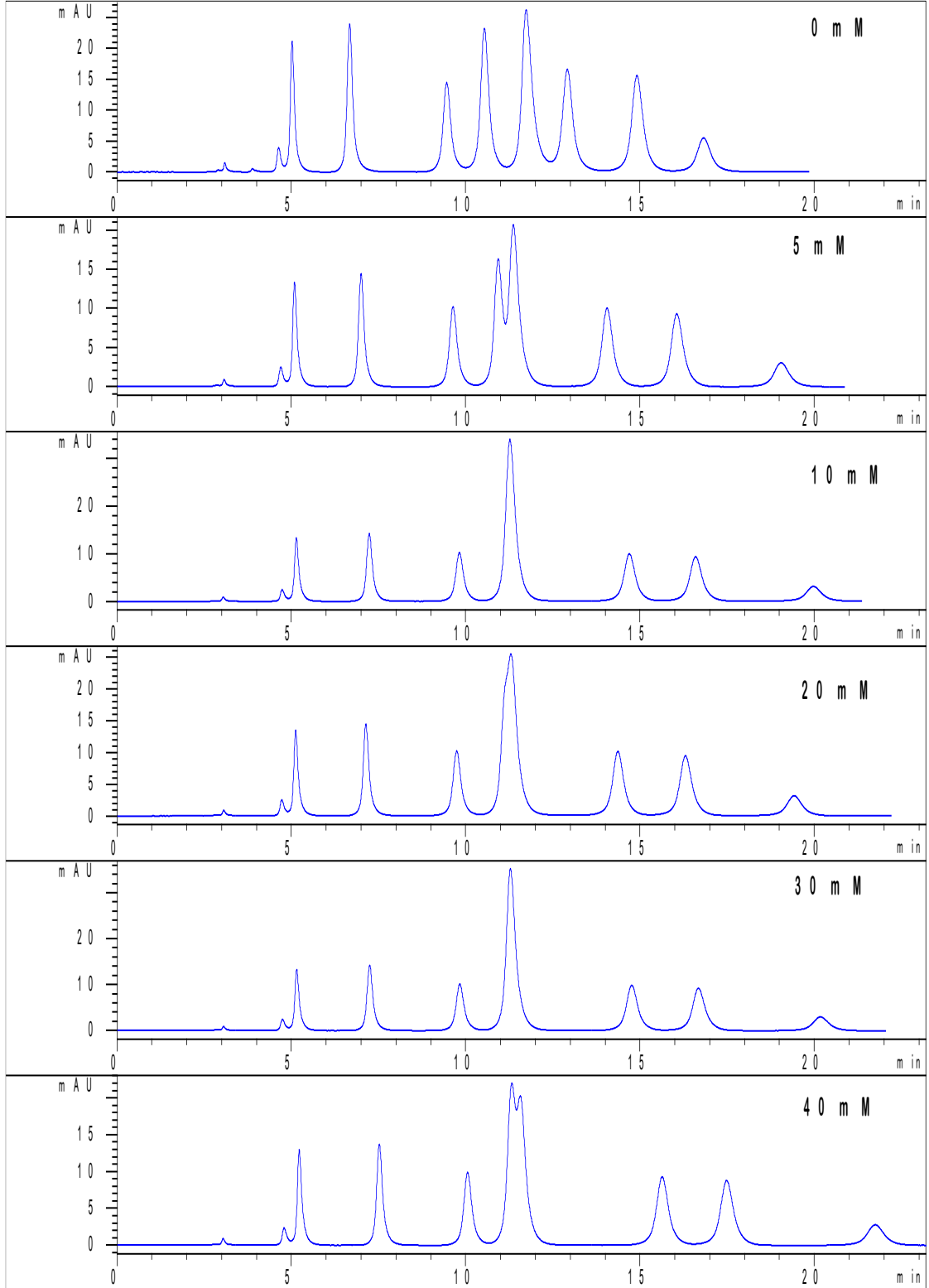
EK-14: Akış hızının DEA-Mix sabit faz üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar EK-4'te verilmiştir. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 92/8, sıcaklık: 20 °C.



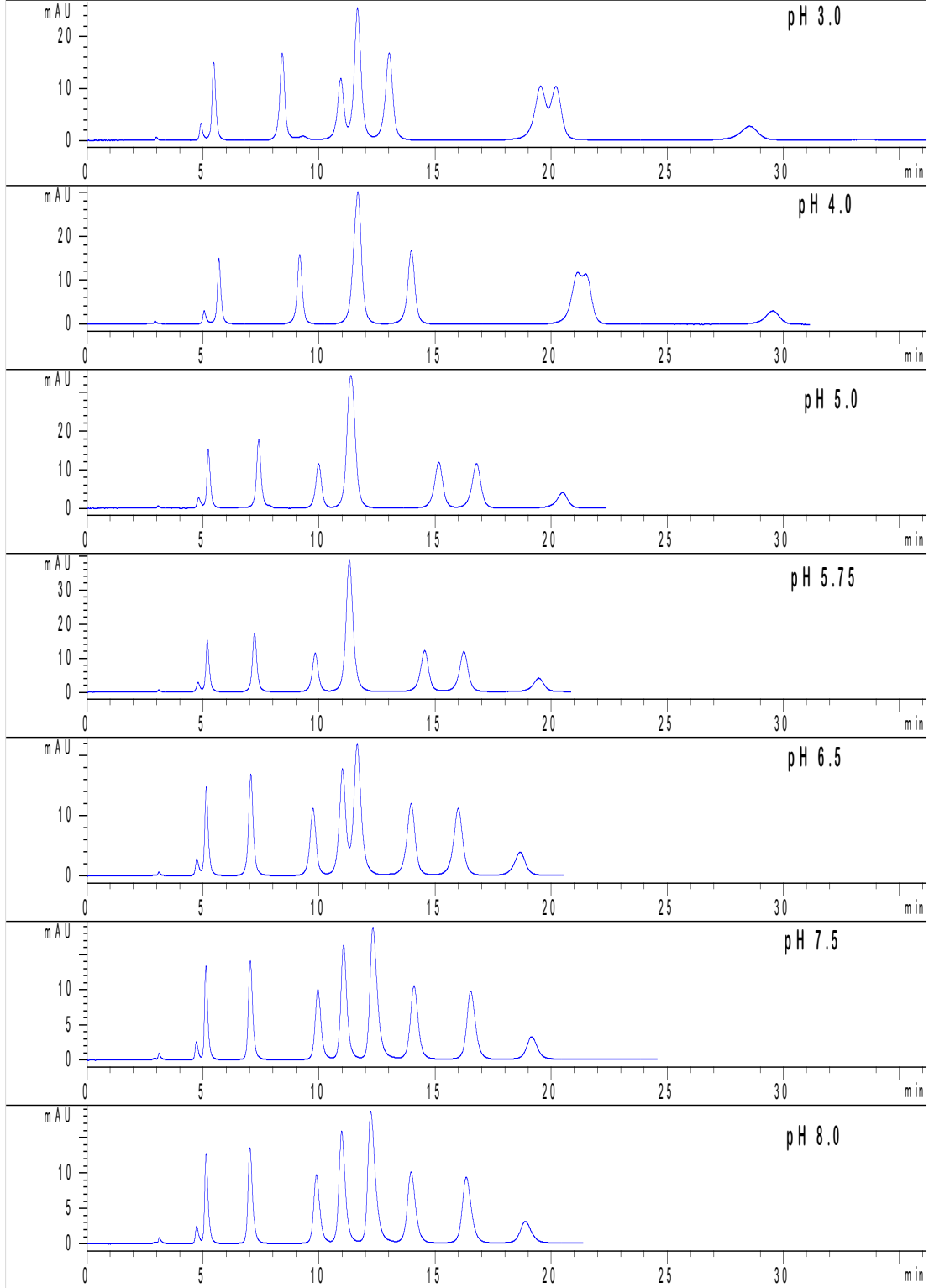
EK-15: Sıcaklığın DEA-Mix durağan faz üzerindeki nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar Şekil 2.4'te verilmiştir. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 92/8, akış hızı: 2.0 mL/dk,



