



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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tris(Hidroksimetil)Aminometan'dan Yola Çıkılarak Yeni Bir HPLC
Kolonunun Geliştirilmesi, Karma-Mod HPLC Uygulamaları Ve
Yapı-Etkileşim İlişkisinin İncelenmesi**

Kübra TUNÇ

**Temmuz-2025
BATMAN**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tris(Hidroksimetil)Aminometan'dan Yola Çıkılarak Yeni Bir HPLC
Kolonunun Geliştirilmesi, Karma-Mod HPLC Uygulamaları Ve
Yapı-Etkileşim İlişkisinin İncelenmesi**

Kübra TUNÇ

**Danışman
Prof. Dr. Tarık ARAL**

**Diğer Jüri Yeleri
Prof.Dr. Abdülkadir LEVENT Prof.Dr. Tarık ARAL Doç.Dr. Mehmet ÇOLAK**

**Temmuz-2025
BATMAN**

TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra TUNÇ tarafından hazırlanan “Tris(Hidroksimetil)Aminometan’dan Yola Çıkılarak Yeni Bir HPLC Kolonunun Geliştirilmesi, Karma-Mod HPLC Uygulamaları Ve Yapı-Etkileşim İlişkisinin İncelenmesi ” adlı tez çalışması 07/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof.Dr. Tarık ARAL

.....

Üye

Prof.Dr. Abdulkadir LEVENT

.....

Üye

Doç.Dr. Mehmet ÇOLAK

.....

.

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr.Öğr. Üyesi Ömer Murat ÖTER

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 223Z036 nolu proje 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.

Kübra TUNÇ
Tarih:07.07.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tris(Hidroksimetil)Aminometan'dan Yola Çıkılarak Yeni Bir HPLC Kolonunun Geliştirilmesi, Karma-Mod HPLC Uygulamaları Ve Yapı-Etkileşim İlişkisinin İncelenmesi

Kübra TUNÇ

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarık ARAL
2025, 119 Sayfa

Tris(hidroksimetil)aminometan ile fonksiyonize edilmiş yeni bir karma-mod durağan faz, RPLC, HILIC ve iyon değişim etkileşimleri yoluyla yapısal olarak çeşitli analitlerin verimli şekilde ayrılması amacıyla geliştirilmiştir. Malzeme hem hidrofilik hem de hidrofobik alanlar içeren kararlı bir faz oluşturan epoksi silanlar aracılığıyla, basit ve iki aşamalı bir yüzey modifikasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Yapısal bütünlüğü FTIR, katı hal NMR, SEM, BET ve elementel analiz ile doğrulanmıştır. Geliştirilen kolon; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'ler), alkilbenzenler, benzoik asit türevleri, fenoller, anilinler, Sudan boya ve nükleobaz/nükleozitlerin ayrılmasında üstün performans sergilemiştir. Özellikle, dokuz bileşenli bir nükleobaz/nükleozit karışımı HILIC modunda 18 dakika içerisinde tamamen ayrılmış ve aynı karışım, su bakımından zengin bir mobil faz (%95 H₂O, %5 ACN) altında ters faz koşullarında da başarıyla ayrılabilmiştir. Yüksek polariteye sahip bileşikler için gözlenen bu beklenmedik RPLC uyumluluğu, kolonun çift modlu alıkonma kapasitesini ortaya koymakta ve etkili bir karma-mod ayırma platformu olarak değerini vurgulamaktadır. Ek olarak, sekiz benzoik asit türevi 7 dakikanın altında tamamen ayrılarak hızlı ve verimli bir ayırma sağlanmıştır. Kolon verimlilik değerleri (N/m), bazı analitler için 40.000'in üzerine çıkarken; pik asimetri faktörleri (As) 1.0'a yakın bulunmuş ve bu da yüksek kromatografik performansı teyit etmiştir. Alıkonma-etkileşim mekanizmaları, logP, logD ve logS parametrelerine dayalı QSRR modelleri ile daha detaylı şekilde incelenmiş ve hidrofobik, hidrojen bağına dayalı ve elektrostatik etkileşimler dahil olmak üzere çoklu kuvvetlerin birlikte alıkonmayı yönettiği ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular, fonksiyonize edilmiş durağan fazın çok işlevli yapısını ve farmasötik, biyokimyasal ve çevresel HPLC uygulamaları açısından taşıdığı potansiyeli açık biçimde doğrulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tris(hidroksimetil)aminometan, Tris bazlı durağan faz, Karışık mod kromatografisi, QSRR, HILIC, Zayıf katyon değişimi, İyon değişimi

ABSTRACT

MASTER THESIS

Development of a New HPLC Column Based on Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane, Mixed-Mode HPLC Applications and Investigation of Structure-Interaction Relationships

Kübra TUNÇ

Batman University Graduate Education Institute

Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Tarık ARAL

2025, 119 Pages

A novel mixed-mode stationary phase functionalized with tris(hydroxymethyl)aminomethane was developed for the efficient separation of structurally diverse analytes through the combined retention mechanisms of reversed-phase liquid chromatography (RPLC), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), and ion-exchange interactions. The material was synthesized via a straightforward two-step surface modification using epoxy silanes, resulting in a chemically stable phase containing both hydrophilic and hydrophobic domains. Its structural integrity was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), solid-state nuclear magnetic resonance (NMR), scanning electron microscopy (SEM), Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area analysis, and elemental analysis. The column exhibited excellent separation performance for a broad range of analytes, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylbenzenes, benzoic acids, phenols, anilines, Sudan dyes, and nucleobases/nucleosides. Remarkably, a nine-component nucleobase/nucleoside mixture was baseline-resolved within 18 minutes under HILIC conditions and also successfully separated under reversed-phase conditions using a water-rich mobile phase (95% H₂O, 5% ACN). This unexpected RPLC compatibility for highly polar compounds emphasizes the column's dual retention capability and highlights its versatility as an effective mixed-mode platform. Furthermore, eight benzoic acid derivatives were completely resolved in under 7 minutes, demonstrating the column's capacity for rapid and efficient separations. Column efficiency values (N/m) exceeded 40,000 for several analytes, and peak asymmetry factors (As) consistently approached 1.0, indicating high chromatographic performance. Retention mechanisms were further elucidated using quantitative structure–retention relationship (QSRR) models based on logP, logD, and logS parameters, which revealed that hydrophobic interactions, hydrogen bonding, and electrostatic forces collectively governed analyte retention. These findings validate the multifunctionality of the functionalized stationary phase and underscore its strong potential for pharmaceutical, biochemical, and environmental HPLC applications.

Keywords: Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris-based stationary phase, Mixed-mode chromatography, QSRR, HILIC, Weak cation exchange, Ion exchange

ÖN SÖZ

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi, rehberliği, sabrı ve ilham verici yaklaşımıyla bana yol gösteren; kısıtlı imkânlar dâhilinde bile fırsatlar yaratarak çalışmama farklı bir perspektiften bakmamı sağlayan, her sorumu içtenlikle yanıtlayan ve öğrencisi olmaktan büyük bir onur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Tarık ARAL'a en içten şükranlarımı sunarım. Laboratuvar sürecinde güler yüzü, özverili desteği ve iş birliğiyle yanımda olan değerli çalışma arkadaşım Meryem DOKDEMİR'e gönülden teşekkür ederim. Bu çalışmanın oluşumunda büyük katkıları bulunan; bilgi ve tecrübesiyle laboratuvar ortamında her daim yanımda olarak bana destek veren saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ARAL'a minnetle teşekkür ederim. Ayrıca teorik altyapımı güçlendirmemde katkı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat SUNKUR'a ve her daim akademik ve manevi desteğini hissettiren Doç. Dr. Mehmet ÇOLAK hocama da içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımı yürütmem için laboratuvar imkânı sağlayan Kimya Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim. Hayatım boyunca bana koşulsuz destek veren, her kararında arkamda duran, cesaretim ve inancımın temelini oluşturan sevgili babam Halil TUNÇ'a ve annem Naime TUNÇ'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Varlıklarıyla gücümü pekiştiren, manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim kıymetli ablam ve abilerim Nursel, Asya, İbrahim ve Muhammed'e gönülden teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan bilgileriyle ve manevi açıdan desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Salih Yuluğtekine'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra TUNÇ
BATMAN-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. HPLC'ye Giriş ve Kromatografi.....	1
1.2. Ters Fazlı, Hidrofilik Etkileşimli ve Karışık Modlu Sıvı Kromatografisinin Gelişimi ve Uygulamaları	2
1.4. Ters Faz-Hidrofilik Etkileşim	4
1.5. Ters Faz-İyon Değişimi	6
1.6. Hidrofilik Etkileşim-İyon Değişimi	7
1.7. Üç Modlu MM-HPLC	8
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	9
2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış	9
2.2. HILIC için polar sabit fazlar	12
2.3. HILIC için ticari sabit fazlar	13
2.4. HILIC için ticari olmayan sabit fazlar	19
2.5. Karma modlu sabit faz	23
2.6. HILIC/IEX karma mod	24
2.7. RPLC/HILIC karma mod	24
2.8. RPLC/IEX/HILIC Karışık Mod	28
3. YÖNTEM	29
3.1. Malzemeler	29
3.2. Enstrümanlar	29
3.3. HPLC Koşulları	30
3.4. Yeni Durağan Fazın Sentezi	30
3.5. Sabit Faz'ın Paketlenmesi	31
3.6. Amino Kolonun Hazırlanması ve Paketlenmesi	31
3.7. QSRR Değerlerinin ve Kromatografik Parametrelerin Hesaplanması	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Sentezler.....	33
4.2. Karakterizasyonlar	34
4.3. HPLC Değerlendirmeleri	36

4.3.1. Nükleobazlar/nükleozidlerin HILIC alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi	36
4.3.1.2 Mobil Faz Kompozisyonu ve pH'ın nükleobazlar/nükleozidlerin alıkonma davranışları üzerindeki etkisi	41
4.3.2. Hidrofobik bileşiklerin ters faz alıkonma davranışının değerlendirilmesi ...	44
4.3.3. Orta polar bileşiklerin değerlendirilmesi: Sübstitüe fenoller ve anilinler.....	46
4.3.4. Benzoik asit türevlerinin IEX alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi .	50
4.3.4.1.Mobil Faz Kompozisyonu ve pH'ın Benzoik Asitlerin Alıkonma Davranışları Üzerindeki Etkisi.....	52
4.3.5. Benzoik asit türevlerinin IEX alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi .	55
4.3.5.1. Mobil Faz Kompozisyonu ve pH'ın Benzoik Asitlerin Alıkonma Davranışları Üzerindeki Etkisi.....	56
4.6. Tekrarlanabilirlik ve Stabilité Performansının Değerlendirilmesi.....	58
4.7. THMA-Mix SP'nin ACE C18 ve Kromasil-aminopropil SP'lerle ayırma performansının karşılaştırılması.	59
5.SONUÇLAR.....	63
KAYNAKLAR	64
EKLER	74

ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 Ticari olarak temin edilebilen sabit fazlar.....	16
Tablo 2.2 Ticari olmayan sabit fazlar.....	20
Tablo 2.3 Karma modlu sabit fazlar.....	26
Tablo 4.1 Hazırlanan durağan fazın temel bileşimi ve BET yüzey Karakterizasyonu.....	35
Tablo 4.2 THMA-Mix-SP için tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	58
Tablo 4.3 THMA-Mix-SP için kararlılık testleri.....	59



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Ters fazlı LC-HILIC sabit fazlar.....	6
Şekil 1.2 Ters fazlı sabit fazlar.....	7
Şekil 2.1 Hidrofilik etkileşim kromatografisi üzerindeki yayın sayısı.....	9
Şekil 2.2 Adsorbe edilmiş su tabakası ve bağlı ligandlar.....	10
Şekil 2.3 LUNA-HILIC kolonunda fenolik asitlerin ve flavonların alıkonması üzerindeki etkisi.....	25
Şekil 4.1 Yeni Durağan Faz'ın Sentezi.....	33
Şekil 4.2 THMA-Mix SP'nin FTIR spektrumu.....	35
Şekil 4.3 Boş silikanın (A) ve THMA-Mix SP'nin (B) SEM görüntüsü.....	36
Şekil 4.4 THMA-Mix SP üzerinde nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması.....	37
Şekil 4.5 THMA-Mix sabit fazında pH'nın Nükleobazların ayrılması üzerindeki etkisi.....	43
Şekil 4.6 Alkin benzenlerin, Sudan boyalarının ve PAH'ların THMA-Mix SP'de Ayrılması.....	44
Şekil 4.7 THMA-Mix SP de Sübstitüe Fenollerin ayrılması.....	46
Şekil 4.8 THMA-Mix SP de Sübstitüe Anilinlerin ayrılması.....	49
Şekil 4.9 Optimum koşullar altında THMA-Mix SP üzerinde Benazoik asitlerin ayrılması.....	51
Şekil 4.10 ACN yüzdesinin ve pH nın THMA-Mix SP üzerinde Benazoik asitlerin ayrılması.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABDMS : Aminobütildimetilmetoksisilane

ACN : Asetonitril

CD : Karbon noktaları

C-CP : Kapiler kanallı polimer

CSP'ler : Kiral sabit fazlar

EC: Elektron Kromatografisi

EtOH : Etanol

EPI : Epiklorohidrin

FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)

GPC : Jel Geçirgenlik Kromatografisi

GC : Gaz Kromatografisi

HCIC : Hidrofobik yük indüksiyon kromatografisi

HIC : Hidrofobik etkileşim kromatografisi

HILIC : Hydrophilic Interaction Chromatography Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi

HPLC:High-Performance Liquid Chromatography Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IEC : İyon Değişim Kromatografisi

IC: İyon Kromatografisi

IL: İyonik Sıvı

LC : Sıvı kromatografi

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

logS : Bir bileşiğin suda çözünürlük derecesinin logaritmik bir ölçüsüdür

MCC : Çok Kolonlu Kromatografisi

MeOH : Metanol

MMC : Karma Mod Kromatografisi

MOF'ler : Metal-Organik Çerçeveler

MS : Kütle Spektrometrisi

NPLC : Normal-Phase Liquid Chromatography (Hidrofilik EtkileşimKromatografisi)

1. GİRİŞ

1.1. HPLC'ye Giriş ve Kromatografi

Kromatografi, karmaşık bir numune içerisindeki farklı bileşenlerin birbirinden ayrılması ve analiz edilmesine imkân tanıyan bir ayırma tekniğidir. Genel olarak, bir numune; analitler ve matris olarak adlandırılan iki ana bileşenden oluşur. Analitler, analiz edilmek istenen hedef molekülleri ifade ederken; matris, numunedeki geri kalan diğer bileşenleri kapsar. Kromatografik analizde, hedef analitlerin matristen ayrılabilmesi için numunenin genellikle uygun bir çözücü ile çözündürülmesi veya ön işleminden geçirilmesi gerekebilir (ör. Haddad, Taraji ve Szucs, 2021). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ya da literatürdeki diğer adıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, modern analitik kimyada en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. HPLC sistemlerinde sabit faz, genellikle çapları 1–5 µm aralığında değişen gözenekli partiküllerle doldurulmuş bir kolon formundadır. Hareketli faz ya da diğer adıyla elüent, yüksek basınç altında bir pompa aracılığıyla bu kolon boyunca geçirilir. Numunede bulunan çözünen bileşikler, hareketli faz içerisine küçük hacimlerde enjekte edilerek kolona taşınır ve burada bileşenlerin sabit faz ile etkileşim derecelerine bağlı olarak birbirlerinden ayrılması sağlanır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ya da literatürdeki diğer adıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, modern analitik kimyada en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. HPLC sistemlerinde sabit faz, genellikle çapları 1–5 µm aralığında değişen gözenekli partiküllerle doldurulmuş bir kolon formundadır. Hareketli faz ya da diğer adıyla elüent, yüksek basınç altında bir pompa aracılığıyla bu kolon boyunca geçirilir. Numunede bulunan çözünen bileşikler, hareketli faz içerisine küçük hacimlerde enjekte edilerek kolona taşınır ve burada bileşenlerin sabit faz ile etkileşim derecelerine bağlı olarak birbirlerinden ayrılması sağlanır. Kromatografi, farklı moleküler türlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak bir karışımdan ayrıştırılmasına imkân tanıyan çeşitli teknikleri kapsayan genel bir terimdir. Bu yöntemler, hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Temelde, ayırma süreci bir sabit faz ve bir hareketli faz

olmak üzere iki ana bileşene dayanır. Sabit faz, ayrıştırılmak istenen moleküler türleri farklı kuvvetlerde tutarak, bunları zaman içinde hareketli faza geri bırakır. Böylece bileşenler, kolon çıkışında belirli bir sırayla tespit edilebilir. Hareketli fazın fiziksel hâline bağlı olarak kromatografi farklı isimler alır. Hareketli faz bir gaz olduğunda bu teknik gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılırken, hareketli fazın bir sıvı olması durumunda sıvı kromatografisi (LC) terimi kullanılır. Günümüzde, sıvı kromatografisi, özellikle HPLC sistemleri, farmasötik analizlerden çevresel izleme çalışmalarına kadar geniş bir yelpazede tercih edilmektedir (Broeckhoven & Desmet, 2021). Diğer yaygın kromatografi türleri arasında süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), karşı akım kromatografisi (CCC) ve elektro-kromatografi (EC) yer almaktadır. Numune analizlerinde bileşenler genellikle uygun bir çözücü (elüent) içinde çözündürülerek sisteme enjekte edilir. Hareketli faz, çözünen bileşikler sabit faz boyunca taşırken; analitlerin sabit fazla etkileşimi, bileşenlerin ayrılma derecesini belirler. Bu bağlamda, sabit fazın fiziksel ve kimyasal özellikleri, partikül boyutu, yüzey modifikasyonu ve porozitesi, ayrılmanın verimliliğini doğrudan etkilemektedir (Zhang & Qiu, 2015).

1.2.Ters Fazlı, Hidrofilik Etkileşimli ve Karışık Modlu Sıvı Kromatografisinin Gelişimi ve Uygulamaları

Mevcut çok sayıda ayırma modu arasında, ters fazlı sıvı kromatografisi (LC), en yaygın tercih edilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) modudur (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2012). Ters fazlı LC'de genellikle C18 kolonları kullanılmaktadır. Bu kolonlarda baskın olan tutma mekanizması, sabit faz ile analitler arasında gerçekleşen dispersiyon (Londra) etkileşimleri olup, yaygın adıyla hidrofobik etkileşimler olarak anılmaktadır. Bununla birlikte, ikincil "parazit" hidrofilik etkileşimler de görülebilir; özellikle kolon uç kaplaması yoksa, kalıntı silanol grupları analitlerle etkileşime girerek tepe şeklinin bozulmasına ve verimin düşmesine yol açabilir (Dong, 2006). Ters fazlı LC, hidrofobik bileşiklerin ayrılmasında yüksek etkinlik sağlarken, polar veya iyonik bileşiklerin alıkonmasında sınırlı kalmaktadır. Bu durum, özellikle farmasötik ve biyolojik analizlerde, polar ilaç bileşikler, metabolitler veya iyonik türlerin ayrılması gerektiğinde önemli bir kısıtlamadır. Bu tür bileşiklerin analizinde, RPLC'ye alternatif modların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Geçmişte, iyon-eşlemeli ters fazlı LC yöntemleri geliştirilmiş ve özellikle aktif farmasötik bileşenler (API) ve karşı iyonlarının eşzamanlı alıkonması amaçlanmıştır (Poole, 2003).

Ancak bu yöntemler, metot geliştirme süresini uzatmakta ve kütle spektrometrisi (MS) ile tam uyumluluk sağlamamaktadır (Poole, 2003). Bu nedenle, MS dedektörleriyle uyumlu alternatif modlara yönelim artmıştır. Bu bağlamda hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC), yüksek oranda organik çözücü (genellikle %70–98 asetonitril) ve düşük su içeriği ile polar ve iyonik bileşikler için güçlü bir tutma mekanizması sunarak öne çıkmıştır (Alpert, 1990; Hemström & Irgum, 2006). HILIC modunda tutma, sabit faza adsorbe olan su tabakası ile hareketli faz arasında bölünme ve sabit faz yüzeyine adsorpsiyon yoluyla gerçekleşmektedir. Bu özellik, elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (ESI–MS) ile uyumluluğu artırmakta ve polar analitlerin hassas tespitine imkan tanımaktadır (McCalley, 2017). Ancak HILIC’in de dezavantajları vardır: bazı bileşiklerin yüksek oranda organik çözücüde düşük çözünürlüğü, uzun kolon dengelenme süreleri ve enjeksiyon çözücüsünün pik şekli üzerindeki kritik etkileri, yöntemin pratikliğini sınırlandırmaktadır (Hemström & Irgum, 2006). İyon değişim kromatografisi (IEX) ise iyonik türlerin yüklerine göre ayrılmasını sağlayarak önemli bir seçenek sunmaktadır (Snyder et al., 2012). Ancak yüksek tuz konsantrasyonu gerekliliği, MS dedektörleri ile uyumluluğu kısıtlayabilir (Zhang, Zhang, & Guo, 2015). Alternatif bir yaklaşım olarak süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), ters fazlı LC’ye kıyasla yüksek ortogonalite ve farklı sabit faz seçenekleri sunmakta, polar ve hidrofobik bileşenlerin ayrılmasında esneklik sağlamaktadır (Lesellier & West, 2015). Yine de, SFC cihazlarının yaygın olmayışı, HPLC sistemlerinin pratik avantajını sürdürmesine neden olmaktadır. 1980’lerde araştırmacılar, ters fazlı LC’de ikincil etkileşimlerin ayırma gücüne katkısını araştırmaya başlamış ve bu çabalar karışık modlu sıvı kromatografisinin (MM-HPLC) temellerini oluşturmuştur (Regnier, 1987). MM-HPLC kavramı, 1986 yılında bir kolonda hem ters fazlı LC hem de iyon değişim modunun kombinasyonu kullanılarak proteinlerin ayrılmasıyla literatüre girmiştir (Regnier, 1987). Bu ilk uygulamadan günümüze kadar, MM-HPLC sabit fazları çeşitli tasarım yaklaşımlarıyla geliştirilmiş ve bazıları ticari olarak sunulmuştur (Guo, 2022). MM-HPLC’de sabit fazlar üç temel şekilde tasarlanabilir: (i) bir ligand birden fazla fonksiyonel grup içerecek şekilde modifiye edilir, (ii) farklı ligandlar aynı destek materyaline immobilize edilir veya (iii) farklı ligandlara sahip parçacıklar aynı kolonda karıştırılarak hibrit fazlar oluşturulur (Wu, Zhang, & Luo, 2022). Bu tasarımlar sayesinde birden fazla tutma mekanizması aynı anda etkinleştirilerek hem polar hem de apolar bileşiklerin aynı kolonda etkili şekilde ayrılması sağlanır. Üstelik MM-HPLC, IEX moduna kıyasla daha düşük tuz

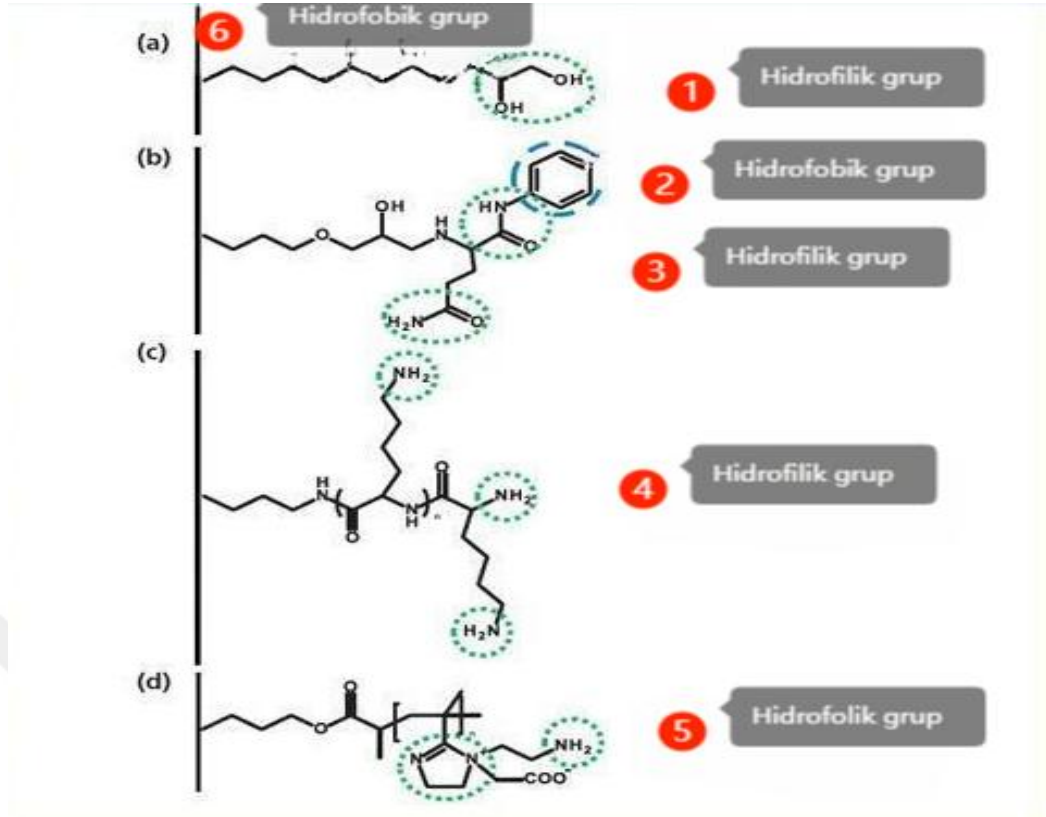
konsantrasyonlarıyla çalışabildiği için MS dedektörleriyle uyumluluk açısından da avantajlıdır (Guo, 2022).