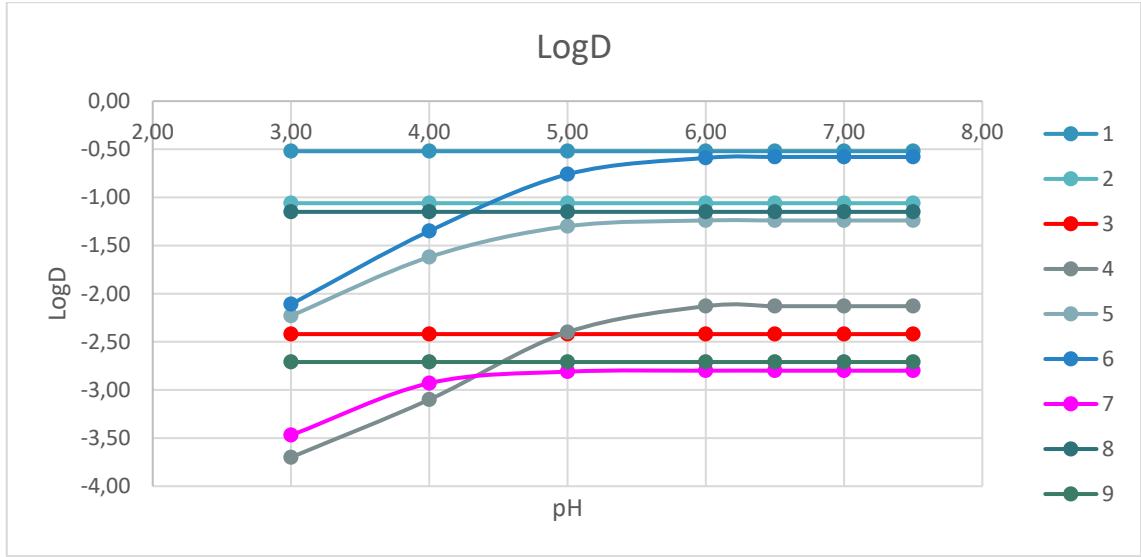
EK-16: Tampon konkantasyonunun DEA-Mix durağan faz üzerindeki nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar Şekil 2.4'te verilmiştir. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 90/10, (amonyum asetat pH 5.0), 1 mL/dak, 20 °C, 2 μ L, 265 nm



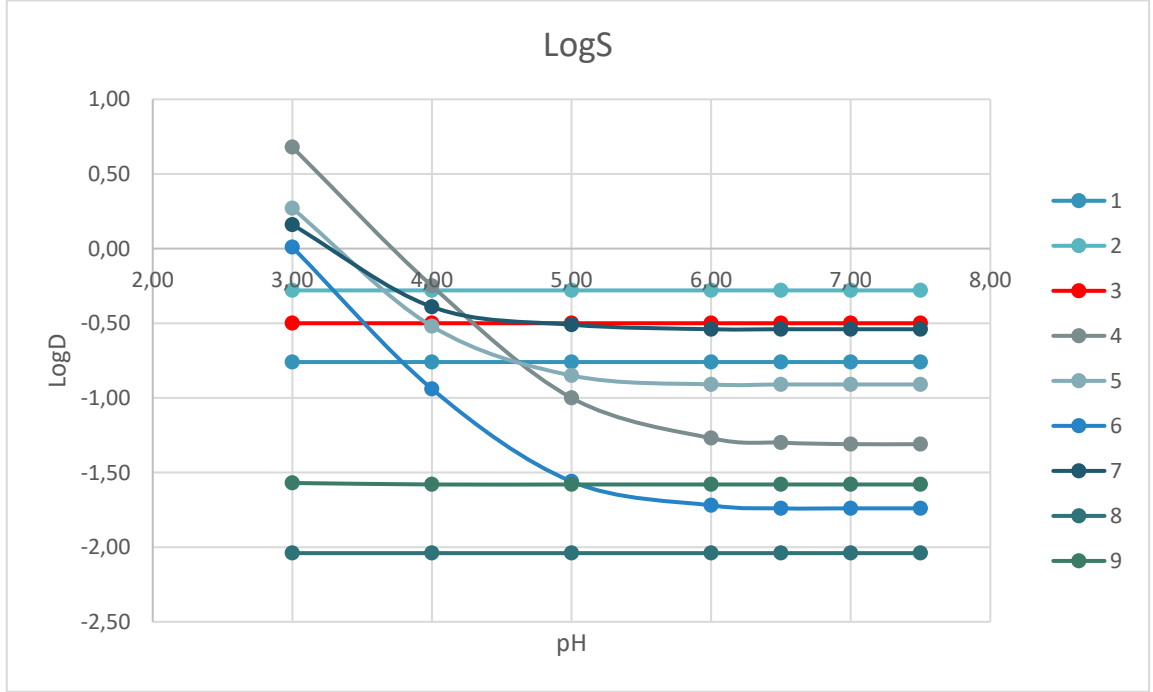
EK-17: pH'in DEA-Mix sabit faz üzerindeki nükleobazların/nükleositlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 90/10, (5 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1 mL/dak, 20 °C, 2µL, 265 nm



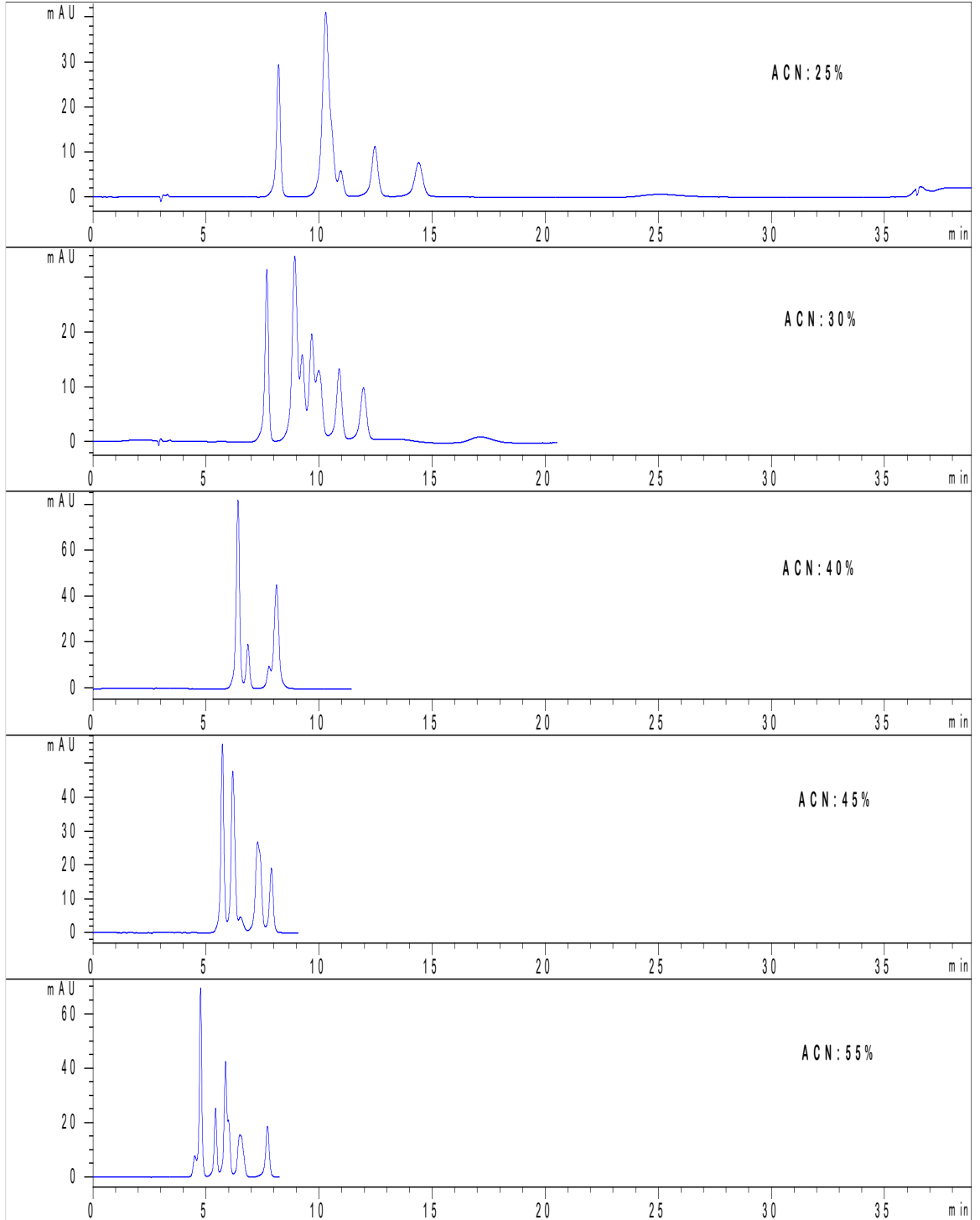
EK-18: Nükleobazların/nükleositlerin LogD değerlerinin pH'a göre değişimi.