1.3. Karma Modlu Kromatografi Sabit Fazlar

Gerçekten de, MM-HPLC sabit fazlarının gelişimi, literatürde önceki derlemelerde kapsamlı bir biçimde ele alınmıştır (Guo, 2022; Wu et al., 2022). Bu çalışmanın temel amacı, yalnızca yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemlerinde kullanılan karışık modlu sabit fazları (Mixed-Mode Stationary Phases, MMSPs) örnekler ve yeni nesil sentez stratejileri ile vurgulamaktır. Bu fazların katı faz ekstraksiyonu (SPE) amaçlı kullanımları bu kapsamın dışındadır çünkü SPE genelde örnek hazırlama adımlarında kullanılırken MM-HPLC, esas olarak kompleks matrislerde hassas ve seçici ayırma sağlamayı hedefler. Modern analitik kimyada, gıda güvenliğinden farmasötik kalite kontrolüne, klinik tanıdan çevresel izleme programlarına kadar birçok alanda çoklu tutma mekanizmasına sahip kolonlara duyulan ihtiyaç artmaktadır (McCalley, 2017). Bu gereksinim, özellikle tek modlu klasik fazların sınırlı kalabildiği karmaşık örnek matrislerinde belirginleşmektedir. Bu nedenle MM-HPLC, son on yılda literatürde önemli bir yer edinmiş ve ticari ürün çeşitliliği hızla artmıştır. Birleştirilmiş etkileşim türlerinin dört ana grup altında toplanması, karma modlu sabit fazların tasarım prensiplerinin anlaşılmasını kolaylaştırır (Teleki & Takors, 2019). Bu fazlar; ters faz-hidrofilik etkileşim (RPLC-HILIC), ters faz-iyon değişimi (RPLC-IEX), hidrofilik etkileşim-iyon değişimi (HILIC-IEX) ve daha karmaşık üç modlu MM-HPLC kombinasyonları olarak sınıflandırılır. Her bir kombinasyon, kolondaki bağlayıcı ligandların içerdiği fonksiyonel grupların çeşitliliğine bağlıdır. Uygulamada, hareketli fazın organik/su oranı, pH değeri ve tuz derişimi gibi parametreler, hangi tutma mekanizmasının baskın olacağını belirler (Zhang et al., 2021). Örneğin, yüksek organik oranlı bir mobil fazda HILIC mekanizması baskın hale gelirken, düşük organik oranlı koşullarda ters faz mekanizması devreye girer. Bu durum, metot geliştirme sürecinde kullanıcılara oldukça geniş bir seçicilik aralığı sunar ve kolon kullanımını esnek hale getirir. Bazı durumlarda, kullanıcı aynı kolonu iki ayrı modda çalıştırarak aynı matriste hem apolar hem de yüksek polar bileşenleri tek enjeksiyonda ayırabilir (McCalley, 2017).

1.4. Ters Faz-Hidrofilik Etkileşim

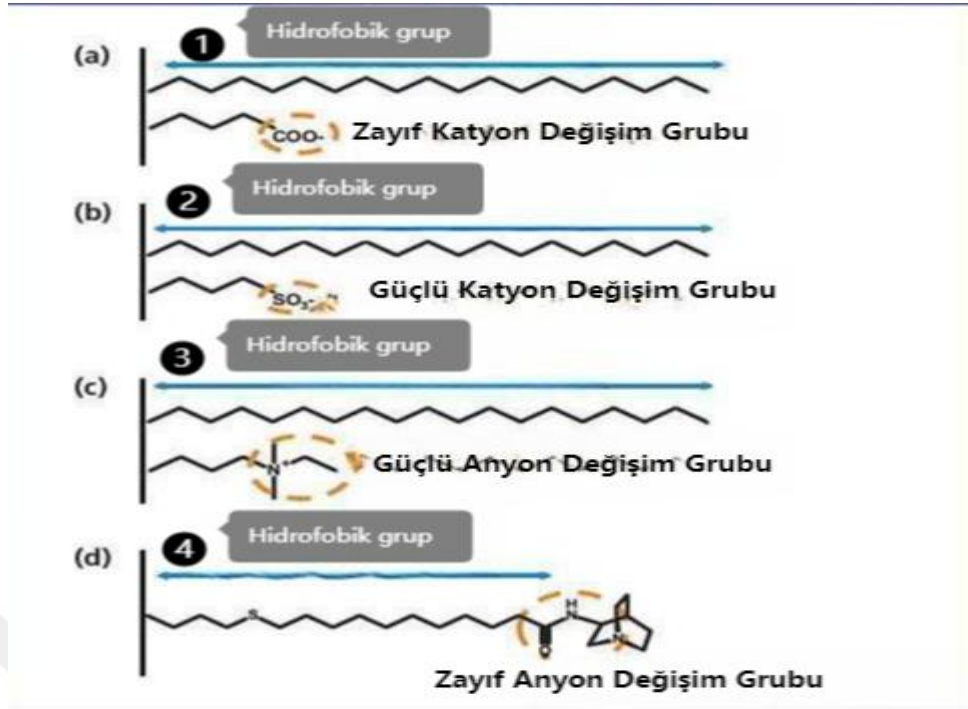
Ters faz LC ve hidrofilik etkileşim LC'nin aynı sabit fazda birleştirilmesi, geniş polarite aralığına sahip örneklerin analizi için büyük avantaj sağlar. Bu kombinasyon, ilaç kalıntılarından gıda katkılarına, biyobelirteçlerden doğal ürün ekstraktlarına kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Ters faz LC orta derecede polar ve apolar bileşenleri alkil zincirler (C8, C18) ya da aromatik halkalar üzerinden tutarken, HILIC segmenti su tabakası aracılığıyla polar analitlerin alıkonmasına imkân tanır (Guo, 2022). Modern RPLC-HILIC kolonlarında diol, siyano, amid veya iyonik gruplarla işlevselleştirilmiş karma yüzeyler tasarlanır. Örneğin Aral ve arkadaşlarının (26) geliştirdiği terminal amid gruplarıyla zenginleştirilmiş sabit faz, büyük pH değişimlerine karşı direnç göstererek asidik ve bazik türlerin ayrımını aynı sistemde mümkün kılar. Benzer şekilde, poli-L-lizin veya surfaktin gibi biyopolimer temelli ligandlar, faza kiral özellik kazandırarak enantiyoselektif ayırmaya olanak tanır (Ohyama et al., 2020). Bu fazlarda tutma kapasitesi, hareketli fazdaki asetonyitril yüzdesi artırıldığında HILIC mekanizması, su oranı artırıldığında ters faz mekanizması baskın olur. Bu da metot geliştirme sırasında önemli bir parametre optimizasyonu alanı sunar. Zwitteriyonik ligandlarla desteklenmiş iyonik sıvılar, karışık modlu sabit faz tasarımında önemli bir devrim yaratmıştır. İyonik sıvılar; güçlü elektrostatik etkileşim, dipol-dipol çekim, π - π istiflenme ve hidrojen bağı gibi çok yönlü etkileşimlere imkân tanır. Bu özellik, tek modlu kolonların yetersiz kaldığı polifenol, flavonoid, nükleozit gibi bileşik gruplarının analizinde kritik avantaj sağlar (Li et al., 2020). Özellikle çözücüsüz mikrodalga destekli polimerizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, bu fazların sentez verimliliğini artırır ve çevreye duyarlı üretim imkânı sağlar (Qiao et al., 2022). Trikatyonik veya dikatik yapılar, farklı yüklü analit gruplarının ayrılmasına katkıda bulunur.



Şekil 1.1. (a) diol (17,25), (b) amid (26), (c) amin (27) ve (d) zwitteriyonik polar gruplara (32) sahip farklı ters fazlı LC-HILIC sabit fazlar.

1.5.Ters Faz-İyon Değişimi

Ters faz LC ile iyon değişim modunun birleştirilmesi, güçlü bir hidrofobik + elektrostatik etkileşim mekanizması sunar. Alkil zincirlerine entegre edilen karboksilik, sülfonik veya kuaterner amonyum gibi gruplar, fazı WCX, SCX, SAX ya da WAX modlarında çalıştırmayı mümkün kılar (Zhang et al., 2021). Wei ve arkadaşları (37) tarafından geliştirilen C18 zincirli kuaterner amonyum kaplı kolon, oligonükleotid gibi zorlu biyomoleküllerin ayrımında yüksek verim göstermiştir. Son yıllarda tiol-en tıklama kimyasıyla geliştirilen hibrit fazlar, MS uyumlu sistemlerde düşük iyonik güçle yüksek ayırım gücü sağlar ve iyon eşleştirme reaktiflerine olan ihtiyacı azaltır (Lämmerhofer & Lindner, 2021).



Şekil 1.2. (a) Zayıf katyon değişim grubu içeren ters fazlı karma mod sabit faz, (b) güçlü katyon değişim grubu içeren ters fazlı karma mod sabit faz, (c) güçlü anyon değişim grubu içeren ters fazlı karma mod sabit faz ve (d) zayıf anyon değişim grubu içeren ters fazlı karma mod sabit faz.

1.6. Hidrofilik Etkileşim-İyon Değişimi

HILIC-IEX karışık modu, yüksek derecede polar ve iyonize edilebilir bileşiklerin etkin bir şekilde ayrılmasını sağlayarak özellikle biyolojik ve farmasötik analizlerde vazgeçilmez bir yer edinmiştir. Bu modda, hem hidrofilik segment hem de iyon değiştirici gruplar içeren sabit fazlar tasarlanır (Zhu et al., 1996). Proteinler, peptitler, nükleozitler ve fosforile metabolitler gibi moleküller için, bu fazlar klasik RPLC veya saf IEX fazlarına göre daha esnek bir seçicilik profili sunar. HILIC-IEX sabit fazlarında, tipik olarak bir zwitteriyonik veya katyonik grup (örneğin amin veya imidazol grubu) ile nötr polar gruplar (ör. diol, glukaminyum) bir arada bulunur. Qiao ve arkadaşları (47), glukaminyum bazlı iyonik sıvılarla nükleozitlerin HILIC-SAX modunda ayrılması için yenilikçi bir sabit faz geliştirmiştir. Bu yaklaşım, nükleozitlerin iyonik özellikleri ile hidrofilik segment arasındaki dengeyi optimize ederek seçicilik sağlar. Ayrıca, Bo ve arkadaşlarının (48) gösterdiği gibi, monomer karışım oranlarının dikkatli bir şekilde ayarlanması, belirli bir analit grubuna özel seçiciliğin ince ayarına imkân tanır. Bu tür ayarlanabilir HILIC-IEC fazları, örneğin β -agonistlerin kalıntı analizinde veya protein fraksiyonlamasında kullanılarak yöntem geliştiricilere esneklik

sunmaktadır.1990'ların başında yapılan öncül çalışmalarda, Zhu ve ekibi düşük asetonitril yüzdesinde iyon değişim mekanizmasının, yüksek asetonitril yüzdesinde ise HILIC etkisinin baskın hale geldiğini kanıtlamıştır (Zhu et al., 1996). Bu, HILIC–IEX modlarının metot optimizasyonu için hassas solvent kontrolü gerektirdiğini gösterir. Modern sistemlerde bu özellik, otomatik gradyan programları ve akıllı elüsyon stratejileri ile desteklenmektedir.

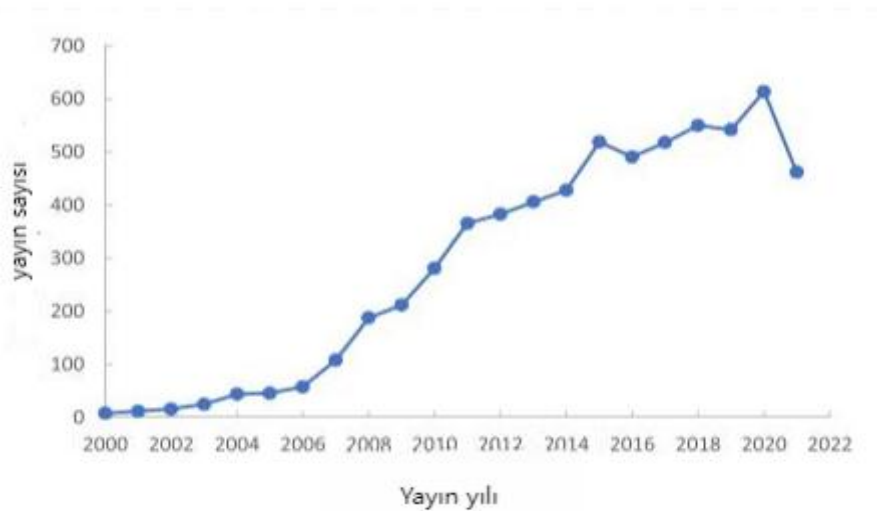
1.7. Üç Modlu MM-HPLC

Günümüzde numune matrislerinin karmaşıklığı arttıkça, yalnızca iki değil üç farklı tutma mekanizmasını tek kolon üzerinde birleştirmek mümkün hale gelmiştir. Üç modlu MM-HPLC fazları, örneğin ters faz LC–HILIC–AEX veya ters faz LC–AEX–CEX kombinasyonları ile çalıştırılabilir (Qiu et al., 2012). Bu kolonlarda farklı işlevsel gruplar örneğin alkil zinciri, aromatik halka, kuaterner amonyum grubu ve hidroksil segment aynı gövdeye entegre edilir.Qiu ve arkadaşlarının (2012) poli(iyonik sıvı) kaplı sabit fazı, aynı anda hidrofobik bileşikleri, nötr polar bileşikleri ve anyonları tutma kapasitesi göstermiştir. Bu geniş etkileşim spektrumu, çok yönlü bir seçicilik sunarak kullanıcıya hareketli faz parametrelerini değiştirerek farklı modları aktive etme imkânı verir. Li ve arkadaşlarının (2014) geliştirdiği dendritik polimer faz ise fenil halkası, kuaterner amonyum ve hidroksil grupları içererek aromatik hidrokarbonlardan asidik bazik türlere kadar geniş bir analit yelpazesinin ayrılmasını sağlamıştır. Bunlara ek olarak, ticari örneklerde de üç modlu fazların uygulamaları yaygınlaşmaktadır. Liu ve ekibi (56), farmasötik karşı iyonların izokratik koşullarda ayrılmasını sağlamak için ters faz LC–AEX–CEX kolonları kullanmıştır. Qiao ve arkadaşları (58), 4-Kloro-6-pirimidinilferrosen modifiye silika jel kullanarak PAH'ların, fenollerin ve anilin türevlerinin ayrılmasında üç modlu bir ayırma stratejisi geliştirmiştir. Shen ve ekibinin (59) glutatyon temelli zwitteriyonik fazı ise, oligosakkaritlerin eş zamanlı HILIC–CEX–AEX ayırmasını mümkün kılmıştır. Bu fazlar, özellikle iyon eşleştirme ajanlarının kullanılmasını gerektirmeden anyonik ve katyonik türlerin elüsyonunu sağlayarak, kütle spektrometrisiyle uyumlu çözümler sunar. Böylece, biyolojik örneklerin MS ile yüksek hassasiyette analiz edilmesi sağlanır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

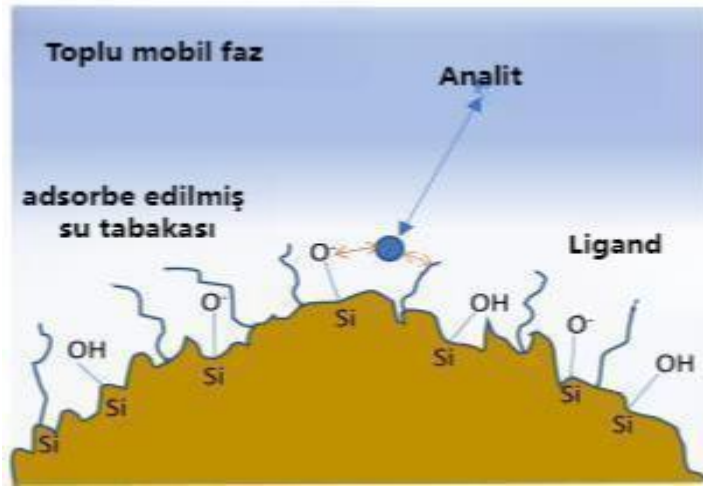
2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış

Biyomedikal ve farmasötik analizlerde küçük polar bileşiklerin (örneğin, polar ilaçlar, metabolitler, nükleozidler ve şekerler) ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) kullanılarak etkili bir şekilde ayrılması, genellikle yetersiz tutma nedeniyle oldukça zordur. Ancak hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) yöntemi bu tür bileşikler için oldukça başarılı bir alternatif sunmuştur. Özellikle son yirmi yılda HILIC, biyomedikal ve farmasötik analizler başta olmak üzere çok çeşitli uygulama alanlarında yaygın bir ilgi görmüştür (Erkmen ve ark., 2021; Goyon ve ark., 2020; Suttapitugsakul ve ark., 2020; Teleki ve Takors, 2019). SciFinder’da yapılan literatür taramaları, HILIC üzerine yayınlanan makale sayısının 2005 ile 2020 yılları arasında belirgin şekilde arttığını, 2015’ten bu yana yıllık 400’den fazla makale sayısına ulaşıldığını ve bu artış trendinin Şekil 1’de gösterildiği gibi güçlü bir ivmeye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. 2021 verileri tam olmamakla birlikte, bu artışın devam ettiğini göstermektedir. Yayınlanan çalışmaların önemli bir bölümü, HILIC’in farklı alanlardaki çok yönlü uygulamalarını ayrıntılı biçimde açıklayarak, bu benzersiz kromatografik modun analitik dünyadaki değerini desteklemektedir.



ŞEKİL 2.1. Hidrofilik etkileşim kromatografisi üzerindeki yayın sayısı 2000'den beri

HILIC'in bu başarısı, kısmen HILIC uygulamaları için özel olarak tasarlanmış ve geliştirilmiş pek çok polar sabit fazın mevcudiyetiyle doğrudan ilişkilidir. HILIC kolonları; en basit haliyle çıplak silika fazlardan başlayarak, karmaşık karışık mod sabit fazlara kadar uzanan geniş bir yelpazeyi kapsar (Guo & Gaiki, 2011; Jandera, 2011; Jandera & Janas, 2017; Qiao ve diğerleri, 2016). Bununla birlikte, HILIC'te tutma sağlayan mekanizmalar yalnızca bu polar sabit fazlarla sınırlı değildir. Alpert'in 1990 yılında yayımladığı öncü çalışmada, polar bileşiklerin bir hidrofobik hareketli faz içinde, sabit faz yüzeyinde immobilize edilmiş su açısından zengin bir sıvı tabaka aracılığıyla hidrofilik bölümlenme mekanizması ile ayrıldığı ileri sürülmüştür (Alpert, 1990). Bu model, Şekil 2'de şematik olarak sunulan hidrofilik etkileşim mekanizmasının temelini oluşturur.



ŞEKİL 2.2. Adsorbe edilmiş su tabakası ve bağlı ligandlar ile HILIC (hidrofilik etkileşim kromatografisi) sabit fazının ve toplu mobil fazın şematik gösterimi. Uzun mavi ok hidrofilik bölümlenmeyi gösterir ve kısa kahverengi ok analit ile ligandlar ve silika yüzey arasındaki doğrudan etkileşimleri yüzey adsorpsiyonu veya elektrostatik etkileşimler yoluyla gösterir.

Sabit faz yüzeyinde bulunan su açısından zengin sıvı tabakanın varlığı, moleküler dinamik simülasyonlar (Melnikov ve ark., 2011; Melnikov ve ark., 2012), nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları (Wikberg ve ark., 2011), kulometrik titrasyon (Dinh ve ark., 2013) ve frontal analiz gibi deneysel tekniklerle de doğrulanmıştır (Soukup ve Jandera, 2014). Bu hidrofilik bölümlenme modeline göre, immobilize edilmiş su tabakası fiilen sabit faz işlevi görmekte, polar ligandlar ise esasen bu adsorbe su tabakası için bir matris desteği sağlamaktadır. Ancak bu, polar ligandların

HILIC'te tamamen pasif olduğu anlamına gelmez. Gerçekte, hem sabit faz ligandları hem de hedef analitler yüklü olduğuunda, yüzey adsorpsiyonu (örneğin, polar-polar etkileşimler ve hidrojen bağları) ya da elektrostatik etkileşimler gibi ek mekanizmalar devreye girerek, ayrımın karmaşıklığını artırmaktadır (Guo, 2015; McCalley, 2017). Dolayısıyla, HILIC'teki alıkonma mekanizmalarının doğası, ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) veya normal fazlı kromatografi (NPLC) mekanizmalarından belirgin biçimde daha karmaşıktır. Bu bağlamda üç ana mekanizma bölümlene, yüzey adsorpsiyonu ve elektrostatik etkileşimler HILIC sistemlerinde küçük polar bileşiklerin alıkonmasını eş zamanlı olarak yönetir ve analitik kontrol açısından kullanıcıya geniş bir optimizasyon alanı sunar. RPLC ve NPLC'de olduğu gibi, sabit faz HILIC ayrımının merkezindedir; ancak HILIC sabit fazları yalnızca farklı ligand türleriyle değil, aynı zamanda yüzeyde adsorbe olmuş su tabakasıyla da karmaşılaşır. Bu su tabakası ile ligand arasındaki etkileşim, HILIC kolonlarının sınıflandırılmasını, performanslarının doğru değerlendirilmesini ve uygulama alanlarının belirlenmesini önemli ölçüde zorlaştırır. Geçtiğimiz on yılda yayımlanan kapsamlı inceleme makaleleri, HILIC kolonlarının sınıflandırılmasına, mekanizmalara ve polar sabit fazların özelliklerine dair derinlemesine tartışmalar sunarak alandaki bilgi birikimini zenginleştirmiştir (Guo & Gaiki, 2011; Jandera, 2011; Jandera & Janas, 2017; Qiao ve ark., 2016). Daha fazla HILIC kolonu ticarileştirilmiş, yeni nesil polar sabit fazlar üzerine yapılan araştırmalar ise 2017 sonrası dönemde belirgin bir ivme kazanmıştır. Bu nedenle, hem piyasadaki mevcut polar sabit fazlar hem de son beş yılda literatüre kazandırılan yenilikçi fazlar hakkında derinlemesine bir değerlendirme yapılması, HILIC sistemlerinin mekanik yönlerini anlamaya katkıda bulunacak yeni bir çerçeve sunmak açısından önemli bir ihtiyaç haline gelmiştir. Şekil 2'de şematik olarak gösterilen etkileşim modeli. Su açısından zengin sıvı tabakasının varlığı moleküler dinamik simülasyon (Melnikov ve ark., 2012; Melnikov ve ark., 2011) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) (Wikberg ve ark., 2011), kulometrik titrasyon (Dinh ve ark., 2013) ve frontal analiz (Soukup ve Jandera, 2014) gibi deneysel yöntemlerle doğrulanmıştır. Hidrofilik bölme modelinde, hareketsizleştirilmiş su tabakası fiili sabit fazdır ve polar ligandlar sadece adsorbe edilmiş su tabakası için matris desteği sağlar. Ancak polar ligandlar HILIC'te pasif değildir. Polar bileşikler, hem ligandlar hem de analitler yüklüyse yüzey adsorpsiyonu (örneğin, polar-polar etkileşimler, hidrojen bağı) veya elektrostatik etkileşimler yoluyla polar fonksiyonel gruplarla doğrudan etkileşime girebilir (Guo, 2015; McCalley, 2017). Bu nedenle, HILIC'teki tutma mekanizmaları, ters fazlı sıvı kromatografisindeki

(RPLC) veya normal fazlı sıvı kromatografisindeki (NPLC) mekanizmalardan çok daha karmaşıktır. Üç mekanizma da (bölümleme, adsorpsiyon ve elektrostatik etkileşimler) HILIC'teki küçük polar bileşiklerin alıkonmasını yönetmede rol oynar. RPLC ve NPLC'ye benzer şekilde, durağan faz HILIC ayrımının merkezindedir. Ancak, HILIC'teki durağan fazlar yalnızca çok çeşitli ligandlar tarafından değil, aynı zamanda paketleme malzemelerinin yüzeyindeki adsorbe edilmiş su tabakası tarafından da karmaşıktır. Ligandlar ile adsorbe edilmiş su tabakası arasındaki bağlantı, HILIC kolonlarının sınıflandırılmasını, değerlendirilmesini ve seçilmesini oldukça zorlaştırır. Geçtiğimiz on yıldaki birkaç mükemmel inceleme makalesi hem HILIC kolonlarına genel bir bakış hem de polar durağan fazlar hakkında derinlemesine tartışmalar sunmaktadır (Guo & Gaiki, 2011; Jandera, 2011; Jandera & Janas, 2017; Qiao vd., 2016). Daha fazla HILIC kolonu ticari olarak mevcut hale geldi ve polar durağan fazlar hakkındaki araştırmalar, son incelemenin 2017'de yayınlanmasından bu yana önemli ilerleme kaydetti. Bu nedenle, HILIC için durağan fazlar hakkında başka bir inceleme yapılması uygundur. Bu inceleme, yalnızca piyasada bulunan polar durağan fazlar ve son 5 yılda araştırma makalelerinde yayınlanan yeni durağan fazlar hakkında kapsamlı bir genel bakış sağlamakla kalmaz, aynı zamanda polar durağan fazlar hakkındaki mevcut anlayışı mekanik bir bakış açısıyla ele alır.