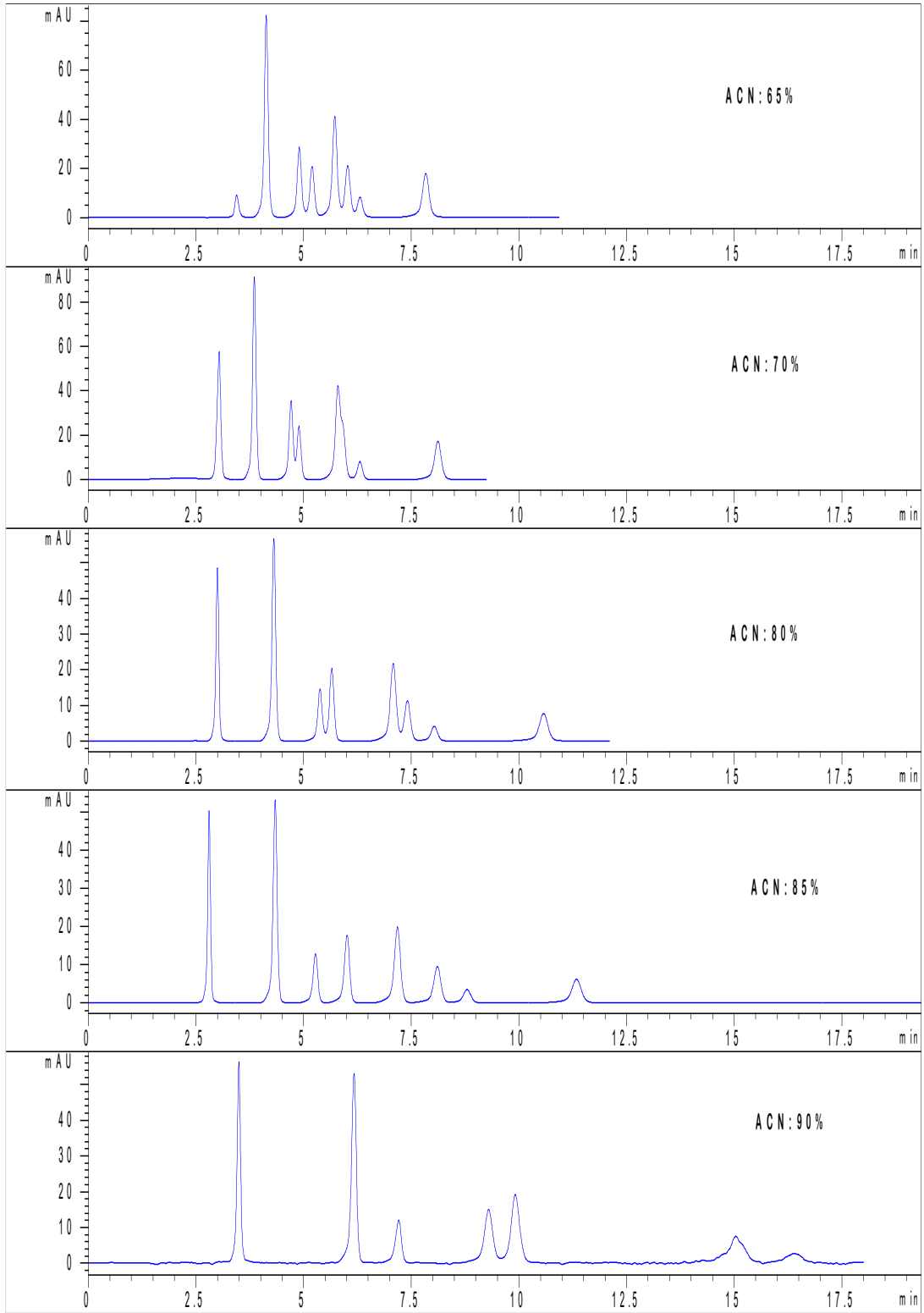
EK-19: Nükleobazların/nükleozitlerin LogS değerlerinin pH'a göre değişimi.



EK-20: ACN yüzdesinin DEA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi.
Koşullar: (20 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1 mL/dak, 25 °C, 2µL, 240 nm.

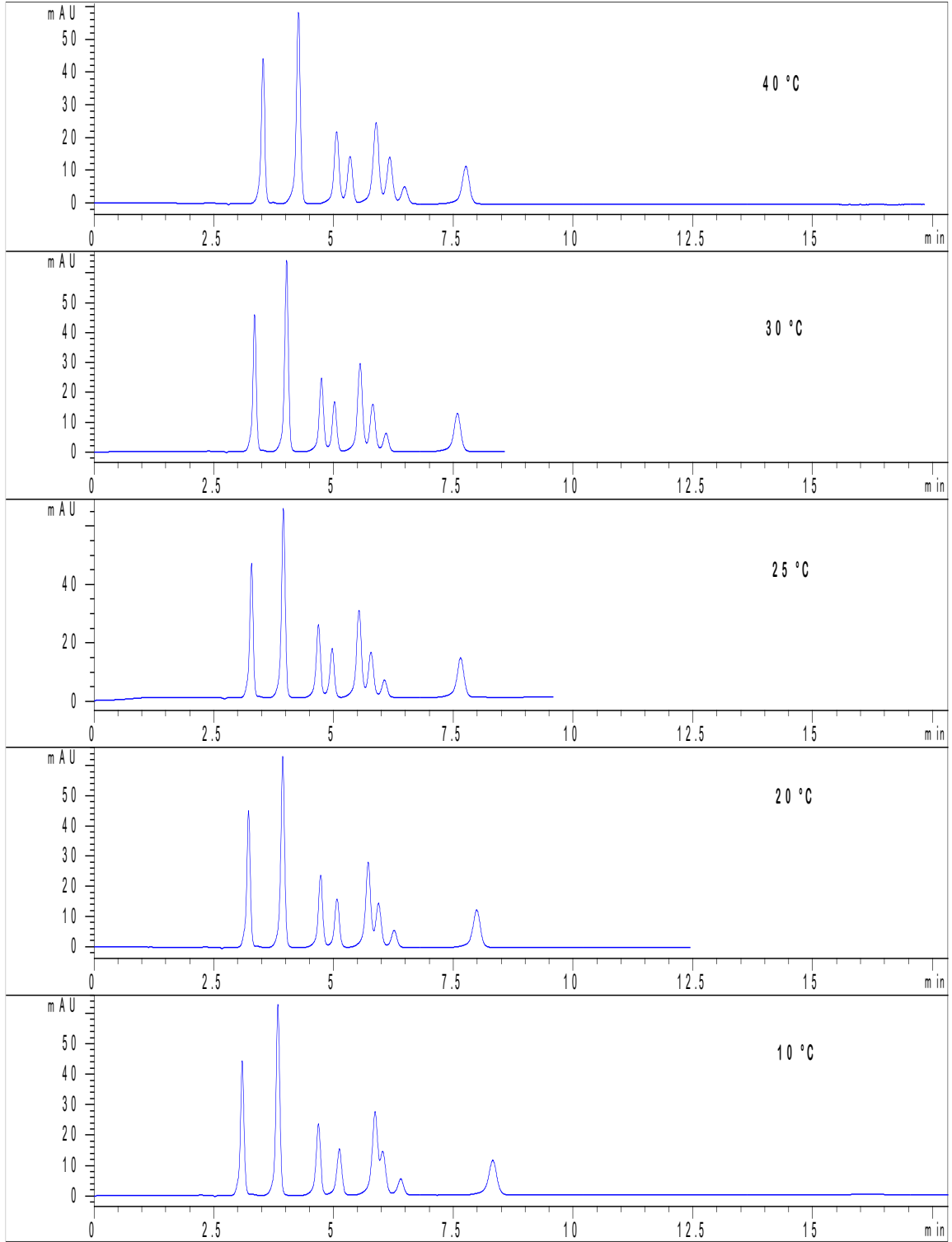


Devamı diğer sayfada...

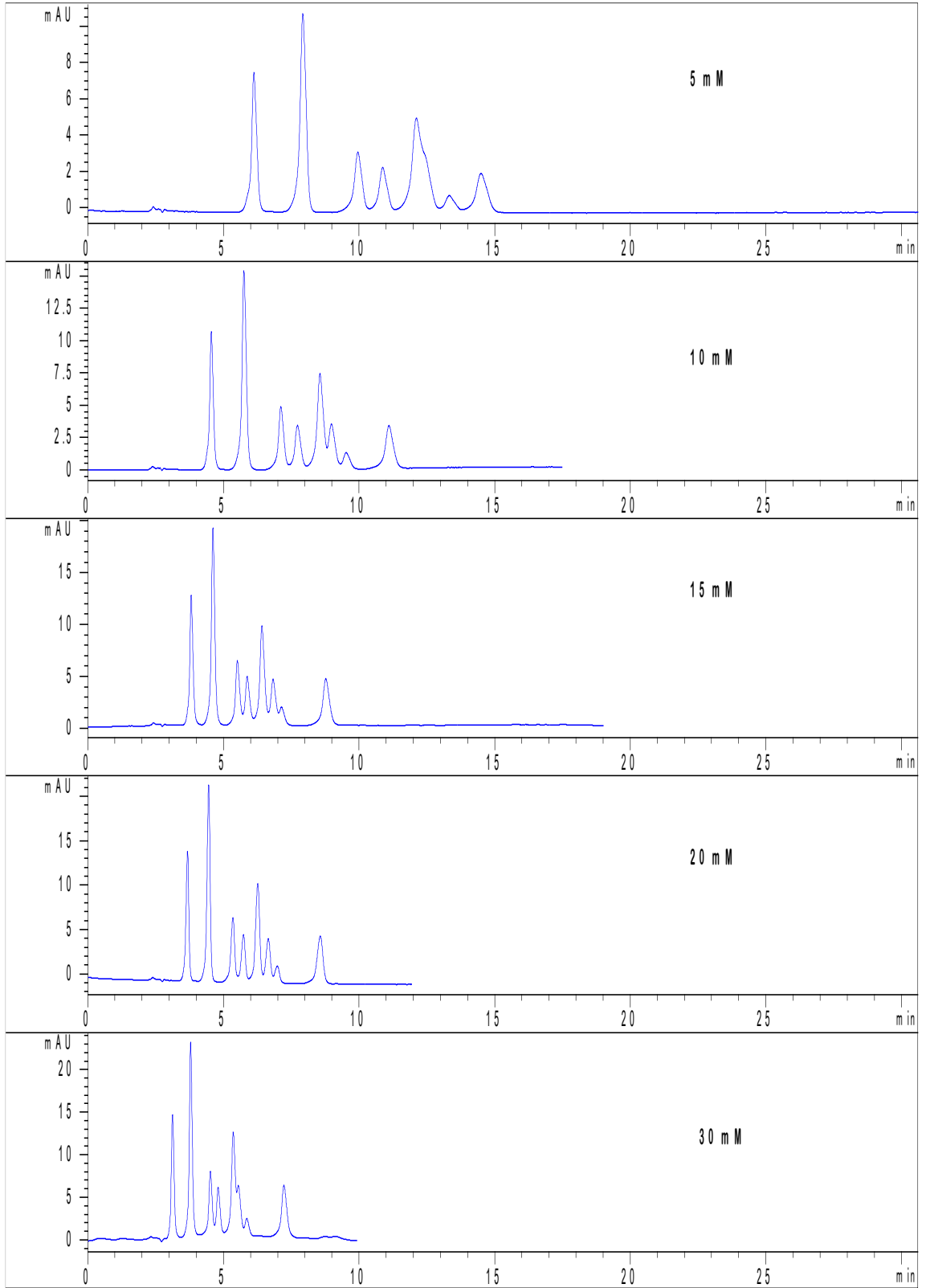


ACN yüzdesinin DEA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: (20 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1 mL/dak, 25 °C, 2 μ L, 240 nm.

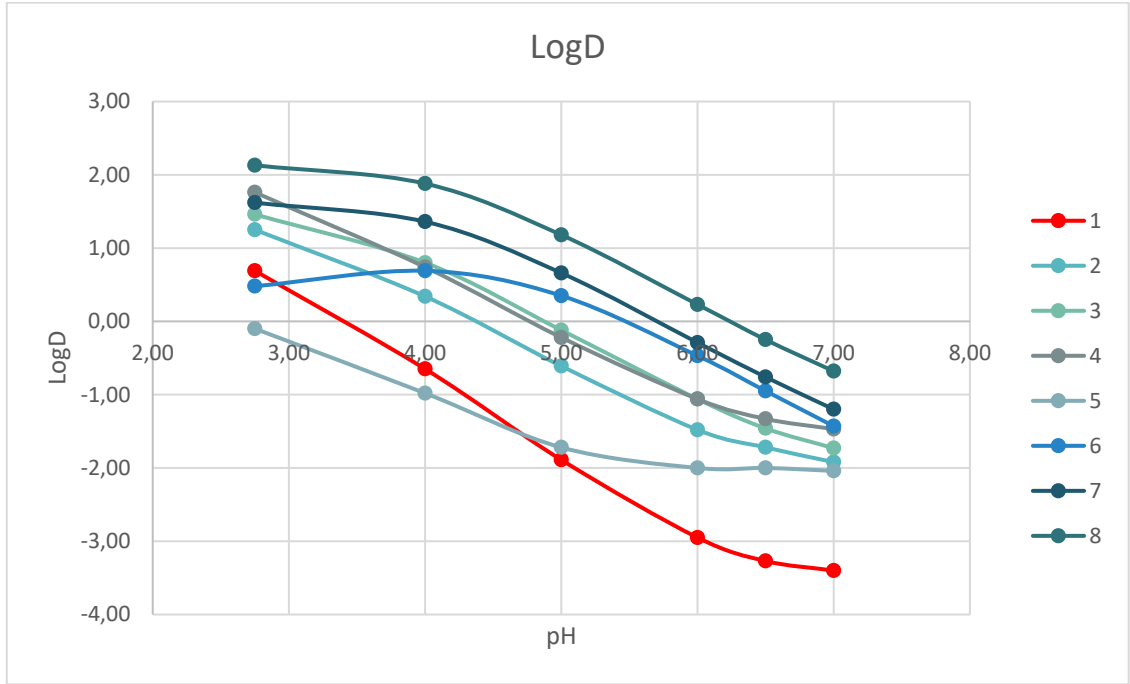
EK-21: Sıcaklığın ayırma benzoik asitleri üzerindeki etkisi DEA-Mix durağan fazı üzerinde. Koşullar: ACN/su (20 mM, pH 6.5 fosfat tamponu): 65/45, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm.