2.2.HILIC İçin Polar Sabit Fazlar

Alpert, nükleik asitlerin, peptitlerin ve diğer polar bileşiklerin hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) yöntemiyle ayrılmasına yönelik erken dönem çalışmalarında polihidroksietil A ve polisülfoetil A kolonlarını geliştirerek kullanmıştır (Alpert, 1990). Bu öncü çalışmalar, HILIC'in temellerinin atılmasına ve polar bileşiklerin ayrımında yeni bir yaklaşımın ortaya çıkmasına önemli katkı sağlamıştır. HILIC'in ilk dönemlerinde, özellikle bu teknik için özel olarak formüle edilmiş sabit fazların sayısı oldukça sınırlıydı. Bu nedenle, araştırmacılar başlangıçta normal fazlı sıvı kromatografisi (NPLC) için tasarlanmış mevcut kolonları, uygun şekilde adapte ederek HILIC analizlerine uygulamışlardır. Başlangıçta NPLC amaçlı geliştirilmiş silika ve amino bazlı kolonlar, su-organik çözücü karışımlarıyla yıkanarak yeniden koşullandırılmış ve böylece HILIC ayırmaları için kullanıma uygun hale getirilmiştir (Olsen, 2001; Oyler et al., 1996; Weng, 2003). Bu dönemde TSKgel Amide 80 kolonu, NPLC'den HILIC'e uyarlanan en bilinen örneklerden biri olarak literatürde yerini

almıştır (Guo & Gaiki, 2005; Yashita, 2004). Bu tür kolonlar, polar bileşiklerin zorlu ayırmalarında araştırmacılara alternatif bir çözüm sunmuştur. Zamanla HILIC'in potansiyeli daha iyi anlaşıldıkça, bu teknik için özel olarak tasarlanmış ticari kolonlar da geliştirilmeye başlanmıştır. Atlantis HILIC (silika bazlı) ve ZIC-HILIC (sülfobetain işlevli faz) kolonları, HILIC amaçlı üretilen ilk ticari sabit fazlar arasında yer almış ve yaygın kullanıma sunulmuştur. Bu gelişmeler, HILIC uygulamalarının farmasötik, biyomedikal ve çevresel analizler gibi geniş bir yelpazeye yayılmasına zemin hazırlamıştır. Günümüzde, birçok farklı üretici firma tarafından sağlanan çok sayıda HILIC kolonu, farklı polarite profilleri ve yüzey işlevsellikleri ile kullanıcıların çeşitli ayırma ihtiyaçlarına yanıt vermektedir. Ayrıca son yıllarda, yüzey modifikasyonu, gömülü polar gruplar, iyonik karakter ve zwitteriyonik yapılar gibi yenilikçi tasarımlar sayesinde HILIC sabit fazlarının seçiciliği ve ayırma performansı daha da artırılmıştır. Araştırmacılar, karmaşık biyolojik matrislerden polar metabolitlerin, nükleozitlerin, amino asitlerin ve çeşitli peptitlerin etkin bir şekilde ayrılması için HILIC kolonlarını tercih etmeye devam etmektedir. Bu bağlamda, HILIC sabit fazlarının geliştirilmesi üzerine yapılan araştırmalar, yeni nesil kolonların ticari pazara kazandırılması açısından halen canlılığını korumaktadır.

2.3. HILIC İçin Ticari Sabit Fazlar

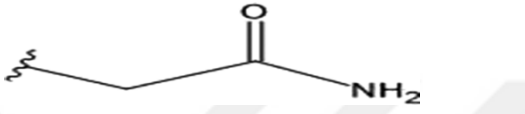
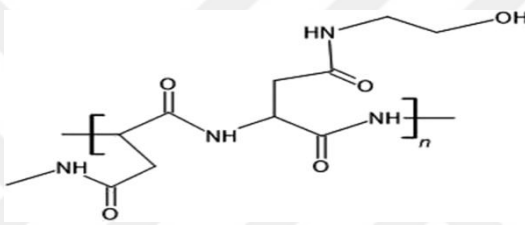
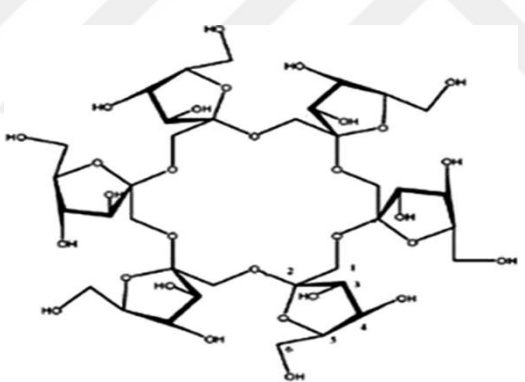
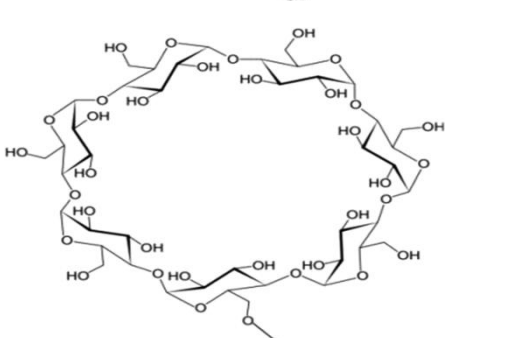
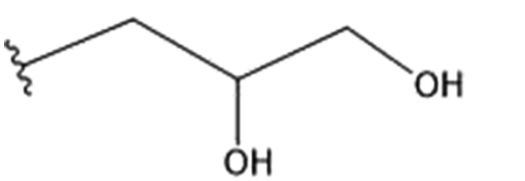
Atlantis HILIC ve ZIC-HILIC kolonlarının 2000'li yılların başında piyasaya sürülmesiyle birlikte, HILIC yöntemi için daha fazla sayıda polar sabit faz geliştirilmiş ve ticarileştirilmiştir. 24 farklı kolon üreticisine ait ürün portföylerine ilişkin gerçekleştirilen bir araştırma, tüm üreticilerin HILIC uygulamaları için en az bir sıvı kromatografi (LC) kolon serisini piyasaya sunduğunu ve tanıttığını göstermektedir. Bu durum, HILIC'in günümüzde ne kadar geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu ve sabit faz çeşitliliğinin giderek arttığını ortaya koymaktadır. Literatürde sunulan Tablo 2.1, HILIC için ticari olarak mevcut polar sabit faz türlerini ve bunların genel sınıflandırmalarını özetlemektedir. Sabit fazlar, üzerlerinde bulunan ligandların yük durumlarına göre temel olarak üç gruba ayrılmaktadır: anyonik, katyonik ve nötr. Bu sınıflandırma, fazların yüzey kimyası ile analitler arasındaki etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Özellikle nötr sabit fazlar, ligand türleri açısından en fazla çeşitliliğe sahip gruba oluşturmaktadır. Bu fazların önemli bir bölümü hidroksil grupları (diol, pentadiol, siklofuktan, siklodekstrin (CD) ve genel

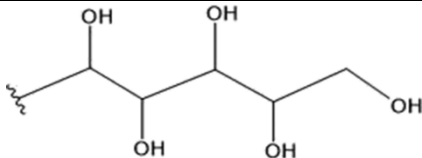
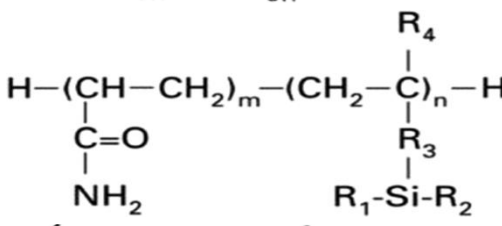
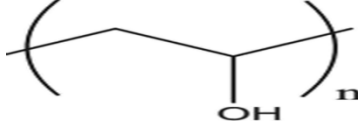
polihidroksil fazları) veya amid temelli gruplar (amid, aspartamid, poliakrilamid, üre fazları) içermektedir. Diol fazları, kolon üreticileri tarafından yaygın olarak sunulmaktadır; çünkü bu fazlar, başlangıçta NPLC için geliştirilmiş mevcut ürün hatlarının kolayca HILIC'e uyarlanmasına imkân tanımaktadır. Diol fazları, orta düzeyde adsorbe edilmiş bir su tabakasına sahiptir ve bu özellik, polar bileşiklerin alıkonmasını sağlamada etkili olmaktadır (Guo, Bhalodia & Fattal, 2019). Beş hidroksil grubuna sahip olan pentadiol fazı, diol fazına kıyasla daha yüksek polarite potansiyeline sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Ancak yakın dönemli bir araştırmada, pentadiol fazının adsorbe ettiği su miktarının diol fazına kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla olmadığı belirtilmiştir (Jandera & Hajek, 2021). Öte yandan, pentadiol fazının IgG glikopeptitleri için amid ve sülfobetain fazlarına kıyasla daha düşük alıkonma kapasitesine sahip olduğu, fakat ayırma etkinliği açısından en iyi sonucu sağladığı da bildirilmiştir (Molnarova & Kozlik, 2020). Siklodekstrin (CD) ve siklofruktan fazları ise çoklu hidroksil gruplarına sahip siklik oligosakkarit yapılarından türetilmektedir (Qiu et al., 2011; Wang et al., 2008). Bu fazlar, özellikle seçici etkileşimler sunarak belirli hedef analitlerin ayırmasını iyileştirmektedir. Örneğin, siklofruktan fazının nükleobazlar için diol fazından daha güçlü bir alıkonma sağladığı belirlenmiştir (Qiu et al., 2011). Ayrıca, çapraz bağlı diol fazları da polihidroksil fazlar arasında yer almakta olup, LUNA HILIC kolonu buna bir örnektir. Bu fazda, muhtemelen polimer yüzeyindeki aktif hidroksil grubu sayısının azalması nedeniyle alıkonmanın daha düşük olduğu görülmüştür. Buna karşın, YMC PVA-Sil ve Epic HILIC-HC gibi diğer polihidroksil fazları, daha yüksek hidroksil içeriği sayesinde polar bileşiklere karşı güçlü alıkonma özellikleri göstermektedir (Guo, Bhalodia & Fattal, 2019). Amid grubu, diol fazlarına kıyasla uygulama alanı daha geniş olan kimyasal olarak bağlanmış amid fazlarında ve poliakrilamid bazlı kolonlarda yer almaktadır. Örneğin, TSKgel Amide 80 kolonu bu kategoride öne çıkmaktadır. Ikegami ve arkadaşlarının (2021) çalışmasında, XBridge Amid, Sunshell Amid ve deneysel bir amid fazı arasında belirli seçicilik farklarının olduğu raporlanmıştır. Kimyasal olarak bağlanmış üre fazı ise adsorbe edilen su tabakası ve polar bileşikler için retansiyon düzeyi bakımından diol ve amid fazlarına benzer özellikler taşımaktadır. Bicker ve çalışma arkadaşları (2011), farklı bağlanma yoğunluklarına sahip üre fazlarını karşılaştırmış ve daha yüksek bağlanma yoğunluğunun, yüzeydeki silanol gruplarının daha etkin bir şekilde maskelenmesini sağlayarak artan alıkonmaya katkı sağladığını göstermiştir. Ayrıca, 1,2,4-triazol gibi bileşiklerin HILIC sabit fazlarında kullanımı da dikkate değerdir. Her ne kadar triazolün

silika yüzeyine tam olarak nasıl bağlandığı net olmasa da, 1,2,4-triazolün HILIC ayırmada kullanılan tipik pH aralığında (asidik pKa 10,3, bazik pKb 11,8) nötr formda kalma eğiliminin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle triazol içeren fazlar, genellikle nötr ligand sınıfına dahil edilmektedir. Örneğin, ACE HILIC-N kolonu, üreticisi tarafından nötr bir fonksiyonel grup içerdiği belirtilerek pazarlanmaktadır; ancak fazın tam kimyasal yapısı üretici tarafından açıklanmamıştır. Bu incelemede yüklü sabit fazlar anyonik ve katyonik gruplara ayrılmıştır. Anyonik grup aspartik asit, karboksilik asit, silanol, sülföetil ve tetrazol fazlarını içerir. Aspartik asit ve karboksilik asit fazları zayıf katyon değiştiricilerdir ve sülföetil fazı sülfonat gruplarıyla güçlü bir katyon değiştiricidir (Alpert, 1990). Çıplak silika fazı anyonik gruba dahildir çünkü silanol grupları mobil faz pH'ı 5'in üzerinde olduğunda negatif yüklüdür (Mendez ve ark., 2003). Tablo 2.1'de belirtildiği gibi, HILIC uygulamaları için birçok çıplak silika fazı sağlanmıştır ve bu da onu ticari olarak mevcut kolon sayısı açısından en popüler hale getirir. Bununla birlikte, çıplak silika fazı muhtemelen silika yüzeyindeki daha ince bir adsorbe edilmiş su tabakası nedeniyle daha az tutucu olma eğilimindedir. Olsen, farklı silika kolonlarda (YMC Sil, Zorbax Sil ve Nucleosil Silica) bazı polar bileşiklerin alıkonmasını karşılaştırdı ve alıkonmada küçük farklılıklar buldu (Olsen, 2001). Olsen'in çalışmasında kullanılan silika kolonların NPLC uygulamaları için paketlenildiği belirtilmelidir. Özellikle HILIC için paketlenen silika kolonların alıkonma özelliklerini karşılaştırmak için hiçbir veri mevcut değildir. Tetrazol fazında, tetrazol grupları, silika parçacıklarına kovalent olarak bağlı olan poliakrilamide bağlanır (Dousa, 2018; Fu ve diğerleri, 2020). Tetrazol fazı, mobil faz pH'ı 5'in üzerinde olduğunda negatif yükler taşıyabilir (pKa 4,9); bu nedenle anyonik gruba dahildir. ACE HILIC-A kolonunun asidik özelliklere sahip olduğu iddia edilmektedir, ancak tam fonksiyonel grup bilinmemektedir. Katyonik fazlar, pH aralığında pozitif yükler taşıyabilen fonksiyonel grupları (aminler, imidazol ve piridin) içerir tipik olarak HILIC ayırma için kullanılır. Aminopropil faz muhtemelen tüm sabit fazlar arasında en çok yönlü olanıdır ve RPLC, NPLC, iyon kromatografisi ve HILIC'te kullanılmıştır (Gaki ve diğerleri, 2020). Çoğu aminopropil fazı silika yüzeyine bağlanmıştır, ancak birkaçı polimer bazlıdır (örn. Asahipak NH2 ve HILICpak VG-50). Amino fazlardan biri (Chromenta EP-NH2) hibrit silika-polimer matris desteği üzerinde hazırlanır. Olsen, HILIC ayırmalarında üç amino faz arasında tutmada küçük farklılıklar gösterdi (Olsen, 2001). HILIC uygulamaları için paketlenmiş çeşitli amino kolonlarının tutma özelliklerini karşılaştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Son zamanlarda, sabit fazın polaritesini artırmak için hem

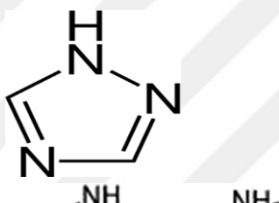
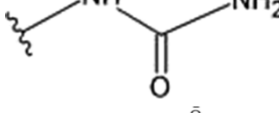
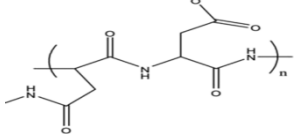
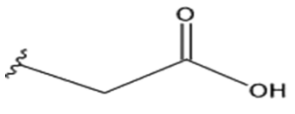
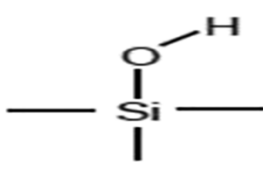
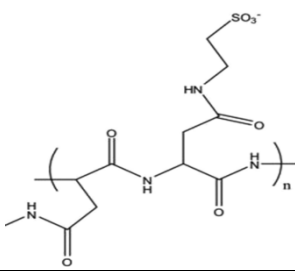
amid hem de amino grupları içeren karışık bir sabit faz (LUNA Omega Şeker) geliştirilmiştir. Aminopropil grubuna ek olarak, üçüncül ve dördüncül amin grupları sabit faza HILIC VG-50 ve VT-50 kolonlarında dahil edilmiştir. Bu fazlar, aminopropil faza kıyasla farklı tutma ve seçicilik gösterir (Iturrospe ve diğerleri, 2021). Birincil, ikincil ve üçüncül aminler içeren polietilenimin (PEI) polimeri silika parçacıkları üzerine kaplanmıştır.

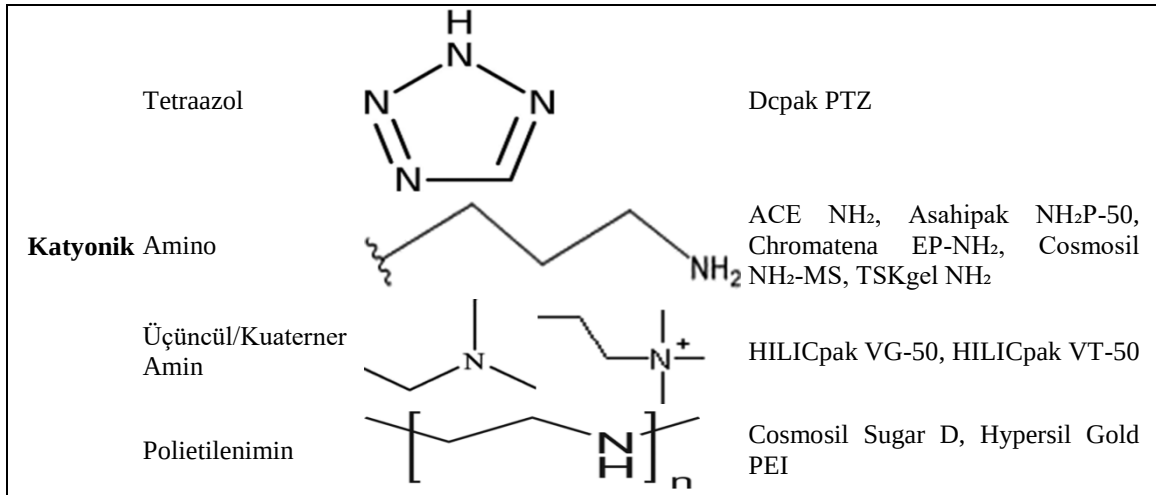
Tablo 2.1. Ticari olarak temin edilebilen sabit fazlar

Faz Türü	Faz Adı	Fonksiyonel Grup	Örnek Kolon
Nötr	Amid		Accucore Amid, Sunshell HILIC Amid, XBridge BEH Amid, Unisol Amid
	Aspartamid		Hidroksi etil A
	Siklofruktan		HILIC-OH5
	Siklodekstrin		Ultron AF-HILIC-CD
	Diol		Fortis HILIC Diol, Inertsil HILIC, Kromasil Diol, Nucleosil 100-5 OH, Polar Diol, Shodex VN-50, Supelcosil LC-Diol, YMC Triart Diol HILIC, Lichrospher 100 Diol

Pentadiol		Ascentis Express OH5, Halo Penta-HILIC
Poliakrilamid		TSKgel Amide-80
Polihidroksil		LUNA-HILIC, PVA-Sil, Epic HILIC-HC

Tablo 2.1.'in devamı

Faz Türü	Faz Adı	Fonksiyonel Grup	Örnek Kolon
	Triazol		Cosmosil HILIC
	Üre		Accucore Urea, SiliChrom HILIC
Anyonik	Aspartik Asit		Poly CAT A
	Karboksilik Asit		Shodex VC-50
	Silanol		Ascentis Express HILIC, Atlantis HILIC, Cortecs HILIC, Halo HILIC, Polaris Si-A, Porshell HILIC, Raptor HILIC-Si, Speedcore HILIC, XBridge BEH HILIC, Zorbax HILIC
	Sülfobetain		Polysulfoethyl A



İmidazol ve piridin grupları, HILIC ayırımlarında sabit faz olarak kullanılmak üzere silika yüzeyine bağlanmıştır (Chung ve diğerleri, 2018). İmidazol (pKa 6.9) ve piridin (pKa 5.2) grupları, sırasıyla pH 7 ve pH 5'in altında pozitif yük taşırlar. Bu nedenle, ACE HILIC-B ve Raptor Polar X gibi kolonların bazik veya anyon değişim özelliklerine sahip olduğu öne sürülmektedir; ancak, bu kolonlarda kullanılan tam fonksiyonel gruplar üreticiler tarafından detaylı şekilde açıklanmamıştır. HILIC'e özgü olan ve hem pozitif hem de negatif yükler taşıyan zwitteriyonik fazlar, 2000'li yılların başında tanıtılmış ve o zamandan beri pek çok uygulamada yer bulmuştur (Jiang & Irgum, 1999; Jonsson & Appelblad, 2004). Zwitteriyonik fazların hazırlanmasında ilk olarak sülfobetain ve fosfokolin kullanılmıştır. Sülfobetain fazında pozitif ve negatif yükler birbirini nötrlemesine rağmen, sabit faz üzerinde kalıntı negatif yükler kalabilmektedir (Takegawa ve diğerleri, 2006). Sülfobetain ve fosfokolin fazlarının yanı sıra, yakın dönemde yeni zwitteriyonik fazlar geliştirilmiş ve HILIC ayırımlarında uygulanmaya başlanmıştır (Iturrospe ve diğerleri, 2021; Racz ve diğerleri, 2019). Tablo 2.1'de de gösterildiği üzere, pozitif yüklü grup genellikle fazın distal ucunda yer alan kuaterner amin grubudur; negatif yüklü gruplar ise ya fosfat [örneğin iHILIC-Fusion (P) kolonu] ya da karışık fosfat ve sülfonat [örneğin iHILIC-Fusion kolonu] gruplarıdır. Ayrıca, iHILIC-Fusion(+) kolonu, ligand yapısına eklenen ilave kuaterner amin grupları sayesinde net pozitif yük taşımaktadır. Sülfobetain ve fosfokolin temelli zwitteriyonik fazlarda olduğu gibi, bu yeni nesil zwitteriyonik fazlar da kalın bir adsorbe su tabakasına sahiptir ve polar bileşikler için güçlü tutma özelliği gösterir (Guo, Bhalodia, Fattal & Serris, 2019). Sabit faz kimyasındaki bu çeşitliliğe ek olarak, günümüzde birçok HILIC kolonu, alt-2 mikron boyutundaki silika parçacıkları (örneğin Cortecs HILIC, Accucore Amid, Fortis HILIC, Triart Diol-HILIC) veya yüzeysel

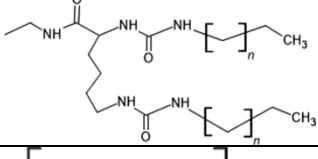
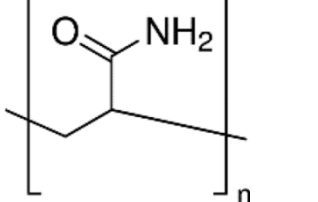
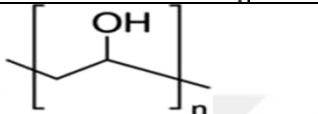
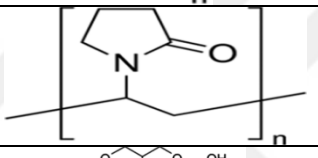
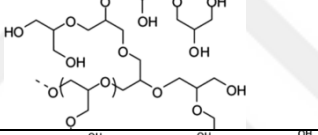
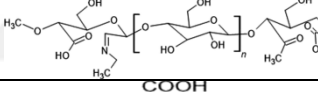
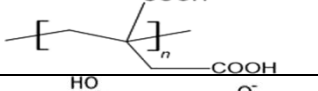
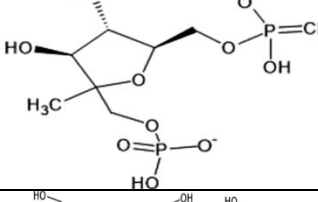
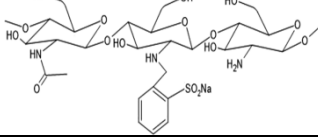
gözenekli silika destekleri (örneğin Poroshell 1200 HILIC, Ascentis Express OH5, Speedcore HILIC) üzerine hazırlanarak üretilmektedir. Bu alt-2 mikron ve yüzeysel gözenekli silika desteklerinin, daha yüksek ayırma verimliliği sağladığı kanıtlanmıştır (Heaton ve diğerleri, 2012; Heaton ve diğerleri, 2014). Ancak, yüzeysel gözenekli silika parçacıklarının, görece daha ince bir adsorbe su tabakasına ve muhtemelen daha düşük yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle, tutuculuklarının bir miktar azaldığı bildirilmiştir (Dolzan ve diğerleri, 2014; Guo, Bhalodia, Fattal & Serris, 2019).