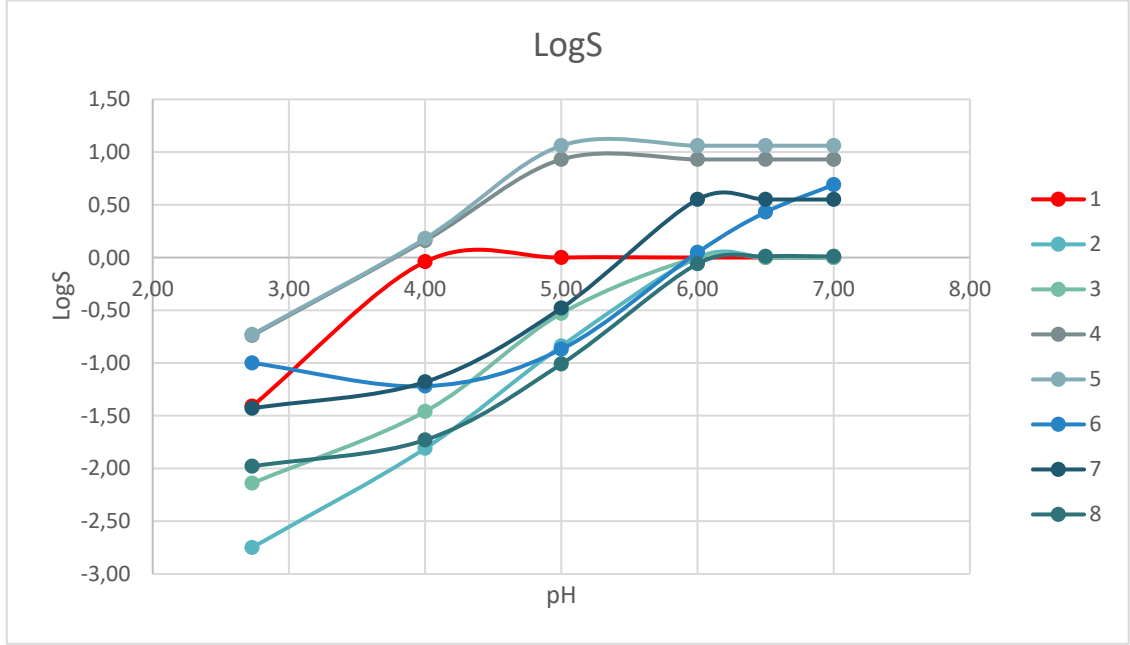
EK-22: Tampon konsantrasyonunun ayırma benzoik asitleri üzerindeki etkisi DEA-Mix sabit fazı üzerinde. Koşullar: ACN/su (pH 6.5 fosfat tamponu): 65/45, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm.



EK-23: Benzoik asitlerin LogD değerlerinin pH'a göre değişimi



EK-24: Benzoik asitlerin LogS değerlerinin pH'a göre değişimi



EK-25: Tekrarlanabilirlik çalışmaları: Koşullar: Mobil faz; ACN/su: 10/90, akış hızı: 0,8 mL/dak, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 2 µL, dedeksiyon dalga boyu: 265 nm. Analitler: 1) Timin, 2) Urasil, 3) Üridin, 4) Adenozin, 5) Sitozin, 6) Adenin, 7) Sitidin, 8) Guanin, 9) Guanozin.

A: İlk test

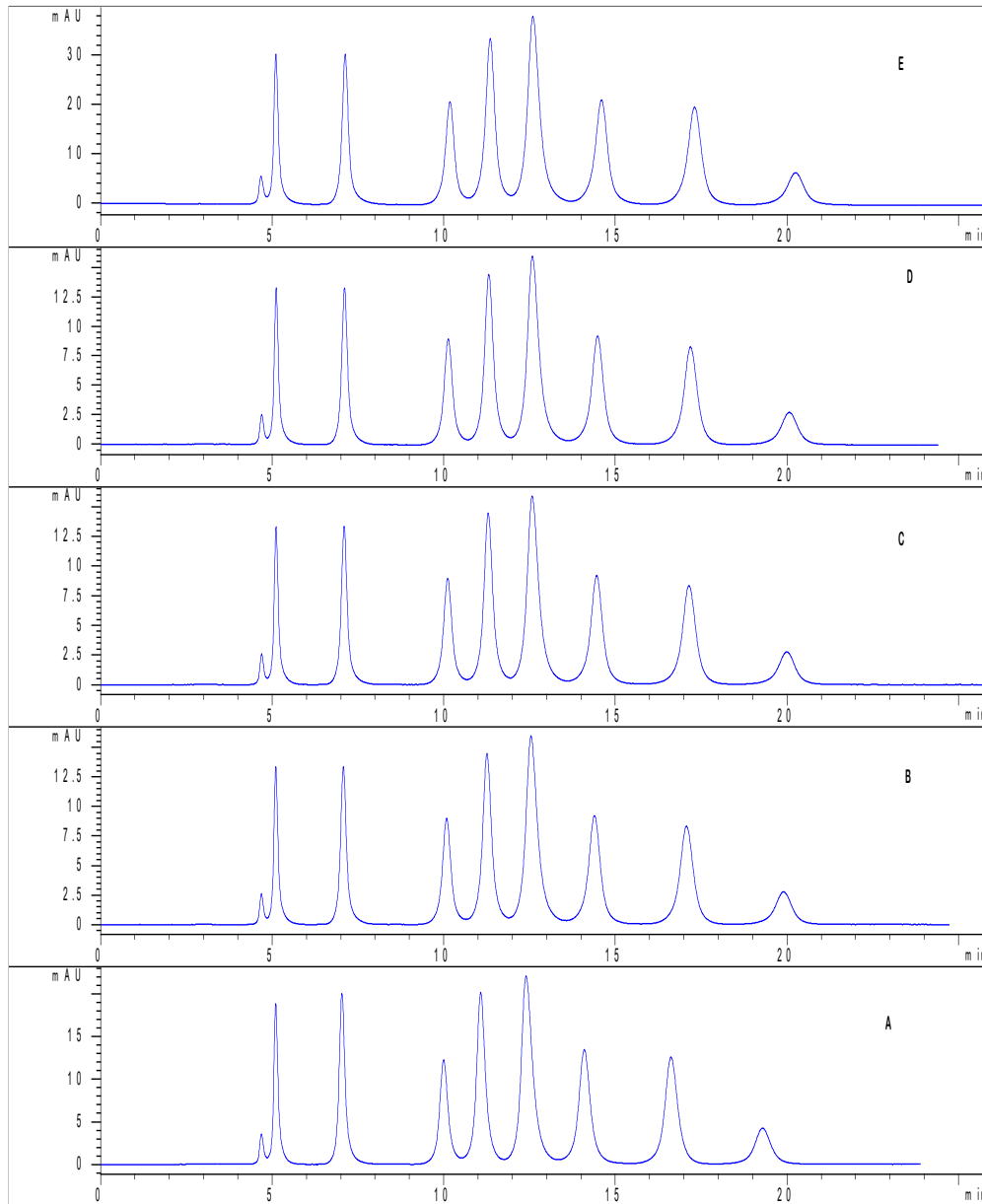
B: pH 5.0 ile 24 saat sonra (20 mM Amonyum asetat / asetik asit) / ACN: 50/50,

C: pH 3.0 ile 24 saat sonra (20 mM Amonyum format / formik asit) / ACN: 50/50,

D: pH 8.0 ile 24 saat sonra (20 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄) / ACN: 50/50,

E: pH 11.7 ile 2 saat sonra, Suda% 0.5 TE,

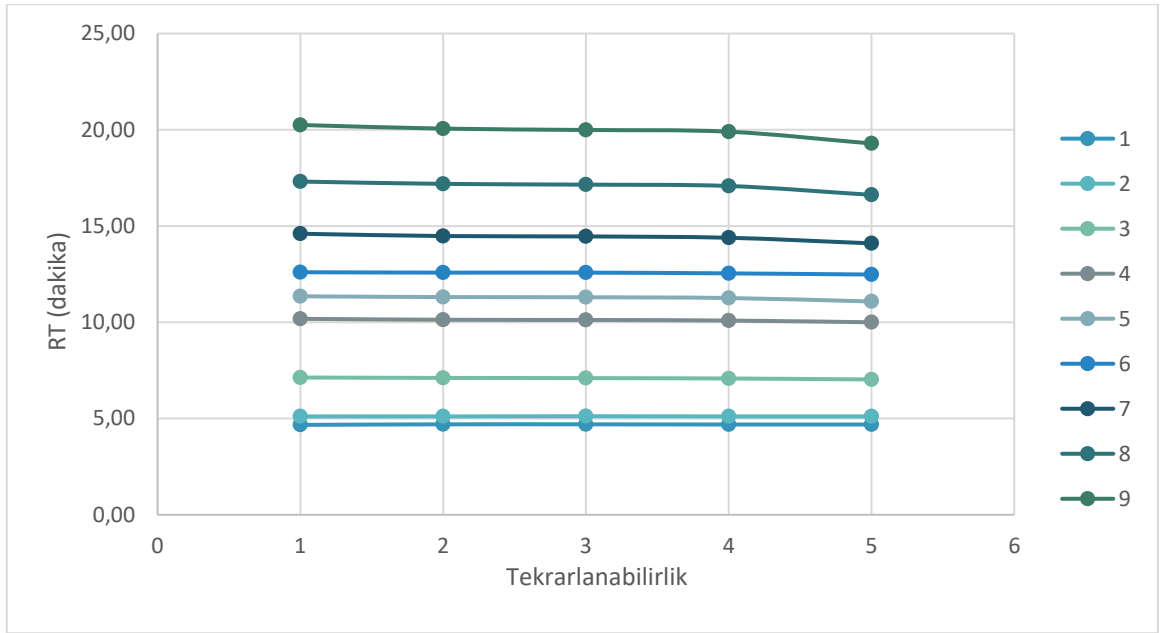
Analizler yukarıda verilen duruma dönülerek gerçekleştirilmiştir



EK-26: Tüm studiet nükleobazlar/nüklesitler için tekrarlanabilirlik çalışmaları

		A	B	C	D	E	RSD%
Timin	1	4.67	4.70	4.70	4.69	4.69	-0.43
Urasil	2	5.11	5.11	5.12	5.11	5.11	-0.04
üridin	3	7.13	7.11	7.10	7.08	7.03	0.56
Adenozin	4	10.18	10.13	10.12	10.09	10.00	0.75
Sitozin	5	11.35	11.31	11.30	11.26	11.08	0.80
Adenin	6	12.60	12.58	12.58	12.54	12.48	0.35
Sitidin	7	14.60	14.48	14.46	14.39	14.10	1.35
Guanin	8	17.31	17.19	17.15	17.08	16.62	1.41
Guanozin	9	20.25	20.06	19.99	19.90	19.29	1.77