2.4. HILIC İçin Ticari Olmayan Sabit Fazlar

Akademik araştırmalar, birçok HILIC'e özgü sabit fazın geliştirilmesini ve kullanılabilirliğinin artmasını sağlamıştır. Örneğin, günümüzde yaygın olarak kullanılan ZIC-HILIC kolonu, Irgum'un laboratuvarında yürütülen çalışmaların bir sonucu olarak geliştirilmiştir (Jiang et al., 2006; Jiang & Irgum, 1999). Son yıllarda, yeni polar sabit fazların tasarımı ve geliştirilmesine yönelik araştırmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu kapsamda, çok sayıda yeni sabit faz türü literatürde raporlanmış olmasına rağmen, bir kısmı henüz ticari olarak piyasaya sunulmamıştır. Literatürde yer alan bu ticari olmayan sabit fazların detaylı bir özeti Tablo 2.2'de sunulmaktadır. Bu derleme, öncelikli olarak 2016 yılından sonra yayımlanan çalışmalara odaklanmakla birlikte, alanın bütüncül bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla 2016 öncesi döneme ait bazı sabit faz örneklerine de yer verilmiştir. Tablo 2.2'de yer alan ticari olmayan sabit fazlar, Tablo 2.1'de sunulan ticari fazlarla aynı sınıflandırma sistemi kullanılarak gruplandırılmıştır. Bu sınıflandırmada, nötr gruplar çoğunlukla polimer bazlı sabit fazları kapsamaktadır. Örneğin, poliakrilamid, ticari TSKgel Amid 80 kolonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, poliakrilamid bazlı sabit fazların hazırlanmasında kimyasal bağlama (Cai et al., 2017; Zhang et al., 2013) ve fiziksel kaplama (Si et al., 2020; Wang, Guo et al., 2019) gibi farklı tekniklere ilişkin çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. Buna ek olarak, poliakrilamid, hidrolize edilmiş poli(glisidil metakrilat-divinilbenzen) (GMA-DVB) mikrokürelerine de aşılansak yeni sabit fazlar elde edilmiştir (Li et al., 2021). Bu yöntemle hazırlanan sabit fazların hidrolitik olarak yüksek stabiliteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu polimer bazlı sabit faz, yüzeyinde hem amid hem de hidroksil grupları taşımakta olup bu özellik, fazın hem polaritesini hem de kimyasal kararlılığını artırmaktadır. Çapraz bağlı polivinilalkol (PVA) ise benziltiyoetil grupları ile işlevselleştirilmiş silika üzerine PVA polimerlerinin

eklenmesiyle sentezlenmiş ve düşük kanama eğilimine sahip olduğu gösterilmiştir (Qian, Peng et al., 2018; Qian, Yang et al., 2018). Ayrıca, polivinilpirolidon (PVP) silika parçacıkları üzerinde immobilize edilerek hem ters fazlı (RPLC) hem de hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC) modlarında sabit faz olarak kullanılmıştır (Zhao et al., 2020). Aşırı dallanmış bir poligliserol fazı ise silika parçacıkları üzerinde yüzeyden başlatılan polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir (Geng et al., 2020). Bu yöntemle elde edilen çoklu poligliserol katmanları, monomer miktarının kontrolü ile sentezlenebilir ve model bileşiklerin alıkonmasını artırarak ayırma verimliliğini iyileştirebilir. Bunun yanında, Mallik ve çalışma arkadaşları, çeşitli uzunluklarda (6 veya 12 karbon) birleşik alkil zincirleri ve çift alkillenmiş L-lizin kullanarak çoklu üre grupları içeren bir faz geliştirmiştir (Mallik et al., 2019). Çalışmalar, HILIC modunda polar bileşiklerin alıkonmasının, sabit fazın polaritesindeki değişim nedeniyle alkil zincir uzunluğu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu faz yalnızca HILIC modunda değerlendirilmiş olmasına rağmen, teorik olarak RPLC modunda da tutma özelliği gösterebileceği düşünülmektedir. Anyonik sabit fazlar ise genellikle karboksilat, fosfat veya sülfonat grupları içermektedir (Tablo 2.2). Örneğin, dikarboksi selüloz fazı, önce selülozun amino-fonksiyonel silikaya bağlanan dialdehit selüloza oksitlenmesiyle hazırlanmakta, ardından aldehit grupları karboksilik asitlere dönüştürülmektedir (Gao, Luo et al., 2020). Benzer şekilde, poli(itakonik asit), dikarboksilik asit gruplarını içeren bir sabit faz elde etmek amacıyla tiyol-fonksiyonel silikaya aşılansmıştır (Hu et al., 2019). Bir diğer örnek olarak, fruktoz difosfat fazı, fruktoz 1,6-difosfatın ZrO_2 kaplı silika mikrokürelerin Lewis asidi bölgelerine kemisorpsiyonu yoluyla hazırlanmıştır (Song et al., 2017). Elde edilen bu sabit fazın bazik koşullar altında yüksek hidrolitik kararlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, iki aşamalı bir işlemle sülfonatlanmış bir kitooligosakkarit fazı da geliştirilmiştir. Bu yöntemde kitooligosakkarit, öncelikle 4-formilbenzen sülfonat sodyum ile reaksiyona sokularak sülfonatlandıktan sonra modifiye edilmiş kitooligosakkarit, silika yüzeyine kimyasal olarak bağlanmıştır (Yan et al., 2018).

Tablo 2.2. Ticari olmayan sabit fazlar

Faz Türü	Faz Adı	Fonksiyonel Grup (Şekil)	Kaynak
Nötr	Alkilüre		Mallik et al. (2018)
Nötr	Poliakrilamid		Zhang et al. (2013), Cai et al. (2017), Wang, Guo et al. (2019), Si et al. (2020), Li et al. (2021)
Nötr	Polivinilalkol		Qian, Peng et al. (2018); Qian, Yang et al. (2018)
Nötr	Polivinilpirolidon		Zhao et al. (2020)
Nötr	Poligliserol		Geng et al. (2020)
Anyonik	Dikarboksilik selüloz		Gao, Luo et al. (2020)
Anyonik	Poli(itakonik asit)		Hu et al. (2019)
Anyonik	D-Fruktoz difosfat		Song et al. (2017)
Anyonik	Sülfone edilmiş kitoooligosakkarit		Yan et al. (2018)

Bu derleme döneminde literatürde yalnızca iki katyonik sabit faz tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, maltoz bazlı bir sabit fazdır. Daha önceki çalışmalarda, tıklama kimyası yoluyla maltoz, modifiye edilmiş silika yüzeyine bağlanarak sabit faz elde edilmiştir (Fu et al., 2010). Yakın dönemde ise maltoz, yine tıklama kimyası kullanılarak PVA yüzeyine bağlanmış ve sonrasında silika desteği üzerine kaplanmıştır (Chu et al., 2018). Maltozun kendisi nötr olmasına rağmen, tıklama kimyası sonucu oluşan ligandın triazol bölgesi bazik özellik göstermektedir. Bu nedenle bu faz,

katyonik sabit faz sınıfına dahil edilmektedir. Diğer katyonik faz ise kuaterner amin grupları içeren bir PVA–katyonik selüloz kopolimerine dayanmaktadır (Peng et al., 2017). Yapılan seçicilik değerlendirmeleri, PVA–katyonik selüloz fazının hidrofilikliğinin amid fazına benzer olduğunu, ancak amino fazına kıyasla daha düşük anyon değişim kapasitesine sahip bulunduğunu ortaya koymaktadır. Amino asitler ve küçük peptitler, doğal olarak zwitteriyonik özellik gösterdiklerinden, HILIC uygulamalarında zwitteriyonik sabit fazlar için ligand olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, sistein, lizin, arginin ve tirozin fazları, ‘tiol-en’ tıklama kimyası kullanılarak hazırlanmıştır (Farhadpour et al., 2020; Guo et al., 2012; Shen et al., 2012; Wu et al., 2015). Bu fazlara ilişkin detaylı bilgiler, Qiao, Shi ve Xu (2016) tarafından sunulan 2016 tarihli kapsamlı derlemede bulunabilir. 2016’dan bu yana, sistein fazının çeşitli yeni varyantları literatürde raporlanmıştır. Örneğin, Fan ve çalışma arkadaşları, sisteini poli(izopropil akrilamid) kaplamasının sentezine entegre etmiş ve elde edilen fazda amid grubunun faz polaritesini artırıcı rol oynadığını göstermiştir (Fan et al., 2020). Benzer şekilde, Li ve diğerleri, GMA–DVB mikrokürelerinin yüzeyine sisteini bağlayarak polimer bazlı bir sistein fazı hazırlamışlardır. Bu fazın yüzeyi, glisidil birimlerinin hidrolizi sonucu diol grupları içermektedir (Li, Li, Zhang, Geng & Yang, 2020). Prolin de sabit faz ligandı olarak kullanılmış; kaliks[4]aren yapılarına bağlanarak bir prolin fazı oluşturulmuş ve bu yapı daha sonra modifiye edilmiş kaliks[4]arenin silika yüzeyine kimyasal bağlanmasıyla sabit faz haline getirilmiştir (Zhang et al., 2019). Amino asitlerin yanı sıra, dipeptitler ve tripeptitler de HILIC sabit fazları için ligand olarak tercih edilmektedir. Örneğin, glutatyon, tıklama kimyası kullanılarak silika yüzeyine immobilize edilmiştir (Shen et al., 2013). Skoczylas, Bocian ve Buszewski (2016) ise iki aşamalı bir sentezle, korunan amino asitlerin modifiye edilmiş silika yüzeyine bağlanması yoluyla bir glisilalanin dipeptit fazı geliştirmiştir. Buszewski ve çalışma arkadaşları, amino asitler ile di- ve tripeptit içeren farklı sabit fazları sentezleyerek bunların seçicilik farklılıklarını detaylı şekilde değerlendirmişlerdir (Buszewski & Skoczylas, 2019). Diğer zwitteriyonik faz türleri arasında sülfonat–piridinyum, karboksilat–üçüncül amin ve sülfonat–üçüncül amin fazları yer almaktadır. Örneğin, sülfonat–piridinyum fazı, silika yüzeyinde 4-vinilpiridinin telogen olarak 3-merkaptopropil trimetoksi-silan ile polimerleştirilmesiyle hazırlanmış, daha sonra polimer yüzeyindeki piridin grupları 2-bromoetan sülfonat kullanılarak kuaterner hale getirilmiştir (Takafuji, Shahrzaman, Sarahara & Ihara, 2018). Böylece, etilen bağı ile birbirine bağlanmış hem sülfonat hem de piridinyum

gruplarını içeren bir polimer fazı elde edilmiştir. Bu polimer fazın, düşük pH'lı hareketli faz koşullarında faza kalıcı pozitif yükler sağlayabilecek reaksiyona girmemiş piridin grupları içermesi olasıdır. Başka bir zwitteriyonik sabit faz türü, pozitif yüklü (üçüncül amin) ve negatif yüklü (sülfonat veya karboksilat) gruplar içeren iki farklı monomerin kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Sülfonat-üçüncül amin fazı, 4-stirensülfonat sodyum ve dimetilaminoetil metakrilat monomerlerinin yüzey başlatmalı atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile kopolimerize edilmesiyle sentezlenmiştir (Bo et al., 2017). Karboksilat-üçüncül amin fazı ise akrilik asit ile dimetilaminoetil metakrilatın kopolimerizasyonu yoluyla elde edilmiştir (Hu et al., 2020). Pozitif ve negatif yüklü grupların farklı monomerlerden kaynaklanması nedeniyle, başlangıç monomerlerinin oranı değiştirilerek fazdaki net yük dengesi ayarlanabilmekte ve her iki yükten de fazlalık oluşturulabilmektedir. Ancak pozitif ve negatif yüklerin eşitlenmesi durumunda bile, bu grupların yüklü analitlerle elektrostatik etkileşime girip girmediği tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bunun nedeni, sülfobetain veya fosfokolin fazlarında olduğu gibi yüklerin yakın yerleşimli olmaması ve daha ayrık bir yapıda bulunmasıdır.

2.5.Karma Modlu Sabit Faz

Karma mod ayırma, hedef çözünürlüğün elde edilmesi amacıyla, örneğin ters fazlı sıvı kromatografide (RPLC) bölümleme veya iyon değişim kromatografisinde (IEX) elektrostatik etkileşimler gibi birden fazla tutma mekanizmasının bir arada kullanılmasını içerir. Karma mod ayırmada kullanılan sabit fazlar, hidrofobik, polar veya yüklü gruplar gibi farklı etkileşimler sunabilen birden çok ligand içermektedir. Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografide (HILIC) gerçekleştirilen ayırmalar da, bölümleme, adsorpsiyon ve elektrostatik etkileşimleri kapsayan karmaşık tutma mekanizmaları nedeniyle doğası gereği karma modlu kabul edilmektedir (Guo, 2015; McCalley, 2017). Karma mod kavramının iki farklı bağlamda kullanıldığını vurgulamak önemlidir. İlk olarak, karma mod ayırma, belirli bir kromatografik modu destekleyen hareketli faz koşulları altında gerçekleştirilirken, diğer alıkonma mekanizmaları da devreye girebilir. Örneğin, elektrostatik etkileşimler, analitlerin yük durumuna bağlı olarak RPLC/IEX veya HILIC/IEX karışık mod sabit fazlarında, hem HILIC hem de RPLC ayırımlarına katkı sağlayabilir. İkinci olarak, karışık mod sabit faz, farklı mobil faz koşulları altında yalnızca tek bir tutma mekanizmasına uygun şekilde kullanılabilir. Örneğin, bir RPLC/HILIC karışık mod sabit faz, düşük asetonitril içeren bir hareketli

faz ile kullanıldığında hidrofobik analitlerin ayırımı için RPLC modunda çalışırken; yüksek asetonitril oranına sahip bir hareketli faz kullanıldığında ise polar bileşiklerin ayırımı için HILIC modunda işlev görebilir. Bu durumda, karışık mod sabit fazlar temelde ikili amaçlı bir kullanım sağlamaktadır. Karışık mod sabit fazlar ve bunların farklı uygulama alanları, Wang ve çalışma arkadaşlarının 2016 yılında yayımladığı kapsamlı bir inceleme çalışmasında detaylı bir şekilde ele alınmıştır (Wang et al., 2016). Bu derleme ise, 2016 sonrasında bildirilen yeni nesil karma mod sabit fazlara odaklanmaktadır.

2.6. HILIC/IEX Karma Mod

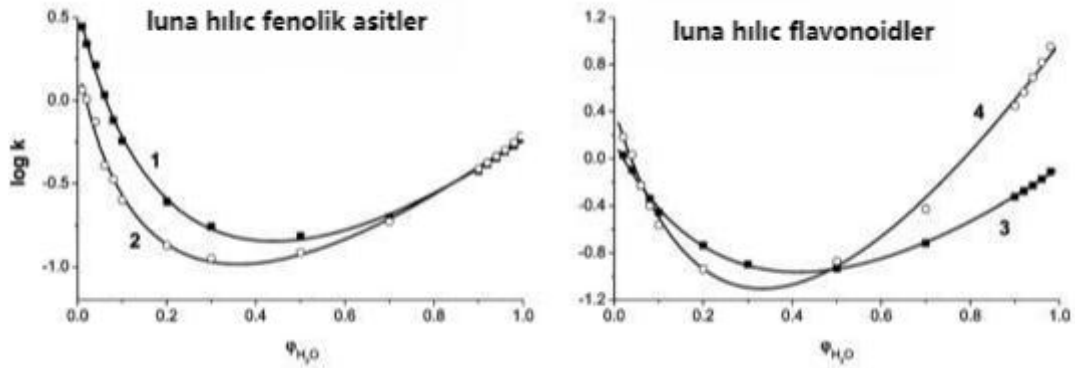
Teorik olarak, yüzeyinde yüklü fonksiyonel gruplar bulunduran herhangi bir polar sabit faz, HILIC/IEX karma mod fazı olarak değerlendirilebilir. Analitler yüklü olduğunda elektrostatik etkileşimlerin HILIC'teki tutma mekanizmalarına dâhil olması, yüklü fazların HILIC koşulları altında kullanıldığında iyon değişim (IEX) modunun HILIC'ten ayrı bir mod olarak sınıflandırılıp sınıflandırılmaması gerektiğine yönelik tartışmaları gündeme getirmektedir. Yüzeyinde yüklü gruplar bulunduran bazı ticari sabit fazlar, karma mod ayırmayı desteklemek üzere özel olarak tasarlanmıştır. Örneğin, GlycanPac AXH kolonu, glikanların hidrofilik bölümlere ve zayıf anyon değişim mekanizmalarına dayalı olarak ayrılması için geliştirilmiştir. Bu kolon, biyokatalitik glutarik asit analizinde kullanılmış olup, analizde %80 asetonitril içeren tipik bir HILIC hareketli fazı tercih edilmiştir (Petrol, Care, Waterstraad, Berguist & Sunna, 2019). Karma mod özellikleri, bazı ticari olmayan sabit fazlar için de vurgulanmaktadır. Örneğin, sülfonat/üçüncül amin ve sülfonat/piridinyum fazları (Tablo 2), karma mod fazları olarak geliştirilmiş olmakla birlikte, yalnızca HILIC koşullarında değerlendirilmişlerdir (Bo et al., 2017; Takafuji, Shahrzaman, Sarahara & Ihara, 2018). Armstrong ve çalışma arkadaşları ise HILIC için sabit faz olarak kullanılmak üzere alüminosilikat bazlı bir jeopolimer malzeme sentezlemişlerdir (Thakur et al., 2019). Bu alüminosilikat malzeme, katyon değişim mekanizmasına elverişli olup, silika ve diol fazlarına benzer iyon değişim seçiciliği sergilemektedir.

2.7. RPLC/HILIC Karma Mod

Bölümlendirme, hem ters fazlı sıvı kromatografide (RPLC) hem de hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografide (HILIC) temel bir tutma mekanizmasıdır. Bu durum,

muhtemelen HILIC/RPLC karma mod sabit fazlarının geliştirilmesinin başlıca gerekçesidir. Farklı modlarda ayırma yapılabilmesi için RPLC ve HILIC'in organik çözücü gereksinimleri birbirinden farklıdır; bu nedenle, HILIC/RPLC karma mod sabit fazları esasen her iki mod için de ikili amaçlı kullanılabilecek şekilde tasarlanmıştır. RPLC/HILIC karma modunun etkili bir şekilde çalışabilmesi için, sabit fazların hem hidrofilik hem de hidrofobik fonksiyonel grupları içermesi gerekmektedir. Bu çift fonksiyonellik, bu sabit fazları, tipik bir HILIC sabit fazına kıyasla daha az polar, klasik bir RPLC sabit fazına kıyasla ise daha polar hale getirmektedir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik grupların varlığı nedeniyle, $\log k$ değerinin hareketli fazdaki su fraksiyonu (ϕ) ile değişim grafikleri, Şekil 2.3'te gösterildiği üzere genellikle U şeklinde bir eğri oluşturur ve bu eğri düşük veya yüksek su seviyelerinde daha güçlü tutma eğilimini ortaya koyar (Jandera, 2011). Bu ilişki, Jandera (2011) ile Jandera ve Janas (2017) tarafından tanımlanan aşağıdaki karma log-lineer denklemle ifade edilmektedir:

$$\log k = a_1 + m_{RP}\phi_{su} - m_{HILIC} \log(1 + b_1\phi_{su})$$

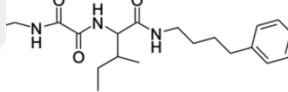
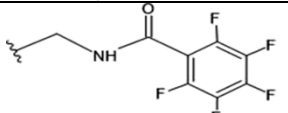
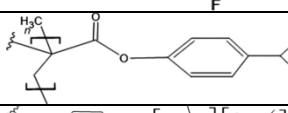
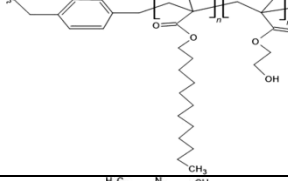
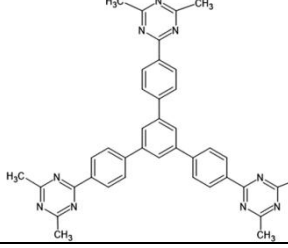


Şekil 2.3. Sulu asetonitril mobil fazındaki sulu bir tamponun (10 mM amonyum asetat, pH 3) hacim oranının (ϕ_{H_2O}) LUNA-HILIC kolonunda fenolik asitlerin ve flavonların alıkonması üzerindeki etkisi. Jandera'nın (2011) izniyle uyarlanmıştır.

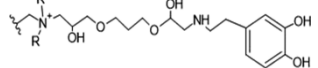
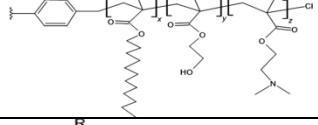
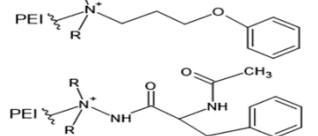
Karma mod sabit fazlar, teorik olarak tek bir kolonun hem RPLC hem de HILIC modlarını kapsayabilmesi avantajını sunmaktadır (Wang, Wei, Xia, Jie & Xia, 2016). Bu potansiyel avantaj doğru olmakla birlikte, pratikte her iki modun tek bir çalışmada eşzamanlı olarak kullanılması mümkün değildir; bu durum, aynı numunenin RPLC ve HILIC modlarında ayrı ayrı yürütülen iki farklı ayırma işlemiyle elde edilebilir. Böyle bir yaklaşım, bazı durumlarda pratik ve maliyet açısından avantajlı olabilir; ancak

karma mod sabit fazlar, genellikle yalnızca tek bir moda özel olarak tasarlanmış geleneksel sabit fazlara göre her iki modda da daha düşük kalıcılık (retansiyon) göstermektedir. Örneğin, Acclaim HILIC-10 kolonu, diol fonksiyonel grubuna bağlı 10 karbonlu bir alifatik zincir içermekte olup hem RPLC hem de HILIC uygulamalarını desteklemek amacıyla geliştirilmiştir. Ancak bu kolon, HILIC’te kullanılan saf diol fazlara kıyasla daha az polar bileşikler için daha düşük kalıcılık sunmaktadır (Guo & Gaiki, 2011). Bununla birlikte, karma mod sabit fazlar, yalnızca tek bir mod için tasarlanmış geleneksel sabit fazlara göre farklı bir seçicilik profili sağlayabilmektedir. 2016 sonrası literatürde raporlanmış bazı temsilci RPLC/HILIC karma mod sabit faz örnekleri aşağıda özetlenmiş olup, bu fazlara ait fonksiyonel gruplar Tablo 2.3’te sunulmaktadır. Örneğin, Aral ve çalışma arkadaşları, başlangıç malzemesi olarak L-izolösin ve 4-fenilbütilamin kullanarak, hidrofobik fenilbütil kısmı ile hidrofilik dipeptit bileşeni birleştiren, yüzeye bağlı bir karma mod sabit faz hazırlamışlardır (Aral et al., 2017). Bu fazın, hem RPLC hem de HILIC modlarında etkili olduğu gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Karma modlu sabit fazlar

Faz	Faz Adı	Fonksiyonel Grup (Şekil)	Kaynak
RPLC/HILIC	İzolösin/fenilbutilamin		Aral et al. (2017)
RPLC/HILIC	Pentaflorobenzamid		Ferreira et al. (2018)
RPLC/HILIC	Fenilglisin		Peng et al. (2018)
RPLC/HILIC	Dodesil-hidroksietil		Bo et al. (2018)
TürüRPLC/HILIC	Terfenil/triazin		Zuo et al. (2019)

Faz Türü	Faz Adı	Fonksiyonel Grup (Şekil)	Kaynak
----------	---------	--------------------------	--------

RPLC/IEX/HILIC	Bütandiol/dopamin dendrimer		Zhou et al. (2018)
RPLC/IEX/HILIC	Dodesil/hidroksietil/kuaterner amin		Bo, Jia, Dai ve Wei (2020)
RPLC/IEX/HILIC	Polietileniminin gömülü		Ren et al. (2018); Wan et al. (2020)

Benzer şekilde, Ferreira ve çalışma arkadaşları, pentaflorofenil fazını daha polar hale getirmek amacıyla bir amid grubu ekleyerek modifiye etmişlerdir (Ferreira et al., 2018). Elde edilen pentaflorobenzamid fazı, RPLC modunda geleneksel pentaflorofenil fazına göre daha düşük kalıcılığa sahipken, HILIC modunda ise daha yüksek kalıcılık sağlamaktadır. Ayrıca, 2-amino-2-(4-(metakriloksi)fenil)asetik asit, fenilglisin ve metakrilik anhidrit kullanılarak başka bir karma mod sabit faz geliştirilmiştir. Yüzeye bağlı bir fenilglisin zwitteriyonik fazı, tiyol başlatmalı yüzey polimerizasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Peng et al., 2018). Elde edilen bu sabit faz, RPLC modunda alkilbenzenler ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) gibi hidrofobik bileşenlerin ayrılmasında kullanılmış, ancak geleneksel C18 fazına kıyasla daha düşük tutma göstermiştir. Aynı sabit faz HILIC modunda kullanıldığında ise, kimyasal olarak bağlanmış bir amid fazına göre nükleobazlar ve nükleozidler üzerinde daha yüksek tutma yeteneği sergilemiştir. Farklı bir polimerizasyon stratejisiyle, dodesil metakrilat ve hidroksietil metakrilat, iki aşamalı yüzey başlatmalı atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile silika yüzeyine aşıl原因arak yeni bir karma mod sabit faz geliştirilmiştir (Bo et al., 2018). Bu faz, hidrofobik özellik sağlayan dodesil gruplar ile hidrofilik özellik sağlayan hidroksietil grupları bir arada içermektedir. Dodesil ve hidroksietil gruplarının farklı monomerlerden sağlanması sayesinde, sabit fazın polaritesi, başlangıç monomerlerinin oranı ayarlanarak kontrol edilebilmektedir. Buna ek olarak, yüzeysel gözenekli bir sabit faz elde etmek amacıyla kovalent triazin bazlı bir organik çerçeve (COF) sentezlenmiştir (Zuo et al., 2019). Bu fazda, birbirine bağlı trifenilbenzen ve triazen birimleri, durağan faza hem hidrofobik hem de hidrofilik özellikler kazandırarak karma modlu ayırmaya uygun hale getirilmiştir.

2.8.RPLC/IEX/HILIC Karışık Mod

RPLC/HILIC karışık mod sabit fazlarına, yüklü veya iyonize edilebilir grupların eklenmesi, bu fazların ters fazlı (RPLC), iyon değişim (IEX) ve hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografi (HILIC) olmak üzere üç farklı kromatografik modda kullanılmasına olanak tanımaktadır. Örneğin, 1,4-bütandiol-diglisidil eter ve dopaminin tekrarlanan aşılansıyla modifiye edilmiş bir silika yüzeyi, hidrofobik (fenil ve etilen grupları), hidrofilik (hidroksil) ve iyonize edilebilir-yüklü (ikincil ve kuaterner aminler) gruplara sahip bir dendrimer faz oluşturmuştur (Zhou et al., 2018). Bu dendrimer faz, alkilbenzenler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), nükleobazlar, nükleozitler ve flavonoidler gibi model bileşiklerin hem RPLC hem de HILIC modlarında başarılı bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Ayrıca, elektrostatik etkileşimlerin varlığı, hareketli fazda %40'ın üzerinde asetonitril içeren koşullarda fenilaminler ve benzoik asitler için gözlemlenmiştir. Bu ve çalışma arkadaşları, sabit faza yüklü kuaterner amin grupları kazandırmak amacıyla üçüncü bir monomer olan dimetilaminoetil metakrilatı, dodesil/hidroksietil metakrilat bazlı sabit fazlarına ekleyerek modifiye etmişlerdir (Bo et al., 2020). Böylece sabit fazın özellikleri, üç farklı monomerin oranı ayarlanarak kontrol edilebilmiş ve bu sayede hem RPLC hem de HILIC modlarında tutma ve seçicilik parametreleri optimize edilebilmiştir. Buna ek olarak, silika desteğine bağlı polietilenimin (PEI), glisidilfenileter ve N-asetil-L-fenilalanin ile modifikasyonu yoluyla PEI gömülü karışık mod sabit fazı geliştirilmiştir (Ren et al., 2018; Wan et al., 2020). Bu yapılandırma, PEI polimerine fenil grupları kazandırarak hem hidrofobik hem de hidrofilik etkileşimleri mümkün kılmıştır. Geliştirilen bu sabit fazın, hem RPLC hem de HILIC modlarında etkili ayırma sağladığı ve ek olarak iyon değişim etkisi gösterdiği raporlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Malzemeler

HPLC kalitesinde küresel silika jel (Kromasil 5-100 SIL; partikül çapı: 5 µm, gözenek çapı: 100 Å, yüzey alanı: 324 m² g⁻¹) Nouryon Chemical Company'den (İsveç) temin edildi. Hepsi HPLC sınıfı çözücüler olan asetonitril (ACN), metanol (MeOH) ve izopropanol (IPA) Merck'ten satın alındı. Bu çalışmada incelenen tüm analitler (Şekil S1-S6, Ek Malzemelerde verilen yapılar) ve kullanılan diğer kimyasallar veya çözücüler Sigma-Aldrich (ABD) veya Merck'ten temin edildi. Aksi belirtilmediği sürece, tüm sentez reaktifleri analitik sınıftaydı.

3.2. Enstrümanlar

HPLC uygulamaları için paslanmaz çelik kolonlar HPLC'lerden (Çin) elde edildi. Kolon dolgusu, bir Chromtech pompası ve rezervuar ünitesinden (Chromtech, ABD) oluşan bir dolgu aparatı kullanılarak gerçekleştirildi. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrumları bir Mattson 1000 spektrometresi (Mattson, ABD) üzerinde kaydedildi. Element analizi bir FLASH 2000 analizörü (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Deneyler boyunca kullanılan ultra saf su, bir Millipore Milli-Q arıtma sistemi (Merck, ABD) tarafından üretildi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik karakterizasyon, Dicle Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndaki SEM tesisinde bulunan bir Quanta FEG 250 cihazı (FEI Company, ABD) ile gerçekleştirildi. Dokusal özellikler, otomatik bir adsorpsiyon analizörü (ASAP 2020, Micromeritics) kullanılarak 67 K' de azot adsorpsiyon ölçümleriyle değerlendirildi. Brunauer-Emmett-Teller (BET) yüzey alanı (S_{BET}), toplam gözenek hacmi (V_T) ve gözenek boyutu dağılım parametreleri, Quantachrome yazılımıyla işlenen nitrojen adsorpsiyon-desorpsiyon izoterm verilerine dayanarak belirlendi (Ek Malzemeler, Tablo 2'ye bakın).

3.3. HPLC Koşulları

Kromatografik deneyler, bir kuaterner gradyan pompası, gaz giderici, otomatik örnekleyici, diyot dizisi dedektörü (DAD) ve termostatik olarak kontrol edilen kolon fırınından oluşan bir Agilent 1260 HPLC cihazı (Agilent, Almanya) kullanılarak yürütüldü. Ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC) standartları başlangıçta 1 mg/mL konsantrasyonda asetonitril (ACN) içinde çözüldü, hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) için amaçlanan analitler ise saf su veya su-etanol karışımları kullanılarak hazırlandı. Sınırlı sulu çözünürlük nedeniyle, guanin çözeltileri 0,1 N NaOH içinde hazırlandı. Tüm stok çözeltiler su veya ACN ile 0,05 mg/mL'ye kadar daha fazla seyreltildi ve daha sonra analiz edilene kadar 4°C'de saklandı. Kromatografik çalışmalar boyunca amonyum format, amonyum asetat, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) dahil olmak üzere çeşitli tampon çözeltileri kullanıldı. Tampon pH'ı seyreltik amonyak (%2,5), 0,1 M potasyum hidroksit (KOH) veya 0,1 M asit kullanılarak hassas bir şekilde ayarlandı. Kullanılan kromatografik parametrelerin kapsamlı ayrıntıları bu el yazmasının ilgili bölümlerinde özetlenmiştir.

3.4. Yeni Durağan Fazın Sentezi

100 mL'lik yuvarlak tabanlı bir şişede, 3 g (12,51 mmol) [2-(3,4-epoksisiklohekzil)etil]trimetoksi silan, DMSO'daki 1,57 g (15,01 mmol, 1,2 eşdeğer) tris[hidroksimetil]aminometan çözeltisiyle birleştirildi. Reaksiyon karışımı 100°C'de 2 saat karıştırıldı ve reaksiyonun ilerlemesi ince tabaka kromatografisi (TLC) ile izlendi. Silan öncüsünün tamamen tüketilmesi üzerine, şişeye 40 mL toluen ve 6 g silika jel (Kromasil 5-100) eklendi. Süspansiyon daha sonra silika yüzeyine aşlamayı kolaylaştırmak için 96 saat boyunca sürekli karıştırılarak 120°C'de ısıtıldı. Soğutulduktan sonra karışım filtrelendi ve elde edilen modifiye silika, 24 saatlik bir süre boyunca 200 mL kloroform ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutularak reaksiyona girmemiş artık maddeler ortadan kaldırıldı. Çıkarılan ürün daha sonra 7 saat boyunca atmosferik basınçta döner buharlaştırıcı kullanılarak kurutuldu. Fonksiyonelleştirilmiş silikanın karakterizasyonu (element analizi, SEM, BET yüzey alanı ölçümleri ve FTIR dahil) Sonuçlar ve Tartışma bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

3.5. Sabit Faz'ın Paketlenmesi

Paslanmaz elik kolonlar (250 × 4,6 mm), yüksek basıncılı bulamaç paketleme yöntemi kullanılarak sentezlenen sabit fazlar ile dolduruldu. Toplam 3,7 g paketleme malzemesi 50 mL metanolde (MeOH) süspanse edildi ve 10 dakika boyunca ultrasonik dispersiyon işlemine tabi tutuldu. Bu bulamaç daha sonra paketleme sistemine bağlı 50 mL'lik paslanmaz elik bir rezervuara aktarıldı ve tüm bağlantı parçaları sıkıca sıkıldı. 1:1 IPA ve MeOH karışımından oluşan itme çözücüsü, 50 barlık bir başlangıç basıncında tanıtıldı. Basıncı, her adımda 1 dakikalık bekleme süresiyle 50 barlık adımlarla kademeli olarak artırıldı ve 10 dakikalık bir süre içinde 450 bara ulaşıldı. Paketleme, 450 barda ek 20 dakika tutularak tamamlandı. Bunu, kolonun 15 dakika boyunca 70:30 MeOH/IPA karışımıyla ve ardından 10 dakika boyunca saf MeOH ile yıkanması izledi. Daha sonra paketlenmiş kolon HPLC sistemine yerleştirildi ve 1 saat boyunca 0,5 mL/dakika akış hızında MeOH ile dengeye getirildi. Daha sonra, her biri 1 saat boyunca tanıtılan MeOH/su (50:50), ACN/su (10:90), ACN/su (50:50) ve ACN/su (90:10) karışımları kullanılarak kademeli bir şartlandırma protokolü uygulandı. Yeni paketlenmiş kolonun performansı başlangıçta test problemleri olarak adenin ve butilbenzen kullanılarak değerlendirildi.

3.6. Amino Kolonun Hazırlanması ve Paketlenmesi

4 g silika (Kromasil 5-100) ve 3 g 3-aminopropiltrimetoksi silan, 50 ml'lik yuvarlak tabanlı bir reaksiyon kabına alındı, 30 ml toluen eklendi ve reaksiyon karışımı 120°C'de 96 saat karıştırıldı. Soğutulduktan sonra karışım szld, toluen ve MeOH ile yıkandı. Elde edilen modifiye silika, reaksiyona girmemiş artık maddeleri uzaklaştırmak için 24 saat boyunca 200 mL kloroform ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Ekstrakte edilen ürün daha sonra atmosferik basınçta döner buharlaştırıcıda 7 saat kurutuldu. Elementel analiz dahil; C;8.35, H;1.90, N;3.19. Amino kolon, yukarıdaki prosedürün biraz değiştirilmiş bir versiyonu kullanılarak paketlenmiş. Bulamaç, bulamaç çözücüsü olarak MeOH ve itme çözücüsü olarak MeOH/IPA (70:30) kullanılarak 450 bar sabit basınçta paketlenmiş.

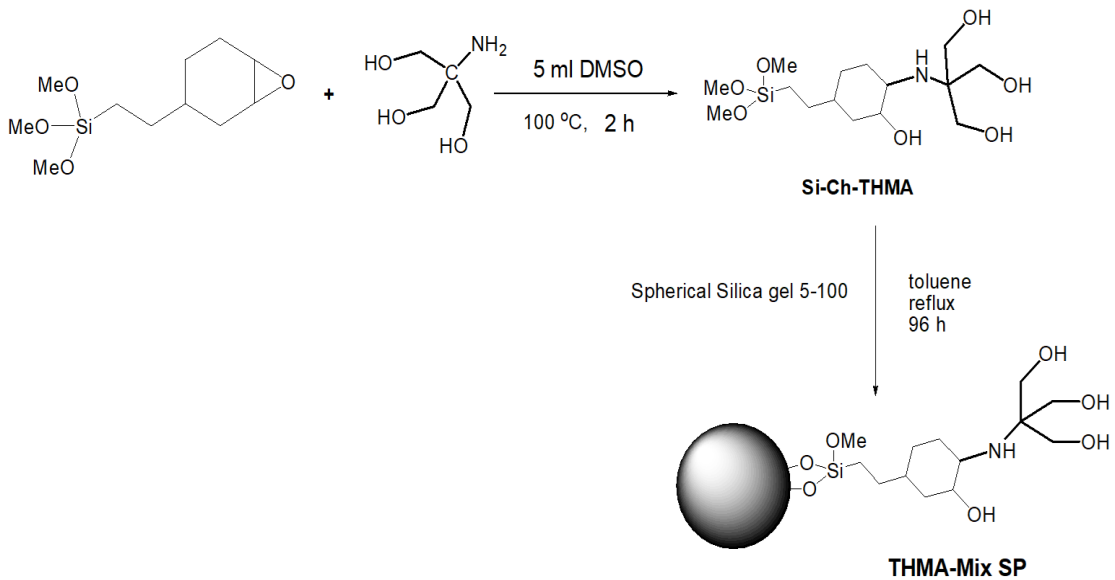
3.7. QSRR Değerlerinin ve Kromatografik Parametrelerin Pesaplanması

Analitler ile durağan faz arasındaki tutma özellikleri ve etkileşim mekanizmaları hakkında fikir edinmek için kantitatif bir yapı-tutma ilişkisi (QSRR) analizi yürütüldü. Dağılım katsayısı (logD), sulu çözünürlük (logS) ve asit ayrışma sabiti (pKa) dahil olmak üzere ilgili moleküler tanımlayıcılar, ChemAxon'un Kimyasallaştırma aracı kullanılarak tüm bileşikler için eşit şekilde hesaplandı ve metodolojik tutarlılık sağlandı. Tablo Ek-27 ve Ek-29'de (Ek Malzemeler) özetlenen logD ve logS değerleri, her bir analit sınıfı için optimize edilmiş pH koşullarını yansıtır. Ek olarak, logD ve logS'deki pH'a bağlı eğilimler, değişen asidik ve bazik koşullar altında çözünürlük ve polarite değişimlerini açıklamak için hem nükleobazlar/nükleozitler (Ek-11 ve Ek-13) hem de benzoik asit türevleri (Ek-16 ve Ek-17) için grafiksel gösterimler aracılığıyla gösterildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sentezler

Yapısal olarak farklı bileşikleri ayırabilen bir kromatografik platform arayışında, hem polar hem de polar olmayan etkileşim bölgelerini tek bir yüzeye entegre ederek yeni bir karışık modlu sabit faz geliştirildi. Tris(hidroksimetil)aminometan (THMA), üç hidroksil grubu ve polar olmayan metilen bağları olan birincil bir amini birleştiren yüksek hidrofilik yapısı nedeniyle merkezi bir yapı taşı olarak seçildi. Bu moleküler yapı, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler yoluyla hidrofilik alıkonmayı destekleyen geniş bir etkileşim profili sağlarken, aynı zamanda orta derecede hidrofobik analitleri de barındırır. THMA'nın işlevselliğini tamamlamak için, [2-(3,4-epoksisikloheksil)etil]trimetoksisilan tuzlama maddesi olarak kullanıldı. Kromatografik faz tasarımında nadiren kullanılmasına rağmen, bu silan benzersiz bir ikili katkı sunar: epoksit kısmı, amin gruplarına etkili bir şekilde aşılama sağlarken, sikloheksil ve etil segmentleri faza orta derecede hidrofobisite kazandırır. THMA ile halkanın açılması sonucunda oluşan amino alkol fonksiyonelliği, iyon-dipol, dipol-dipol, hidrojen bağı ve π ile ilgili etkileşimlere girebilen kimyasal açıdan zengin bir yüzey oluşturur.



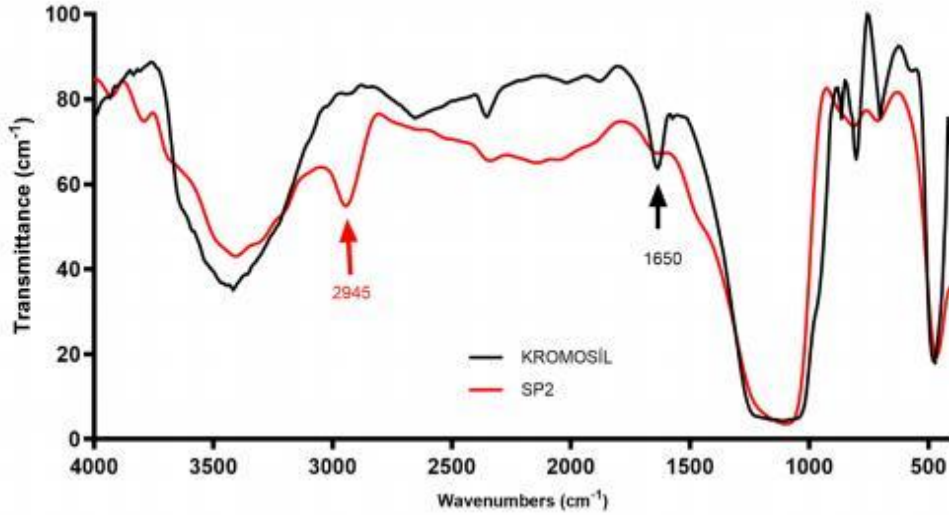
Şekil 4.1. Yeni karma modlu sabit fazın sentezi

Sentetik işlem, pratiklik ve tekrarlanabilirliği desteklemek için basitleştirildi. THMA ve epoksi silan, iki saat boyunca küçük bir hacimli DMSO'da 100°C'de

reaksiyona sokuldu ve kovalent bir organik-inorganik hibrit oluşturuldu. TLC ile tamamlanma doğrulandıktan sonra, küresel silika (Kromasil, 5 μ m, 100Å) ortam olarak toluen ile karışıma sokuldu ve süspansiyon, immobilizasyonu kolaylaştırmak için 96 saat boyunca 130°C'de ısıtıldı. Daha sonra, kalıntı reaktifleri gidermek için 24 saat boyunca kloroform ile Soxhlet ekstraksiyonu gerçekleştirildi. THMA-Mix SP olarak adlandırılan son malzeme, işlevsel olarak çok yönlü bir sabit faz olarak elde edildi. Belirli bir analit türü için optimize edilmek yerine, bu faz kasıtlı olarak çok çeşitli kimyasal sınıflarla etkileşime olanak sağlayacak şekilde tasarlandı. Hidroksil, amin, alkil ve siklohekzil gruplarının birlikte bulunmasından kaynaklanan çok modlu yüzey özellikleri, onu hem polar hem de polar olmayan bileşiklerin eş zamanlı alıkonmasını gerektiren uygulamalar için özellikle uygun hale getirir. FTIR, element analizi ve azot sorpsiyon teknikleri (BET) ile karakterizasyon, başarılı yüzey modifikasyonunu ve geniş kromatografik uygulanabilirlik için gerekli olan işlevsel çeşitliliğin varlığını doğruladı.

4.2. Karakterizasyonlar

Silika yüzeyinin kimyasal modifikasyonunu doğrulamak için element analizi ve FTIR (Şekil 4.2) spektroskopisi kullanıldı. THMA-Mix SP materyali %18,18 karbon ve %2,13 azot gösterdi (Tablo 1), bu da organik ligandların başarılı bir şekilde bağlandığını gösteriyordu. FTIR spektrumları 2945cm⁻¹'de tipik -CH₂- gerilme titreşimleri gösterirken, çıplak silikada gözlenen karakteristik 1650cm⁻¹ bandı neredeyse yoktu, bu da önemli yüzey değişimini gösteriyordu. Geniş -OH sinyalleri mevcuttu ancak modifiye edilmemiş silikaya kıyasla daha az yoğun, bu da hidroksil içeren kısımların dahil edilmesini destekliyordu.

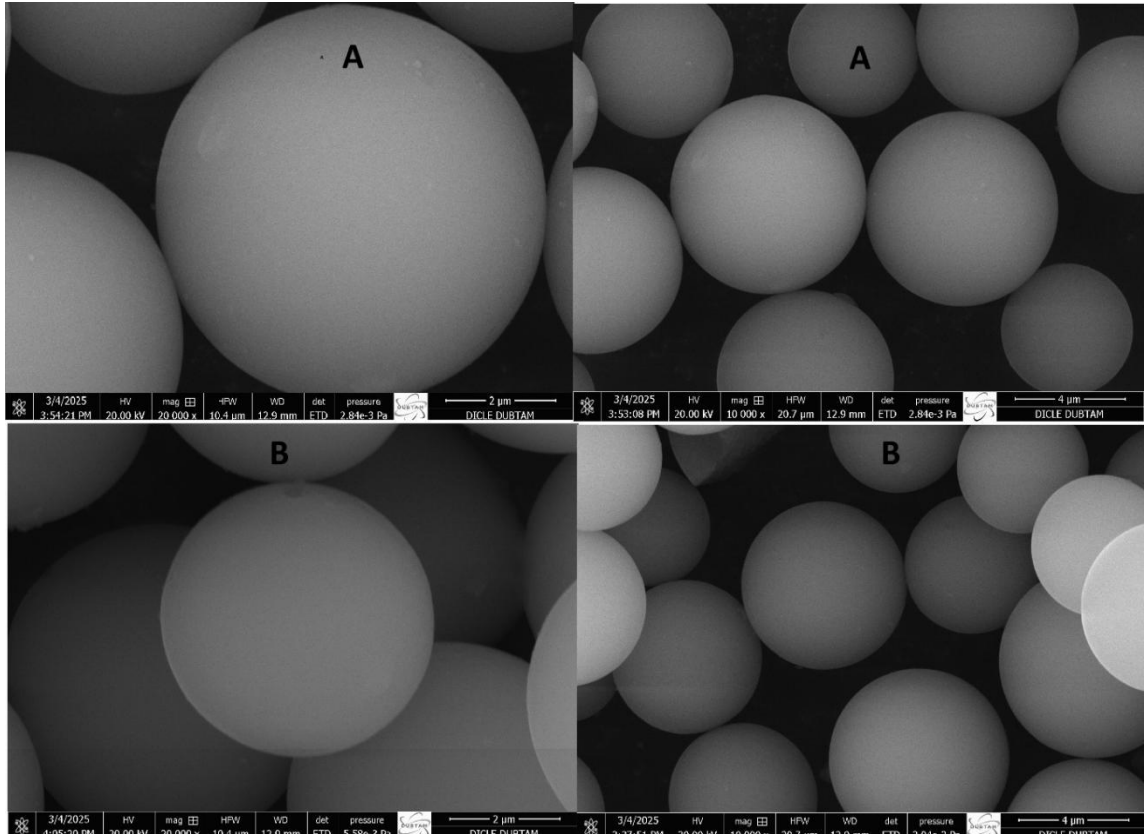


Şekil 4.2. THMA-Mix SP'nin FTIR spektrumu

Daha fazla karakterizasyon, azot sorpsiyon analizi ve SEM kullanılarak gerçekleştirildi. Orijinal Kromasil silika ($320\text{m}^2/\text{g}$, 0.90mL/g , $110\text{\AA}$) ile karşılaştırıldığında, fonksiyonelleştirilmiş THMA-Mix SP, $144\text{m}^2/\text{g}$ yüzey alanı, 0.31mL/g gözenek hacmi ve $89\text{\AA}$ ortalama gözenek çapı (Tablo 4.1) değerlerinde azalma gösterdi. Bu değişiklikler, ligandın gözenekli ağı başarılı bir şekilde nüfuz ettiğini doğrularken, gözenek hacmindeki belirgin azalma kısmi tıkanıklığı düşündürmektedir. Gözenek çapındaki azalma, düzgün yüzey kaplamasıyla tutarlı olarak çökmeden ziyade iç kaplamayı yansıtır. Ayrıca, modifikasyondan sonra parçacık morfolojisini değerlendirmek için SEM (Şekil 3) analizi kullanıldı. HPLC dereceli silikanın küresel geometrisi ve boyut homojenliği, THMA-Mix SP malzemesinde korundu. Hiçbir kümelenme, deformasyon veya parçalanma gözlenmedi; bu da fonksiyonelleştirme sürecinin desteğin fiziksel yapısını koruduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Hazırlanan durağan fazın element bileşimive THMA-Mix SP'nin BET yüzey karakterizasyonu

Element	Elemental Kompozisyon %			BET Analizi		
	C	H	N	BET yüzey alanı (m ² /g)	Toplam gözenek hacmi (cm ³ /g)	Ortalama gözenek çapı (Å)
Boş silika	0	0.01	0	320	0.9	110
THMA-Mix SP	18.18	3.61	2.13	144	0.31	89



Şekil 4.3. Boş silikanın (A) ve THMA-Mix SP'nin (B) SEM görüntüleri

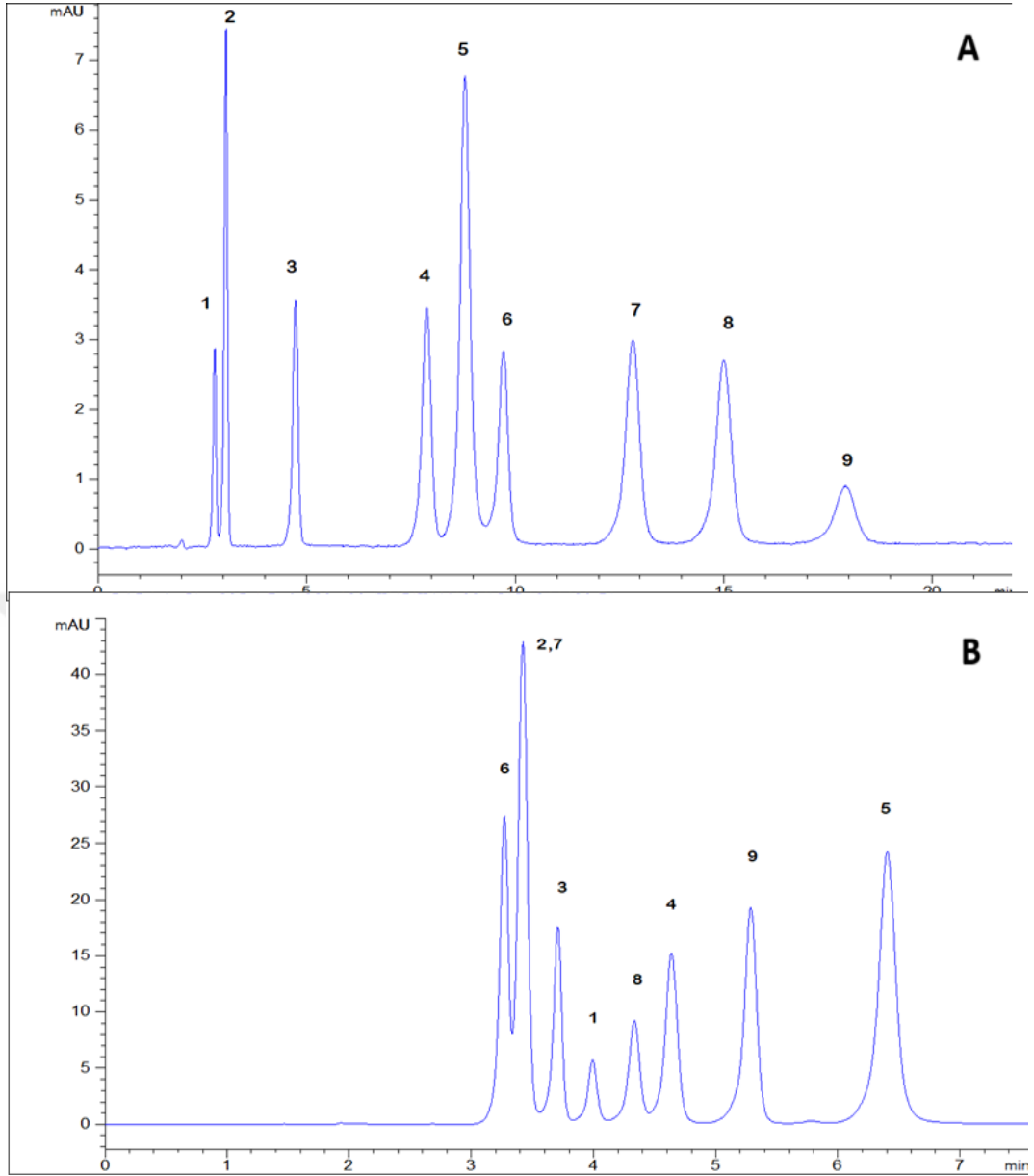
4.3. HPLC Değerlendirmeleri

4.3.1. Nükleobazlar/Nükleozitlerin HILIC alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi

Nükleobazlar ve nükleozitler gibi polar analitler, sınırlı hidrofobik karakterleri nedeniyle geleneksel ters fazlı sistemlerde sıklıkla tutma zorlukları yaratırlar. THMA-Mix SP sabit fazının HILIC ve RPLC koşulları altında uygulanabilirliğini değerlendirmek için, hem serbest bazları hem de bunlara karşılık gelen nükleozitleri

içeren temsili dokuz bileşenli bir karışım incelendi (Şekil 4.4). Suda %90 ila %5 ACN'den oluşan bir dizi hareketli faz bileşimi değerlendirildikten sonra, optimize edilmiş koşulun 2,0 mL/dakika akış hızında uygulanan 92:8 ACN/su izokratik karışımı olduğu belirlendi.