EK-27: Tekrarlanabilirlik çalışmaları



EK-28: BET ANALİZ SONUÇLARI

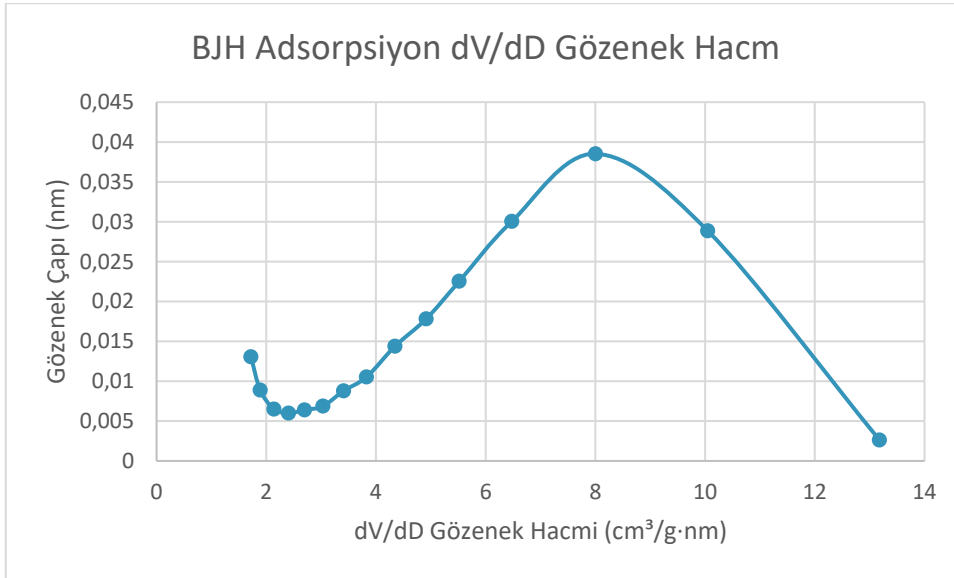
İzoterm			NLDFT (Türkçe) MC : dV/dW Hacim	
MC : Adsorpsiyon			Gözenek Genişliği (nm)	dV/dW Gözenek Hacmi (cm ³ /g·nm)
Bağıl Basınç (P/Po)	Adsorbe Edilen Miktar (cm ³ / g STP)			
0,0100693	16,2087		1,24731	0
0,029174	21,8115		1,30082	0
0,0483104	24,9857		1,35432	0
0,0818893	28,8175		1,42566	0
0,0973212	30,2538		1,47917	0,0274541
0,124568	32,4254		1,54338	0,0763614
0,149437	34,2277		1,62898	0,0269879
0,199203	37,4181		1,68606	0
0,24969	40,4067		1,77166	0,0321711
0,300225	43,3589		1,85727	0
0,352373	46,5079		1,94288	0,0381071
0,406346	49,9708		2,02849	0,0146669
0,456562	53,6227		2,1141	0,00776207
0,507378	57,8902		2,1997	0,00678504
0,563076	63,8695		2,31385	0,00696056
0,600101	68,9532		2,39946	0,00315033
0,648937	77,9865		2,5136	0,00018011
0,708862	95,5067		2,62774	0
0,771979	128,669		2,74189	0,00027973
0,810794	152,182		2,88457	0,00424073
0,92715	172,553		2,99871	0,00621063
0,999377	174,904		3,14139	0,0077633
			3,28407	0,0113924
			3,42675	0,0141607
			3,59797	0,01187
MC : Desorpsiyon				
Bağıl Basınç (P/Po)	Adsorbe Edilen Miktar (cm ³ / g STP)			
0,999377	174,904		3,76918	0,0161747
0,970384	173,553		3,91186	0,018389
0,898349	172,244		4,11162	0,0215526
0,854921	171,609		4,28283	0,0264342
0,795859	170,804		4,48258	0,0292382
0,713183	168,029		4,68234	0
0,682321	142,344		4,88209	0,0420053
0,665708	124,195		5,11038	0,0562844
0,626534	93,5828		5,33866	0
			5,59549	0,0907215

0,598383	82,2671
0,476024	58,1483
0,43428	52,7699
0,400827	50,1901
0,363324	47,7084
0,320412	45,0619
0,24042	40,3489

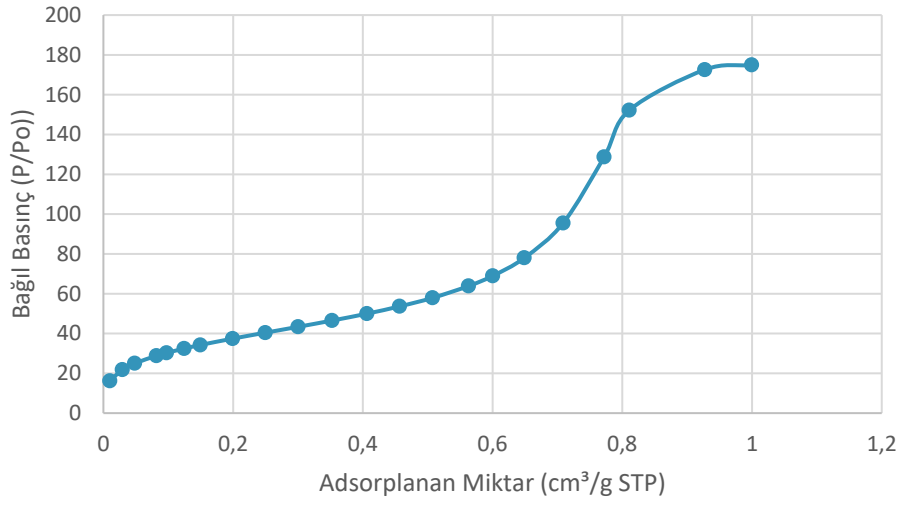
5,85231	0
6,10914	0
6,36596	0,131363
6,67986	0
6,96522	0,154797
7,27911	0
7,62154	0
7,96398	0
8,30641	0,137955
8,67738	0
9,07688	0
9,47638	0
9,90442	0,0546908
10,361	0
10,8176	0
11,3027	0
11,8163	0
12,3585	0
12,9292	0,0147153
13,5	0,0005655
14,0992	0,00066046
14,727	0,00038531
15,4119	0,00028528
16,0967	0,00023345
16,8101	0,00029693
17,5806	5,05E-05
18,3796	0,00020348
19,2072	0,00020335
20,0632	6,20E-05
20,9764	0,0001642
21,9181	9,69E-05
22,8883	6,54E-05
23,9441	6,51E-05
25	9,79E-05
26,1414	9,52E-05
27,3114	6,30E-05
28,5384	1,23E-05
29,8226	9,06E-05
31,1637	4,46E-05
32,562	1,58E-05
34,0459	5,70E-05
35,5583	2,58E-05
37,1848	2,66E-05
38,8399	5,17E-05
40,6092	1,80E-05
42,4355	2,65E-05

44,3188	2,59E-05
46,3164	Serisi
48,3995	1,18E-05
50,5968	0
	0,00012193

BET yüzey alanı: 140,9512 m²/g
 Toplam gözenek hacmi: 0,26207 cm³/g
 Mikro gözenek hacmi: 0,01612 cm³/g
 Mezopore hacmi: 0,25595 cm³/g
 Ortalama gözenek çapı: 7,61 nm
 Ortalama parçacık boyutu: 42,5679 nm



Adsorpsiyon İzotermi



Desorpsiyon İzotermi