Bu koşullar altında, tüm analitler 18 dakika içinde başarıyla ayrıldı (Şekil 4-A). Ek olarak, ters faz koşulları altında (ACN/su: 5/95), THMA-MIX-SP kolonu, yedisi için temel çözünürlük de dahil olmak üzere sekiz analitin ayrılmasını başardı (Şekil 4-B). Önemli olarak, THMA-Mix SP kolonu hem HILIC hem de RPLC koşulları altında yüksek verimlilik gösterdi, teorik plaka sayımları 22.000 ila 33.000 arasında değişiyordu ve tepe simetri faktörleri genellikle birliğe yakındı (1,00–1,21), (Tablo-Ek 27'de) özetlendiği gibi. Bu ölçümler, fazın izokratik elüsyon altında oldukça polar moleküller için kararlı tutma davranışını desteklediğini göstermektedir.



Şekil 4.4. HILIC (A) ve RPLC (B) koşulları altında THMA-Mix SP üzerinde nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması. Koşullar: (A) : ACN/su: 92/8, 2 ml/dk, 35 0C, 1,5 µL, 265 nm. (B): ACN/su: 5/95, 1 ml/dk, 20 0C, 1,5 µL, 265 nm. Analitler: 1; timin, 2; urasil, 3; uridin, 4; adenozin, 5; adenin, 6; sitozin, 7; sitidin, 8; guanin, 9; guanozin.

Nükleobaz/nükleozid analitlerinin alıkonma süreleri ile logD değerleriyle ifade edilen öngörülen polariteleri arasında doğrudan bir korelasyon görülmedi. Hem logD (Tablo Ek-27, Şekil Ek-11) hem de sulu çözünürlük (logS,EK-12) parametrelerini kullanan veri karşılaştırmaları, beklenen polarite tabanlı elüsyon düzeninden sapan düzensiz eğilimler ortaya koydu. Örneğin, en düşük logD'ye (-2,80) sahip olan sitidin yedinci bileşik olarak elüe edilirken, uridin (logD: -2,42) kromatogramın başlangıcına yakın elüe edildi ve guanozin (logD: -2,71) en uzun süre tutuldu. Bu sonuçlar, THMA-Mix SP kolonundaki alıkonma davranışının yalnızca hidrofilisite ile açıklanamayacağını

göstermektedir. Bununla birlikte, analit sınıfları arasında kısmi bir eğilim ortaya çıktı: uridin ve adenosin hariç, nükleozidler genellikle nükleobaz muadillerinden daha uzun süre tutuldu. Bu desen, riboz kısmının sabit faz ile artan etkileşime katkıda bulunabileceğini (potansiyel olarak hidrojen bağı yoluyla) ancak tutma davranışına tekdüze bir şekilde hakim olmadığını göstermektedir. Örneğin, adenosinin adenine göre daha erken elüsyonu, şeker grubu etkilerinin bağlama bağı olduğunu ve diğer yapısal faktörler tarafından geçersiz kılınabileceğini ima eder.

THMA-Mix-SP sabit fazındaki yüksek polariteli nükleobazların ve nükleozitlerin alıkonma özellikleri yalnızca klasik ters faz veya HILIC mekanizmalarıyla açıklanamaz. Hidrojen bağı vericileri ve alıcıları açısından zengin olan bu moleküller, hidrojen bağı ve iyon-dipol etkileşimleri de dahil olmak üzere THMA modifiyeli yüzeyin hidroksil ve amino işlevsellikleri ile çeşitli ve yönlü etkileşimlerde bulunur. Elüsyon sırası logD değerleriyle kesin bir korelasyona uymadı ve en polar analitlerin en son elüsyona uğraması gerektiğini öne süren klasik HILIC ilkesiyle de uyuşmadı. Serideki en apolar bileşik olan ve nispeten düşük bir sulu çözünürlük (pH 7'de logS $\sim$ -0.65) gösteren timin (logD: -0.52), organik madde açısından zengin koşullar altında hidrofilik sabit faz için zayıf afinitesi ile tutarlı olarak beklendiği gibi önce elüe oldu. Bunun aksine, guanin (logD: -1.15, logS: -2.00) ve adenin (-0.58, logS: -1.90), urasil (-1.06, logS: -0.45) ve uridin (-2.42, logS: -0.60) gibi daha hidrofilik ve daha çözünür bileşiklerden daha sonra elüe oldu; bu da daha düşük sulu çözünürlüğün sabit fazla artan etkileşimler yoluyla daha güçlü alıkonmayı desteklediğini düşündürmektedir. Ancak daha yakından bakıldığında daha ayrıntılı bir senaryo ortaya çıkmaktadır.

Çalışılan tüm analitler arasında en düşük çözünürlüğe sahip olmalarına rağmen, ne adenin ne de guanin en son elüe olmadı. Alıkonma davranışları, sulu çözünürlük (logS) ve hidrofobisite (logD) arasındaki ince bir denge tarafından yönetiliyor gibi görünüyor. Bu, her iki özelliğin de (çözünme eğilimi ve organik sabit faza afinite) tutma sürecine aynı anda katkıda bulunduğunu gösterir. Bu tür ikili bağımlılık, moleküler geometri, yüzey alanı ve polar fonksiyonel grupların dağılımı dahil olmak üzere birden fazla fizikokimyasal parametrenin dahil olduğuna işaret eder. Özellikle, adenin ve guanin, yalnızca çözünürlükle yönlendirilen bölümlenmeyi değil aynı zamanda hidrojen bağı, elektrostatik ve π - π istiflemesini de içeren karmaşık bir bağlanma motifleri dizisi aracılığıyla THMA-fonksiyonelleştirilmiş yüzeyle etkileşime giriyor gibi görünüyor.

Alıkonmanın bu çok faktörlü kontrolü, bu sistemdeki analit-sabit faz etkileşimlerinin çok boyutlu doğasını vurgular.

En güçlü alıkonma özelliğine sahip dört analit incelenerek daha fazla yapısal içgörü elde edilir: guanin, guanozin, sitozin ve sitidin. Dördü de ekzosiklik bir amine bitişik bir laktam tipi karbonil içeren korunmuş bir alt yapıyı paylaşır (Şekil 4.4). Bu motif, birlikte durağan faza işbirlikçi, çok noktalı bağlanmayı kolaylaştıran üç önemli kutup etkileşim bölgesini (yani bir karbonil oksijen, bir halka azotu ve bir birincil amin) tanıtır. Çalışma pH'ında (~7.0) protonlanması beklenen kolon yüzeyindeki THMA grupları, analit üzerindeki deprotonlanmış bölgelerle iyon çifti etkileşimlerine girerek bağlanma kompleksini daha da stabilize edebilir.

Riboz grubundan yoksun olan guaninin alıkonmada hala ikinci sırada yer alması, bu heterosiklik alt birimin tek başına oldukça spesifik etkileşimler yoluyla güçlü alıkonmayı sağlamak için yeterli olduğu fikrini güçlendirir. Bu gözlemler toplu olarak, çözünürlük, hidrofobisite ve çok değerlikli polar bağlanma bölgeleri aracılığıyla moleküler tanınmanın hepsinin uyumlu bir şekilde katkıda bulunduğu bir tutma modelini destekler. Bu nedenle, THMA-Mix-SP sabit fazı yalnızca hidrofilik veya iyonik çekim yoluyla değil, aynı zamanda yapılandırılmış, bölgeye özgü moleküler tanınma yoluyla da işlev görür; bu da mekanik düzeyde karışık mod doğasını vurgular. Sabit fazdaki ikincil bir hidroksil, analit yönelimine bağlı olarak ek hidrojen bağı veya dipol etkileşimleri yoluyla tutmaya da katkıda bulunabilir. Adenin ve adenozin gibi bazı durumlarda, tutmadaki farklılıklar yüzey afinitesinden değil, hareketli fazdaki solvasyon farklılıklarından kaynaklanabilir. Daha düşük suda çözünürlüğe sahip olan adenin ($\log S = -1.74$), adenozinden ($\log S = -1.31$) muhtemelen daha az solvatlanmıştır ve bu da sabit fazla daha etkili bir etkileşime yol açar. Bu gözlemler, çoklu eş zamanlı etkileşimleri içeren bir tutma mekanizmasını destekler; elektrostatik, hidrojen bağı ve solvasyon modülasyonlu bölümlendirme, THMA-Mix SP kolonundaki polar biyomoleküllerin davranışını klasik RPLC veya saf HILIC modellerinden farklı kılar.

Yayınlanmış yöntemlerle kıyaslandığında, THMA-Mix SP kolonun ayırma performansı öne çıkar. Önceki raporlar, karşılaştırılabilir beş-dokuz bileşenli karışımlar için 8 ila 40 dakika arasında değişen ayırma sürelerini açıklar. Çoğu sistem yalnızca kısmi çözünürlük elde eder veya gradyan koşulları gerektirir. Özellikle, grubumuzun daha önceki çalışmalarında, karışık modlu kolonlar kullanılarak 10-22 dakika içinde altı ila yedi analitin ayrıldığı bildirilmiştir. Optimize edilmiş izokratik koşullar altında, THMA-Mix SP kolonu, yüksek verimlilik ve mükemmel tepe şekillerini korurken, 18

dakika içinde tüm dokuz nükleobaz ve nükleozidin tamamen ayrılmasını sağlamıştır. Bu, THMA-Mix SP malzemesini, yapısal olarak çeşitli nükleobazlar/nükleozid türevlerinin izokratik ayrımı için bugüne kadar geliştirilen en etkili sabit fazlar arasına yerleştirir. 2023 ve 2024'te yürütülen daha yakın tarihli çalışmalar, yaklaşık 15 ila 20 dakikada beş ila altı nükleobaz/nükleozidin ayrılmasını sağlayan polar gömülü fenil-dendritik ve dikatik iyonik sıvı modifiyeli malzemeler gibi yeni sabit fazlar sunmuştur, ancak bu gelişmeler seçicilik ve tutma kontrolünde yalnızca orta düzeyde iyileştirmeler sağlamıştır.

4.3.1.2 Mobil faz kompozisyonu ve Ph'n Nükleobazlar/Nükleozidlerin alıkonma davranışları üzerindeki etkisi

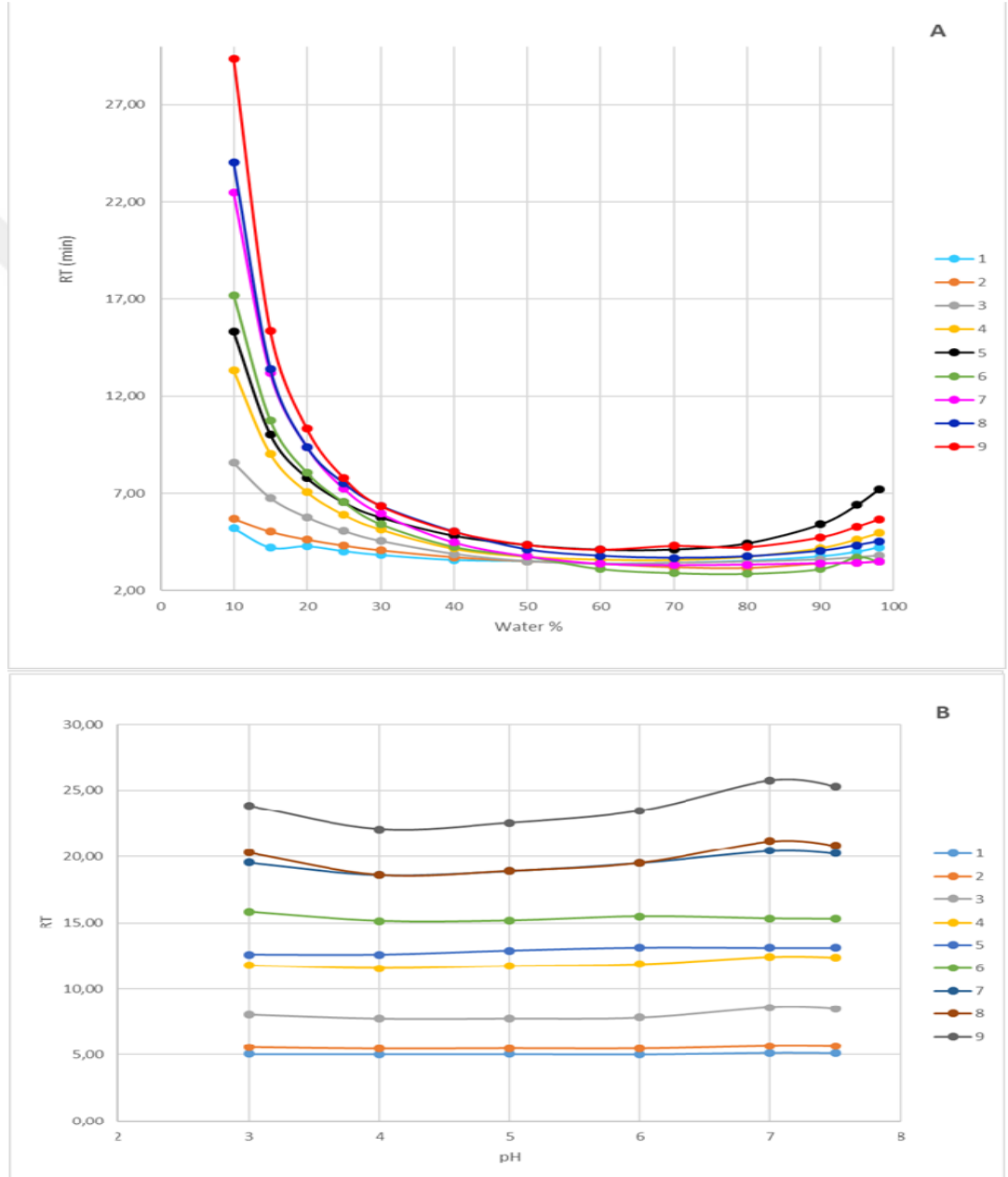
Nükleobazlar ve nükleozitlerin THMA-Mix-SP sabit fazındaki alıkonma mekanizmasını daha iyi anlamak için, hareketli fazdaki su içeriğinin (EK-8) ve pH'nın (EK-10) etkileri sistematik olarak araştırıldı. Bu iki değişken, sabit faz ile analitler arasındaki baskın etkileşim modlarına dair kritik bir içgörü sağlar. Şekil 4.4'de gösterildiği gibi, su içeriğinin %10'dan %60'a çıkarılması, tüm analitler için alıkonma sürelerinde önemli bir azalmaya neden oldu. Bu eğilim, THMA-Mix-SP'nin yüksek organik koşullar altında analitlerin polar etkileşimler (öncelikle hidrojen bağı ve dipolar kuvvetler) yoluyla tutulduğu güçlü HILIC davranışı sergilediğini göstermektedir. Su içeriği arttıkça, analitler sabit faz ile etkileşime girmek yerine giderek daha fazla hareketli faza ayrılır. Başka bir deyişle, analit-sabit faz ve analit-su etkileşimleri arasındaki denge, sulu faz lehine değişir ve böylece alıkonma azalır. Bu eğilim tüm analitlerde gözlemlenmesine rağmen, guanozin (9), guanin (8) ve sitidin (7) için daha belirgindi. Bu analitler çok düşük logD değerlerine ($< -2,5$) ve pH 7'de düşük sulu çözünürlüğe ($\log S < -1,5$; Ek-12) sahiptir ve bu da yüksek ACN koşulları altında hidrofilik THMA yüzeyi ile güçlü etkileşimlere neden olur. Yapıları, THMA ligandı üzerindeki dört hidroksil grubu ve protonlanmış amin ile çoklu hidrojen bağı etkileşimlerine izin vererek uzun süreli alıkonmayı yol açar. Buna karşılık, daha az polar ve daha suda çözünür olan timin (1) ve urasil (2) gibi analitler ($\log D: -0,52$ ve $-1,06$; $\log S \sim -0,6$), alıkonmada yalnızca hafif değişiklikler gösterdi ve daha erken elüe eSu içeriği %60'ı aştığında, sistem ters faz davranışı göstermeye başladı. Bu koşullar altında, %5 ACN'de elde edilen kromatogram (Şekil 4B) bu değişimi açıkça gösterdi. RPLC koşulları altındaki elüsyon sırası şöyleydi: 2, 7, 6, 3, 1, 8, 4, 9, 5. Bu sıra

yalnızca logD değerleri ile tam olarak açıklanamadı. Özellikle, adenin (5), guanin (8) ve guanozin (9), düşük logD değerlerine sahip olmalarına rağmen geç elüe oldular. Gecikmeli elüeleri, düşük sulu çözünürlükleriyle (sırasıyla logS $\sim$ -1,6, -2,0 ve -1,7) daha iyi ilişkilidir; bu, hareketli faza çözünmelerini engeller ve sabit fazla spesifik olmayan etkileşimler yoluyla alıkonmayı destekler. Özellikle, nispeten yüksek bir logD değeri olan -0,58'e sahip adenin, yine de en son elüe oldu ve bu koşullar altında çözünürlüğün (hidrofobisite değil) baskın faktör olduğunu düşündürmektedir. Bu arada, oldukça polar ve daha çözünür olan sitidin (7), RPLC koşulları altındaki sınırlı etkileşimiyle tutarlı olarak en erken elüe oldu.

pH'a bağlı tutma verileri (Şekil 4.5.2), iyonik etkileşimlerin sınırlı bir rol oynadığı fikrini daha da desteklemektedir. pH 7,5 ile pH 4,0 aralığında, çoğu analit tutmada minimal değişiklikler gösterdi, bu da hem durağan fazın hem de analitlerin protonasyon-deprotonasyon dengelerine benzer şekilde yanıt verdiğini ve böylece nispeten sabit bir elektrostatik etkileşim manzarasını koruduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, sitidin (7), guanin (8) ve guanozin (9) bu bölgede daha belirgin bir pH duyarlılığı gösterdi. 3,59'luk bir pKa'ye sahip olan sitidin için, pH 4,0 civarındaki minimum tutma, protonlanmış amino grubu ile pozitif yüklü durağan faz arasındaki yük itmesine atfedilebilir. pH 3,0'a doğru daha da düştükçe, tutma tekrar artar; bu, tamamen monotonik bir eğilimden sapan bir gözlemdir. Bu beklenmeyen artış, diferansiyel protonasyon kinetiği ile açıklanabilir: analitler hareketli faza sadece kısa bir an maruz kalırken, sabit faz düşük pH eluenti ile sürekli olarak dengelenir. Sonuç olarak, sabit faz tamamen protonlanmış ve oldukça katyonik hale gelirken, analitler kısmen protonlanmamış amino gruplarını koruyabilir. Bu dengesizlik, nötr analit bölgeleri ile güçlü katyonik sabit yüzey arasındaki iyon-dipol etkileşimlerini artırır ve böylece pH 3.0'da alıkonmayı bir kez daha artırır.

Sonuç olarak, THMA-Mix-SP sabit fazı açık bir şekilde karışık mod davranışı sergiler: yüksek organik koşullar altında güçlü HILIC alıkonması ve su baskın olduğunda ters faz benzeri özellikler sağlar. Ancak, gözlemlenen alıkonma kalıpları tek başına bu mekanizmalardan biriyle tam olarak açıklanamaz. Hem HILIC hem de RPLC koşulları altındaki elüsyon düzenleri, yalnızca logD veya polariteye dayalı klasik beklentilerden sapar. Bu tutarsızlık, alıkonmanın daha karmaşık bir etkileşim etkileşimi tarafından yönetildiğini düşündürmektedir. Önceki bölümde tartışıldığı gibi, birkaç analitler (özellikle guanin, guanozin, sitozin ve sitidin) hidrojen bağı, dipol etkileşimleri ve çözünürlüğe bağlı bölümlenmeyi içeren çok noktalı bağlanmaya izin

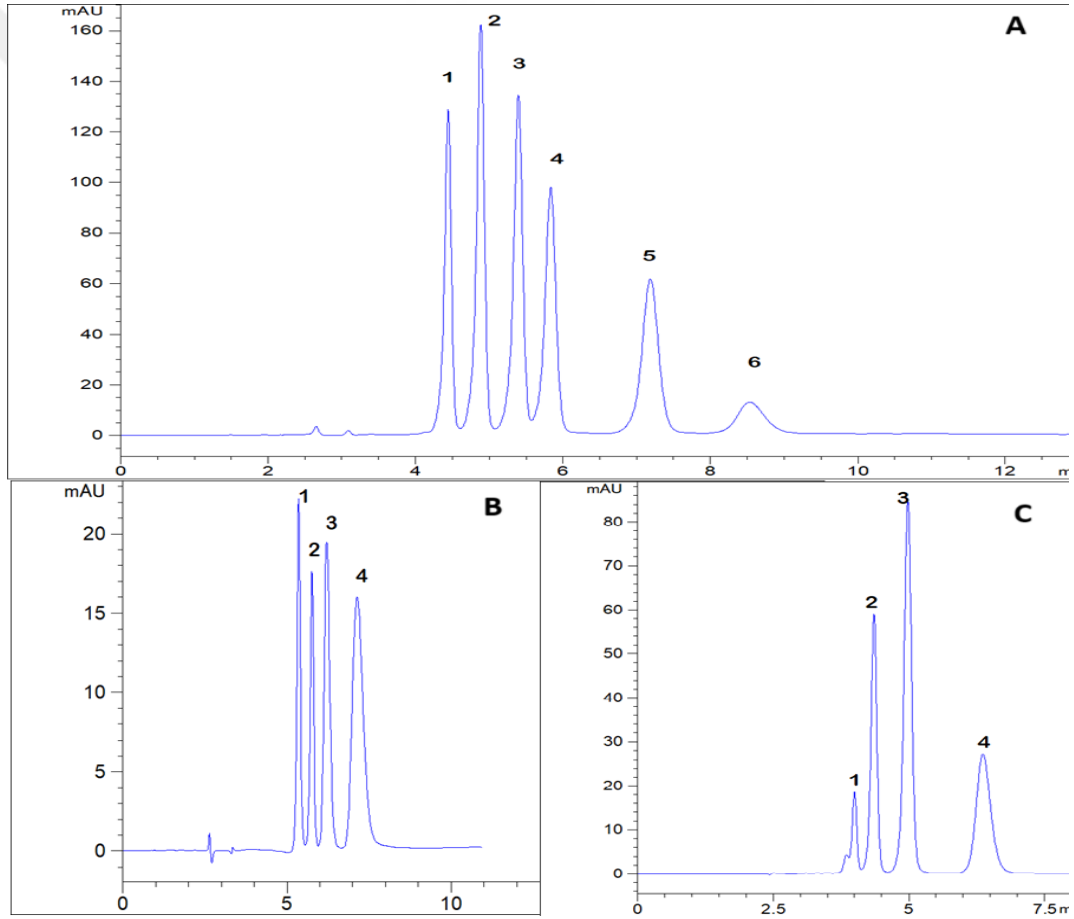
veren yapısal motifleri paylaşır. THMA ligandındaki polar grupların (hidroksiller ve protonlanmış aminler) ve orta düzeyde hidrofobik kısımların bir arada bulunması, hem hidrofilik hem de hidrofobik alanların aynı anda katkıda bulunduğu bir hibrit etkileşim ortamını daha da destekler. Bu nedenle, THMA-Mix-SP üzerindeki nükleobazlar ve nükleozitlerin alıkonma mekanizması tek bir kromatografik mod içinde sınıflandırılmaz, bunun yerine fazın gerçek karışık mod karakterini yansıtan dinamik ve çok boyutlu bir yüzey-analit etkileşim ağından kaynaklanır.



Şekil 4.5. Mobil faz içeriğinin (A) ve pH'nın (B) THMA-Mix sabit fazında nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: (A) ACN/su, 1,0 mL/dak, 20 °C, (B) ACN/tampon:90/10 (10 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1,0 mL/dak, 20 °C, 2 µL, 265 nm. Analitler: 1; timin, 2; urasil, 3; uridin, 4; adenosin, 5; adenin, 6; sitozin, 7; sitidin, 8; guanin, 9; guanozin.

4.3.2. Hidrofobik bileşiklerin ters faz alıkonma davranışının değerlendirilmesi

THMA-Mix-SP sabit fazının ters faz yeteneklerini değerlendirmek için, alkilbenzenler (A), Sudan boyaları (B) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) (C) dahil olmak üzere bir dizi hidrofobik analit, sulu zengin elüsyon koşulları altında kromatografik olarak değerlendirildi. Bu bileşik sınıfları kesinlikle polar değildir ve bu nedenle sabit faz ile öncelikli olarak hidrofobik etkileşimler yoluyla etkileşime girmeleri beklenir. THMA-Mix-SP'deki tris(hidroksimetil)aminometan işlevselliğinin hidrofilik doğasına rağmen, sikloheksil ve metilen kısımlarının varlığı önemli ters faz benzeri davranışa izin verir.



Şekil 4.6. (A) alkilbenzenlerin, (B) Sudan Boyalarının ve (C) THMA-Mix SP'de PAH'ların ayrılması. Koşullar: (A): ACN/su: 33/67, 1ml/dk, 20 OC, 1,5 µL, 210 nm. Analitler: 1; benzen, 2; toluen, 3; etilbenzen, 4; kümen, 5; bütılbenzen, 6; Pentılbenzen. (B): ACN/su gradyanı: 35/65-70/30, 0-10 dk., 1 ml/dk, 40 OC, 2 µl, 520 nm. Analitler: 1; Sudan I, 2; Sudan II, 3; Sudan III, 4; Sudan IV. (C): ACN/su: 41/59, 20 OC, 1 ml/dk, 254 nm, 1,5 µl. Analitler: 1; Naftalin, 2; Floren, 3; Antrasen, 4; Benzantrasen.

Analit alıkonma süreleri ile ilgili logD değerleri arasında, tipik ters faz alıkonma davranışıyla tutarlı, güçlü bir korelasyon gözlemlendi. Alkilbenzenler için (Şekil 4.6-A), elüsyon sırası kesinlikle artan hidrofobisiteyi takip etti: benzen (logD: 1,97) < toluen (2,49) < etilbenzen (2,93) < kümen (3,22) < bütilbenzen (3,82) < pentilbenzen (4,26). Benzer şekilde, PAH'lar için (Şekil 4.6-C), analitler naftalin (2,96) < floren (3,74) < antrasen (3,95) < benzantrasen (4,95) sırasıyla elüe edildi. Sudan boyaları (Şekil 4.6-B) da bu eğilime uydu ve artan alkil zincir uzunlukları ve logD değerleriyle uyumlu olarak alıkonma Sudan I'den (4,32) Sudan IV'e (6,32) doğru arttı. Tüm üç analit grubunda logD'ye bağlı bu monotonik alıkonma davranışı, THMA-Mix-SP'nin polar olmayan bileşiklerle etkileşime girdiğinde net bir ters faz seçiciliğiyle performans gösterdiğini göstermektedir.

Hidrofobik seçiciliğinin ötesinde, kolon yüksek teorik plaka sayıları (N/m) ve neredeyse ideal asimetri faktörleri (As) ile yansıtıldığı gibi etkileyici kromatografik performans göstermiştir. Örneğin, alkilbenzen grubunda, benzen ve toluen sırasıyla 1,27 ve 1,25 As değerleriyle 43.000 N/m'yi aşan plaka sayıları üretmiştir; bu da mükemmel pik keskinliği ve simetriyi vurgulamaktadır. Sudan III (logD: 5,41) gibi geç elüsyonlu hidrofobik boyalar için bile, asimetri faktörü kabul edilebilir aralıkta kalmıştır (As: 0,82), bu da kolonun analit boyutuna ve alıkonma gücüne rağmen verimliliğinin altını çizmektedir.

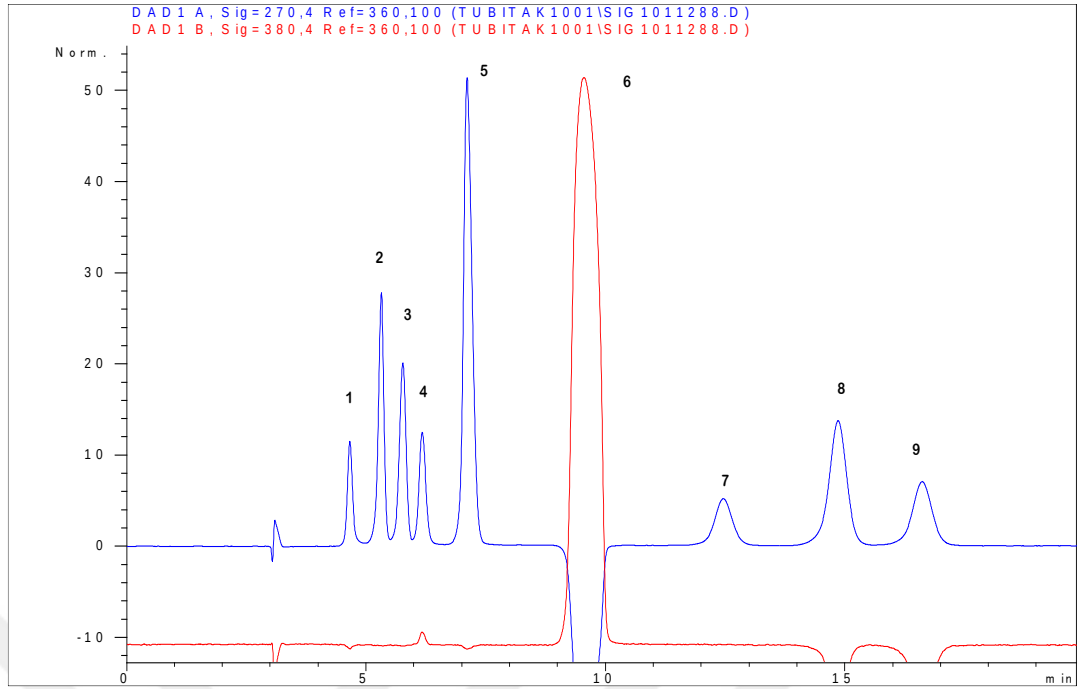
Tüm analit gruplarında, As değerleri 1.0'a yakın seyretti ve bu da minimum tepe kuyruğu ve optimum etkileşim kinetiği olduğunu gösteriyor. Bu performans, THMA-Mix-SP'nin, tasarımında doğası gereği polar olmasına rağmen, polar olmayan hedeflerin klasik RPLC ayrımları için uygun sağlam ve etkili bir hidrofobik etkileşim platformu sağladığını doğruluyor. Bu çalışmadaki tüm analitlerin alıkonması yalnızca hidrofobik etkileşimlere atfedilebilir. Bu analitler iyonize edilebilir veya oldukça polar fonksiyonel gruplardan yoksundur, bu nedenle elektrostatik veya HILIC tipi katkılar hariçtir. Bu, sabit fazın ters faz kapasitesinin odaklanmış bir değerlendirmesine olanak tanır. Üç farklı hidrofobik bileşik sınıfında gözlemlenen ayırma özellikleri, THMA-Mix-SP fazı içinde yeterince polar olmayan bir ortamın varlığını doğrular; büyük olasılıkla ligand tasarımında bulunan sikloheksil halkasından ve alifatik bağlayıcılardan kaynaklanmaktadır.

Genel olarak, sonuçlar THMA-Mix-SP sabit fazının apolar analitlerin yüksek verimlilik ve mükemmel tepe morfolojisiyle ters faz ayırımını desteklediğini açıkça göstermektedir. Alıkonma düzeni ile logD değerleri arasındaki güçlü uyum, bu

sistemlerde hidrofobik etkileşimlerin baskınlığını doğrulamaktadır. Analit aralığındaki yüksek N/m ve düşük As değerleri, kolonun kromatografik bütünlüğünü daha da doğrulamaktadır. Bu bulgular, hidrofilik karakterine rağmen hidrofobik analitlerle etkileşime girdiğinde oldukça etkili ters faz davranışı gösteren THMA-Mix-SP'nin ikili işlevselliğini topluca vurgulamaktadır.

4.3.3. Orta polar bileşiklerin değerlendirilmesi: süstitüe Fenoller ve Anilinler

Süstitüe fenoller ve anilinler, farmasötik, çevresel ve sentetik kimya bağlamlarında sıklıkla karşılaşılan iki önemli orta polar, zayıf asidik veya bazik aromatik bileşik sınıfını temsil eder. Her iki sınıf da çeşitli elektron veren veya elektron çeken ikame edicilerden ve hidrojen bağlama potansiyeli ve sterik özelliklerdeki farklılıklardan kaynaklanan önemli yapısal çeşitlilik gösterir. Paylaşılan aromatik çekirdeğe rağmen, hidroksil, amino, nitro, aldehit ve alkil grupları gibi ikame edicilerin belirgin elektronik ve polarite değiştirici etkileri, kromatografik davranışlarda geniş bir değişkenliğe neden olur. Bu, bunların toplu olarak ayrılmasını özellikle zorlaştırır. THMA-Mix-SP sabit fazı, izokratik (fenoller) ve gradyan (anilinler) elüsyon koşulları altında her iki grubu ayırmada sağlam bir performans göstererek, karmaşık orta polar analit karışımları için uygulanabilirliğini vurgular. Şekil 4.7'de gösterildiği gibi, tüm dokuz ikame edilmiş fenol, %15 ACN ve %85 sudan oluşan bir mobil faz kullanılarak izokratik koşullar altında 17 dakika içinde başarıyla ayrıldı. Bu performans, analitlerin ara polaritesi ve yapısal benzerliği göz önüne alındığında dikkate değerdir. Kolon, yüksek polariteli aminofenollerden daha hidrofobik naftol türevlerine kadar değişen erken ve geç elüsyonlu bileşikler arasında net bir temel çözünürlük sağladı. Tutma parametreleri (Tablo Ek-27'deki N/m ve As değerleri), her bileşik için minimum tepe kuyruğu ve yeterli teorik plaka sayısı (36.000'e kadar) gözlemlenerek kromatografik verimliliği daha da desteklemektedir.



Şekil 4.7. THMA-Mix SP'de Sübstitüe fenollerin ayrılması. Koşullar: ACN/su: 15/85, 30 0C, 1 ml/dak, 270 ve 380 nm, 5 µl. Analitler: 1: 2-Aminofenol, 2: Fenol, 3: o-3-Metoksi fenol, 4: Salisilaldehit, 5; Siyano fenol, 6; Nitrofenol, 7: ter-bütilfenol, 8: 1- Naftol, 9: 2-Naftol

Alıkonma mekanizmasına ilişkin olarak, deneysel elüsyon sırasının hesaplanan logD ve pKa değerleriyle karşılaştırılması (Tablo Ek-27), istisnalar olmasa da genel olarak ters faz benzeri bir davranış ortaya koymaktadır. Örneğin, 2-aminofenol (logD: 0,84) ilk elüe edilmiş, ardından fenol (1,67), 3-metoksifenol (1,51) ve salisilaldehit (2,03) gelmiştir. Bu analitler, klasik RPLC beklentileriyle tutarlı olan logD değerleriyle orantılı bir alıkonma artışı göstermektedir. Ancak, güçlü elektron çeken ikame edicilere veya yüksek polariteye sahip analitlerde daha önemli sapmalar meydana gelmektedir. Özellikle, 4-nitrofenol ve 4-siyanofenol, nispeten yüksek hidrofilikliklerine rağmen belirgin şekilde erken elüsyon göstermektedir. 4-Nitrofenolün logD değeri -0,21 ve pKa değeri 7,07 iken, 4-siyanofenolün logD değeri 1,51 ve pKa değeri 7,81'dir. Bu değerler, her iki bileşiğin de uygulanan koşullar altında ($\text{pH} \approx 5-6$) kısmen iyonize formlarda var olabileceğini, hidrofobik sabit faz için afinitelerini azalttığını ve sulu hareketli fazdaki çözünürlüklerini arttırdığını göstermektedir. Ek olarak, güçlü elektron çeken nitro ve siyano grupları, çözücü ile polariteyi ve hidrojen bağı oluşturma potansiyelini artırabilir ve bu da erken elüsyona daha fazla katkıda bulunabilir. Alıkonma davranışları hidrofobisite eğilimlerinden sapmaktadır ve elektrostatik etkilerin ve solvasyonun baskın olabileceğini göstermektedir. Diğer uçta, 4-tert-bütilfenol (logD: 3.21), 1-naftol (2.66) ve 2-naftol (2.66) gibi hacimli ve daha az polar moleküller, daha güçlü

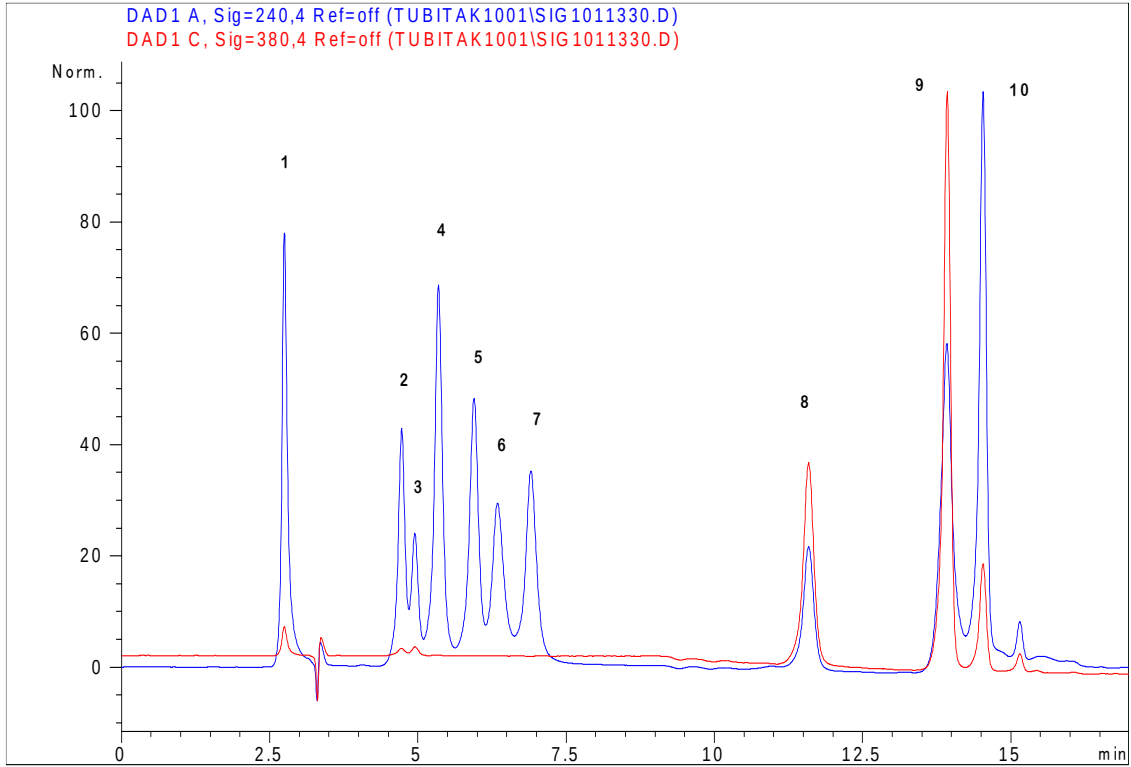
hidrofobik etkileşimleriyle uyumlu olarak önemli ölçüde daha sonra elüe olmuştur. İlginçtir ki, 2-naftol, muhtemelen moleküler yönelimdeki farklılıklar, sterik engel veya aromatik sabit fazla π - π istifleme etkileşimleri nedeniyle, aynı logD değerlerine rağmen 1-naftolden sonra elüsyona uğramıştır. 4-tert-butilfenoldeki tert-bütıl grubu ayrıca hidrofobik bölünmeyi artırabilir ve elüsyonu geciktirebilir.

Bu gözlemler, THMA-Mix-SP üzerindeki süstitüe fenollerin alıkonma mekanizmasının tek bir etkileşim modu ile açıklanamayacağını doğrulamaktadır. Hidrofobisite (logD) genel eğilimlerle iyi bir korelasyon gösterirken, iyonize edilebilir gruplar (pKa'da yansıtıldığı gibi), hidrojen bağlama potansiyeli ve dipol karakteri tarafından getirilen sapmalar ek kuvvetlerin katkısını ortaya koymaktadır. THMA ligandının polar işlevsellikleri (çoklu hidroksil grupları ve protonlanmış bir amin) hidrojen bağı ve zayıf iyon değışim etkileşimlerini mümkün kılar ve bu da hidrofobik etkilerle birlikte gerçek bir karışık mod ortamı yaratır.

Gradyan elüsyon koşulları altında on süstitüe anilinin (Şekil 4.8.) kromatografik davranışı, THMA-Mix-SP sabit fazının alıkonma özelliklerini daha fazla değılendirmek için incelendi. Alıkonma sırası, ters faz davranışını gösteren artan logD değıleriyle genel bir korelasyon gösterdi; ancak, bu eğilimden sapmalar diğere etkileşim mekanizmalarının katkısını ortaya koydu. En erken elüsyon yapan bileşikler - 4-aminoanilin (logD: -1.09), 2-aminoanilin (0.13) ve anilin (0.99) - serideki en polar olanlardır, yüksek sulu çözünürlükleri ve sabit fazın hidrofobik bölgelerine nispeten düşük afiniteleriyle tutarlıdır. Bu analitler, orta düzeyde bazikliğe sahip serbest amino grupları içerir (pKa1 değıleri 0.56 ile 4.64 arasındadır), bunlar muhtemelen deneysel pH 5.0'da protonlanır ve sabit faz ile hidrojen bağı ve dipolar etkileşim potansiyellerini azaltır. Orta düzeyde alıkonma sürelerine sahip analitler—3-aminoasetanilid (logD: 0,34), o-toluidin (1,54) ve p-toluidin (1,37)) artan logD değıleri gösterdi ve bu da gelişmiş hidrofobik bölümlenmeyi önerdi. Özellikle, p-toluidin ve o-toluidin ayrıca iyonik veya hidrojen bağı oluşturmaya katkıda bulunmadan hidrofobisitelerini hafifçe artıran metil gruplarına sahiptir. Bu grup beklenen ters faz eğilimini daha yakından takip etti. Saf hidrofobik davranıştan sapmalar, daha sonra elüe edilen analitler arasında daha belirgin hale geldi.

Benzer veya biraz daha yüksek logD değılerine (1,67–2,33) sahip olmalarına rağmen, 2,4-dinitroanilin, 2-kloro-4-nitroanilin ve 4-kloro-2-nitroanilin nispeten geç elüe edildi. Gecikmeli elüsyonları yalnızca hidrofobisite ile tam olarak açıklanamaz. Bunun yerine, elektron çeken ikameleri ($-\text{NO}_2$, $-\text{Cl}$) pKa değılerini önemli ölçüde

düşürür (−0,81 ila 0,86), tamponlanmış koşullar altında protonlanmayı baskılayabilir ve THMA yüzeyi ile daha güçlü polar veya π – π etkileşimlerini teşvik edebilir. Bu etkiler, sterik hacim ve artırılmış dipolarite ile birleştiğinde, tek başına logD ile tahmin edilenlerin ötesinde ek tutma katkılarına yol açar. Son olarak, serideki en hidrofobik analit olan 4-bütilanilin (logD: 2,73), ters faz beklentileriyle tamamen uyumlu olarak en son elüe edildi. İyonize edilebilir veya güçlü polar grupların eksikliği, düşük sulu çözünürlük ve yüksek logD ile birleştiğinde, THMA-Mix-SP sabit fazının hidrofobik alanına güçlü bir şekilde bölünmeyi teşvik eder.



Şekil 4.8. THMA-Mix SP'de Anilinlerin Ayrılması. Koşullar: Sulu tampondaki ACN gradyanı (pH:5.00, 10 mM, Amonyum asetat): %3; 0-5 dak, %40; 5-15 dak, 1 ml/dak., 20 °C, 2 μ l, 240 ve 380 nm

Genel olarak, gradyan koşulları altında sübstitüe anilinlerin alıkonma örüntüsü, hem hidrofobisitenin hem de elektronik faktörlerin (örn. pKa, dipol momentleri) alıkonma katkıda bulunduğunu gösterir. Hem hidroksil grupları hem de protonlanmış bir amin taşıyan THMA-fonksiyonelleştirilmiş yüzeyin karışık modlu yapısı, hidrojen bağı, dipol-dipol ve hidrofobik etkileşimlerde eş zamanlı etkileşimi mümkün kılar. Bu çok yönlü yüzey kimyası, fazın örtüşen polarite aralıklarına sahip ancak farklı sübstitüe örüntülerine sahip çeşitli analitleri barındırmasını sağlar.

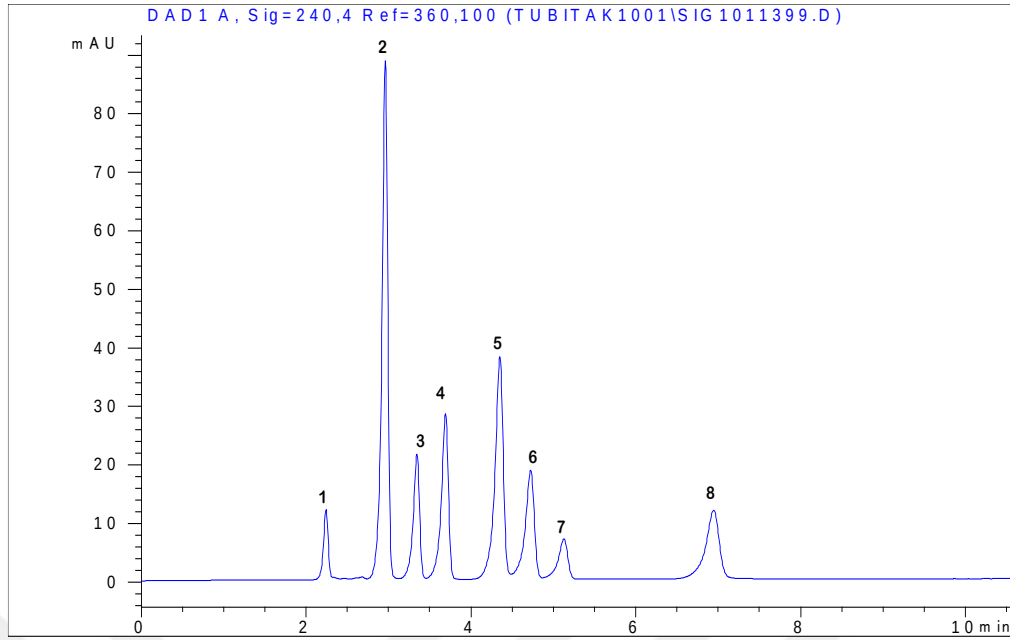
Sonuç olarak, THMA-Mix-SP sabit fazı kullanılarak yapısal olarak çeşitli sübstitüe fenollerin ve anilinlerin başarılı bir şekilde çözülmesi, değişen elüsyon rejimleri altında orta polar analit sınıflarını işleme konusundaki güçlü kapasitesini

vurgular. Her iki bileşik grubu da artan logD ile ilişkili olarak genel ters faz alıkonma eğilimleri sergilerken, iyonize edilebilir süstitüe ve hidrojen bağı oluşturma yeteneği tarafından getirilen belirgin sapmalar, fazın karışık modlu karakterini vurgular. Hidroksil açısından zengin polar bölgeler ve protonlanmış bir amin bölgesi içeren THMA yüzeyi, hidrojen bağı, dipol etkileşimleri ve hidrofobik bölümlere dahil olmak üzere çok noktalı etkileşimleri kolaylaştırır. Bu bulgular, süstitüe fenollerin ve anilinlerin alıkonmasının tamamlayıcı kuvvetlerin dinamik bir etkileşimi tarafından yönetildiğini doğrular ve THMA-Mix-SP'yi orta aralık polaritesine sahip karmaşık aromatik bileşikler için oldukça etkili bir sabit faz haline getirir.

4.3.4. Benzoik asit türevlerinin IEX alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi

Bir veya daha fazla karboksil grubu ve çeşitli elektron çeken veya veren süstitüe analitler taşıyan benzoik asit ve türevleri, hafif bazik koşullar altında deprotonlanmış (anyonik) formlarında var olabilen zayıf asidik bileşiklerdir. 7,5'lik çalışma pH'ında, incelenen asitlerin pKa değerleri (1,57 ila 4,77 arasında değişir), tüm analitlerin tamamen veya neredeyse tamamen iyonize olduğunu ve negatif yükler taşıdığını gösterir. Bu, onları, protonlama yeteneğine sahip birincil bir amin grubu (pKa $\approx$ 6,0) içeren ve böylece zayıf anyon değişimi (WAX) davranışı gösteren THMA-Mix sabit fazının iyon değişim kapasitesini değerlendirmek için oldukça uygun problemler haline getirir.

Tüm sekiz benzoik asit türevi 7 dakikadan kısa bir sürede başarıyla ayrıldı (Şekil 4.9), bu da kolonun yüksek ayırma verimliliğini göstermektedir. Çoğu bileşik için teorik plaka sayıları belirgin şekilde yüksekti ve birkaç analit için 40.000'i aştı (örneğin, 3-metilbenzoik asit (3-MethylBA): 40.500 N/m; 4-aminobenzoik asit (4-AminoBA): 40.800 N/m; sülfanilik asit (SulphaA): 41.932 N/m), zirve asimetri faktörleri ise 1,4-1,5'e yakın kaldı ve bu da keskin, simetrik elüsyonu gösteriyordu. Bu parametreler toplu olarak THMA-Mix fazının farklı fizikokimyasal özelliklere sahip anyonik bileşikleri ayırmak için kararlı ve etkili bir platform sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.9. Optimum koşullar altında THMA-Mix SP üzerinde benzoik asitlerin ayrılması.
Koşullar: ACN/Tampon (pH: 7,5, 20 mM, fosfat): 80/20, 1 mL/dak., 25 oC, 2 µL, 240 nm,
Analitler: Analitler: 1: 3,5-DNS, 2: 3,5-DNB, 3: 4-Nitrobenzoik asit, 4: Salisilik asit, 5: Sülfanil asit, 6: 3-Metil benzoik asit, 7: Benzoik asit, 8: 4-AminoBA

Alıkonma sırası logD değerleriyle (hidrofobisiteyi temsil eder) karşılaştırıldığında genel bir eğilim gözlemlenir: daha hidrofilik (daha düşük logD) analitler daha erken elüe olma eğilimindedir ve bu da yüksek sulu koşullar altında ters faz (RPLC) davranışının bastırılmasıyla tutarlıdır. Örneğin, en düşük logD'ye (–3.49) sahip 3,5-dinitrosalisilik asit (3,5-DNS) ilk elüe olurken, setin en az polar bileşiği olan 3-metilBA (logD: –1.02) en son elüe oldu. Ancak, alıkonma davranışı yalnızca logD değerleri tarafından yönetilmez. Örneğin, 4-nitrobenzoik asit (4-NitroBA) (logD: –1.87), biraz daha hidrofobik olmasına rağmen, SulphaA'dan (logD: –2.01) sonra elüe oldu. Bu tutarsızlık, analit yük yoğunluğu, ikame deseni ve potansiyel hidrojen bağı kapasitesi gibi ek faktörlerin önemini vurgular. pKa değerleri de alıkonma mekanizmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. 3,5-DNS (pKa₁ = 1.57) gibi daha düşük pKa değerlerine sahip analitler, ağırlıklı olarak dianyonlar olarak bulunur veya pH 7.5'te daha yüksek bir yük yoğunluğu taşır. Bu türler, elektrostatik çekim yoluyla THMA-Mix fazının pozitif yüklü bölgeleriyle daha güçlü bir şekilde etkileşime girer, ancak yüksek polariteleri ve suda çözünürlükleri, hareketli faza bölünmeyi destekler ve erken elüsyona yol açar. Öte yandan, 4-aminoBA (pKa = 4.77) ve 3-metilBA (pKa = 4.26) gibi analitler, tamamen deprotonlanmış olsalar da, nispeten daha düşük yük yoğunluğu ve daha yüksek hidrofobisite taşırlar ve bu da alıkonmalarını artırır. Bu

nedenle elüsyon sırası, hidrofobik alıkonma ve iyonik etkileşim arasındaki ince bir dengeye dayanır.

Salisilik asit (SalA) (SalA, logD: -1.52; pKa = 2.79) ve 3,5-dinitrobenzoik asit (3,5-DNB, logD: -1.99; pKa = 2.86) gibi analitler açıklayıcı karşıtlıklar sağlar. 3,5-DNB daha polar olmasına rağmen, 3,5-DNS'den hemen sonra elüe olurken, SalA daha sonra elüe oldu; bu muhtemelen molekül içi hidrojen bağı veya daha düşük yük yoğunluğu nedeniyledir. SulphaA (logD: -2.01; pKa = 3.39), muhtemelen sülfonik asit grubu ile sabit faz arasındaki ek elektrostatik etkileşimler nedeniyle, 4-nitrodan (logD: -1.87; pKa = 3.3) daha güçlü bir tutma gösterdi.

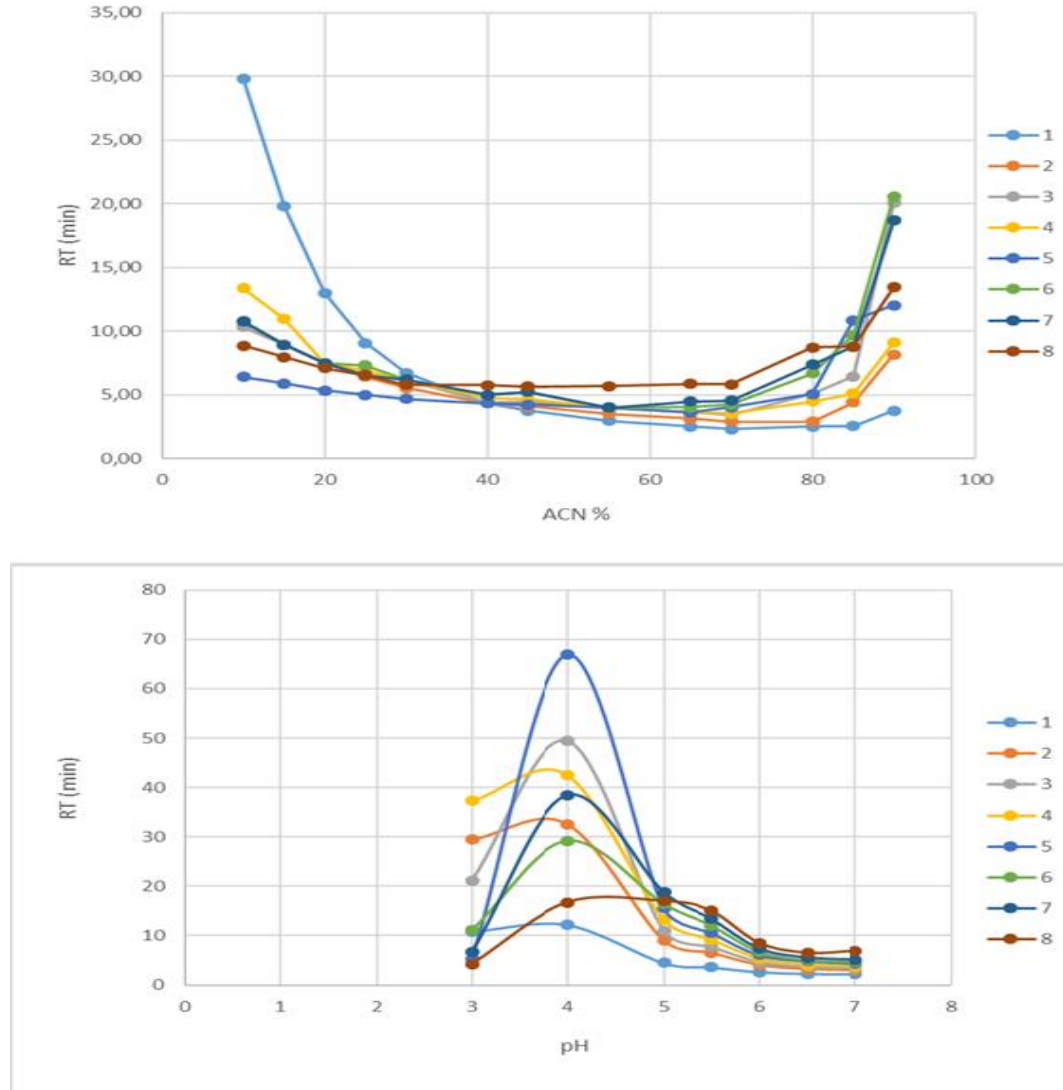
Sonuç olarak, THMA-Mix kolonunda benzoik asit türevlerinin ayrılması, çok modlu bir alıkonma mekanizması tarafından yönetilir. Hidrofobisite (logD) ve asidite (pKa) her ikisi de önemli roller oynarken, hiçbiri tek başına elüsyon sırasını tam olarak açıklayamaz. Sabit fazın protonlanmış amin grubu, anyonik türlerle elektrostatik olarak etkileşime girerek zayıf anyon değişim davranışının varlığını doğrular. Aynı zamanda, polar ve hidrojen bağı etkileşimleri karmaşık bir tutma manzarasına katkıda bulunur. Bu bulgular toplu olarak, THMA-Mix sabit fazının, zayıf anyon değişimi, hidrofilik etkileşim ve hidrojen bağının yapısal olarak çeşitli asidik analitleri çözmek için birlikte hareket ettiği sağlam bir karışık mod ayırma platformu sağladığını doğrular.

4.3.4.1. Mobil faz kompozisyonu ve Ph'ın Benzoik asitlerin alıkonma davranışları üzerindeki etkisi

Mobil faz bileşiminin ve pH'ın etkilerini anlamak, THMA-Mix SP sabit fazında çalışan karışık mod alıkonma mekanizmalarını açıklamak için kritik öneme sahiptir. Bu parametreler doğrudan analit iyonlaşmasını, çözünürlüğünü ve sabit faz ile etkileşimini belirler ve böylece alıkonma davranışlarını şekillendirir. Benzoik asit türevleri için (pKa değerleri 1,5 ila 5,0 arasında değişen zayıf asitler) bu etkileşimler hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve iyon değişim mekanizmaları yoluyla ortaya çıkar.

Şekil 4.10'da gözlemlenen U şeklindeki çözücü etki eğrisi, bu karışık mod mekanizmalarının açık bir kanıtıdır. ACN içeriği yüksek olduğunda (> %70), mobil faz daha az su içerir ve HILIC benzeri koşulları teşvik eder. Bu bölgede, azaltılmış su içeriği bazı analitlerin iyonize fraksiyonunu düşürerek sabit faz ile elektrostatik etkileşimlerini zayıflatır. 3,5-DNS (1), 3,5-DNB (2) ve Salisilik Asit (3) gibi analitler—düşük pKa değerlerine sahip ve dolayısıyla pH 6,5'te tamamen anyoniktir—ACN

arttıkça daha erken elüe olmuştur. Bu, yüksek logS ve düşük logD değerlerinin hem ACN'de hem de sulu tamponda iyi çözünmelerine izin verdiğini ve bunun sonucunda HILIC koşulları altında minimum alıkonma ve hızlı elüe olma ile sonuçlandığını gösterir. Buna karşılık, iyonizasyona sulu katkının daha baskın olduğu daha düşük ACN seviyelerinde (daha yüksek su içeriği), durağan faz ile daha güçlü iyonik etkileşimler meydana gelir ve alıkonma sürelerini artırır.



Şekil 4.10. (A) ACN yüzdesinin THMA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi.

Koşullar: (20 mM fosfat tamponları), 1 mL/dak, 25 °C, 2µL, 240 nm. (B). pH'ın THMA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/su (20 mM format, asetat veya fosfat tamponları): 80/20, 1 mL/dak, 2µL, 240 nm. Analitler: 1: 3,5-DNS, 2: 3,5-DNB, 3: 4-Nirobenzoik asit, 4: Salisilik asit, 5: SülfanilikA, 6: 3-Metil benzoik asit, 7: Benzoik asit, 8: 4-AminoBA

Analitlerin %50-60 ACN bölgesinde hızla elüe olması, bunların hem ACN'de hem de pH 6,5 sulu tamponda oldukça çözünür olduğunu gösterir. Bu aralık, analit çözünürlüğünün hem organik hem de sulu bileşenler tarafından en üst düzeye çıkarıldığı optimum bir çözücü bölgesini temsil eder. Ancak, düşük ACN yüzdelerinde önemli ölçüde daha uzun analiz süreleri, bu bileşiklerin baskın olarak apolar karaktere sahip olduğunu ve durağan faz ile daha güçlü etkileşimlere yol açtığını gösterir. Düşük ACN bölgesinde (>%30 su), ters faz benzeri mekanizmalar baskındır. Burada, daha hidrofobik karaktere sahip analitler, durağan fazın uzun alifatik zincirleriyle etkileşimler nedeniyle daha güçlü bir alıkonma sergiler. 3-MethylBA (8), Benzoic Acid (7) ve 4-AminoBA (6) gibi bileşikler bu koşullar altında en son elüe olur. Çalışma pH'ı 6,5'e yakın pKa değerlerine sahip olan bu analitler, durağan faz ile hem iyonik hem de hidrofobik etkileşimler gösterir. pH etkisini gösteren Şekil 4.10-B, durağan fazın iyon değişim kapasitesi hakkında değerli bilgiler sunar. pH 6,0'ın altında, benzoik asitler anyon formundan protonlanmış forma değişmeye başlar ve sudaki çözünürlükleri de hızla azalır. Bu, analiz sürelerinde bir artışa yol açmıştır. Çoğu benzoik asit, analitlerin hem protonlanmış hem de deprotonlanmış formlarda bulunduğu bir bölge olan pH 4,0 civarında maksimum alıkonma göstermiştir. Bu ikilik, eş zamanlı hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimleri mümkün kılarak alıkonmayı artırır.

THMA ligandındaki amin grubunun pKa'sının 6,0 civarında olduğu göz önüne alındığında, sabit faz pH 4,0'da kısmen protonlanmış halde kalır ve deprotonlanmış analitlerle anyon değişim etkileşimlerini destekler. pH 3,0'da, pKa'sı 4,0 civarında olan analitler çoğunlukla nötr formlarındadır ve bu da elektrostatik etkileşimlerin azalmasına ve dolayısıyla daha kısa tutma sürelerine yol açar. Ancak, pH 3'te anyonik kalan 3,5-DNS ve 3,5-DNB gibi daha güçlü asitler, sürekli iyonik etkileşimler nedeniyle güçlü tutma göstermeye devam eder. Ayrıca, pH 6,0 ile 7,5 arasında tutma sürelerinde önemli bir değişiklik olmaması, analit çözünürlüğünün (logS) bu aralıkta maksimuma ulaşmasına bağlanabilir (Şekil Ek-17). logD azalmaya devam etse de, sulu çözünürlük sabit hale gelir ve bu da kararlı alıkonma sürelerine yol açar. Bu, bu pH aralığında, alıkonmanın bölme katsayısından (logD) daha çok çözünürlük (logS) tarafından yönetildiğini gösterir. Sonuç olarak, THMA-Mix SP üzerindeki benzoik asit türevlerinin alıkonma davranışları, çözücü etkilerini, logD/logS ilişkilerini ve pH'a bağlı iyonlaşma durumlarını içeren karışık modlu bir etkileşim mekanizması tarafından yönetilir. U şeklindeki alıkonma profilleri, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve iyonik katkıları içeren bir mekanizmayı destekler. Çan şeklindeki pH alıkonma eğilimleri, özellikle

çalışma pH aralığında iyonik etkileşim için uygun pKa değerlerine sahip analitler için, sabit fazın anyon değişim özelliklerini doğrular.

4.3.5. Benzoik asit türevlerinin IEX alıkonma davranışlarının değerlendirilmesi

Bir veya daha fazla karboksil grubu ve çeşitli elektron çeken veya veren sübstitüe taşıyan benzoik asit ve türevleri, hafif bazik koşullar altında deprotonlanmış (anyonik) formlarında var olabilen zayıf asidik bileşiklerdir. 7,5'lik çalışma pH'ında, incelenen asitlerin pKa değerleri (1,57 ila 4,77 arasında değişir), tüm analitlerin tamamen veya neredeyse tamamen iyonize olduğunu ve negatif yükler taşıdığını gösterir. Bu, onları, protonlama yeteneğine sahip birincil bir amin grubu ($pK_a \approx 6,0$) içeren ve böylece zayıf anyon değişimi (WAX) davranışı gösteren THMA-Mix sabit fazının iyon değişim kapasitesini değerlendirmek için oldukça uygun problemler haline getirir.

Tüm sekiz benzoik asit türevi 7 dakikadan kısa bir sürede başarıyla ayrıldı (Şekil 4.9), bu da kolonun yüksek ayırma verimliliğini göstermektedir. Çoğu bileşik için teorik plaka sayıları belirgin şekilde yüksekti ve birkaç analit için 40.000'i aştı (örneğin, 3-metilbenzoik asit (3-MethylBA): 40.500 N/m; 4-aminobenzoik asit (4-AminoBA): 40.800 N/m; sülfanilik asit (SulphaA): 41.932 N/m), zirve asimetri faktörleri ise 1,4-1,5'e yakın kaldı ve bu da keskin, simetrik elüsyonu gösteriyordu. Bu parametreler toplu olarak THMA-Mix fazının farklı fizikokimyasal özelliklere sahip anyonik bileşikleri ayırmak için kararlı ve etkili bir platform sağladığını göstermektedir.

Alıkonma sırası logD değerleriyle (hidrofobisiteyi temsil eder) karşılaştırıldığında genel bir eğilim gözlemlenir: daha hidrofilik (daha düşük logD) analitler daha erken elüe olma eğilimindedir ve bu da yüksek sulu koşullar altında ters faz (RPLC) davranışının bastırılmasıyla tutarlıdır. Örneğin, en düşük logD'ye (-3.49) sahip 3,5-dinitrosalisilik asit (3,5-DNS) ilk elüe olurken, setin en az polar bileşiği olan 3-metilBA (logD: -1.02) en son elüe oldu. Ancak, alıkonma davranışı yalnızca logD değerleri tarafından yönetilmez. Örneğin, 4-nitrobenzoik asit (4-NitroBA) (logD: -1.87), biraz daha hidrofobik olmasına rağmen, SulphaA'dan (logD: -2.01) sonra elüe oldu. Bu tutarsızlık, analit yük yoğunluğu, sübstitüe deseni ve potansiyel hidrojen bağlama kapasitesi gibi ek faktörlerin önemini vurgular. pKa değerleri de alıkonma mekanizmasına önemli ölçüde katkıda bulundu. 3,5-DNS ($pK_{a1} = 1.57$) gibi daha düşük pKa değerlerine sahip analitler, pH 7.5'te ağırlıklı olarak dianyonlar olarak bulunur veya

daha yüksek bir yük yoğunluğu taşır. Bu türler, elektrostatik çekim yoluyla THMA-Mix fazının pozitif yüklü bölgeleriyle daha güçlü bir şekilde etkileşime girer, ancak yüksek polariteleri ve suda çözünürlükleri, hareketli faza bölünmeyi destekler ve erken elüsyona yol açar. Öte yandan, 4-aminoBA ($pK_a = 4,77$) ve 3-metilBA ($pK_a = 4,26$) gibi analitler, tamamen deprotonlanmış olmalarına rağmen, nispeten daha düşük yük yoğunluğu ve daha yüksek hidrofobisite taşırlar, bu da alıkonmalarını artırır. Bu nedenle elüsyon sırası, hidrofobik alıkonma ve iyonik etkileşim arasındaki ince bir dengeye dayanır. Salisilik asit (SalA) (SalA, $\log D: -1,52$; $pK_a = 2,79$) ve 3,5-dinitrobenzoik asit (3,5-DNB, $\log D: -1,99$; $pK_a = 2,86$) gibi analitler açıklayıcı karşıtlıklar sağlar. 3,5-DNB daha polar olmasına rağmen, 3,5-DNB'den hemen sonra elüe olurken, SalA daha sonra elüe oldu, muhtemelen molekül içi hidrojen bağı veya daha düşük yük yoğunluğu nedeniyle. SulphaA ($\log D: -2,01$; $pK_a = 3,39$), muhtemelen sülfonik asit grubu ile durağan faz arasındaki ek elektrostatik etkileşimler nedeniyle, 4-nitrodan ($\log D: -1,87$; $pK_a = 3,3$) daha güçlü bir tutma gösterdi.

Sonuç olarak, THMA-Mix kolonunda benzoik asit türevlerinin ayrılması, çok modlu bir alıkonma mekanizması tarafından yönetilir. Hidrofobisite ($\log D$) ve asidite (pK_a) her ikisi de önemli roller oynasa da, hiçbirisi tek başına elüsyon sırasını tam olarak açıklayamaz. Durağan fazın protonlanmış amin grubu, anyonik türlerle elektrostatik olarak etkileşime girerek zayıf anyon değişim davranışının varlığını doğrular. Aynı zamanda, polar ve hidrojen bağı etkileşimleri karmaşık bir alıkonma sırasına katkıda bulunur. Bu bulgular toplu olarak, THMA-Mix sabit fazının, zayıf anyon değişimi, hidrofilik etkileşim ve hidrojen bağının yapısal olarak çeşitli asidik analitleri çözmek için birlikte hareket ettiği sağlam bir karma mod ayırma platformu sağladığını doğrulamaktadır.

4.3.5.1. Mobil faz kompozisyonu ve Ph'in Benzoik asitlerin alıkonma davranışları üzerindeki etkisi

Mobil faz bileşiminin ve pH'ın etkilerini anlamak, THMA-Mix SP sabit fazında çalışan karışık mod alıkonma mekanizmalarını açıklamak için kritik öneme sahiptir. Bu parametreler doğrudan analit iyonlaşmasını, çözünürlüğünü ve sabit faz ile etkileşimini belirler ve böylece tutma davranışlarını şekillendirir. Benzoik asit türevleri için (pK_a değerleri 1,5 ila 5,0 arasında değişen zayıf asitler) bu etkileşimler hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve iyon değişim mekanizmaları yoluyla ortaya çıkar. Şekil 4.10'

da gözlemlenen U şeklindeki çözücü etki eğrisi, bu karışık mod mekanizmalarının açık bir kanıtıdır. ACN içeriği yüksek olduğunda ($> \%70$), mobil faz daha az su içerir ve HILIC benzeri koşulları teşvik eder. Bu bölgede, azaltılmış su içeriği bazı analitlerin iyonize fraksiyonunu düşürerek sabit faz ile elektrostatik etkileşimlerini zayıflatır. 3,5-DNS (1), 3,5-DNB (2) ve Salisilik Asit (3) gibi analitler düşük pKa değerlerine sahip ve dolayısıyla pH 6,5'te tamamen anyoniktir. ACN arttıkça daha erken elüe olmuştur. Bu, yüksek logS ve düşük logD değerlerinin hem ACN'de hem de sulu tamponda iyi çözünmelerine izin verdiğini ve bunun sonucunda HILIC koşulları altında minimum alıkonma ve hızlı elüe olma ile sonuçlandığını gösterir. Buna karşılık, iyonizasyona sulu katkının daha baskın olduğu daha düşük ACN seviyelerinde (daha yüksek su içeriği), durağan faz ile daha güçlü iyonik etkileşimler meydana gelir ve alıkonma sürelerini artırır.

Analitlerin %50-60 ACN bölgesinde hızla elüe olması, bunların hem ACN'de hem de pH 6,5 sulu tamponda oldukça çözünür olduğunu gösterir. Bu aralık, analit çözünürlüğünün hem organik hem de sulu bileşenler tarafından en üst düzeye çıkarıldığı optimum bir çözücü bölgesini temsil eder. Ancak, düşük ACN yüzdelğinde önemli ölçüde daha uzun analiz süreleri, bu bileşiklerin baskın olarak apolar karaktere sahip olduğunu ve durağan faz ile daha güçlü etkileşimlere yol açtığını gösterir. Düşük ACN bölgesinde ($>\%30$ su), ters faz benzeri mekanizmalar baskındır. Burada, daha hidrofobik karaktere sahip analitler, durağan fazın uzun alifatik zincirleriyle etkileşimler nedeniyle daha güçlü bir tutma sergiler. 3-MethylBA (8), Benzoic Acid (7) ve 4-AminoBA (6) gibi bileşikler bu koşullar altında en son elüe olur. Çalışma pH'ı 6,5'e yakın pKa değerlerine sahip olan bu analitler, durağan faz ile hem iyonik hem de hidrofobik etkileşimler gösterir. pH etkisini gösteren Şekil 4.10-B, durağan fazın iyon değişim kapasitesi hakkında değerli bilgiler sunar. pH 6,0'ın altında, benzoik asitler anyon formundan protonlanmış forma değişmeye başlar ve sudaki çözünürlükleri de hızla azalır. Bu, analiz sürelerinde bir artışa yol açmıştır. Çoğu benzoik asit, analitlerin hem protonlanmış hem de deprotonlanmış formlarda bulunduğu bir bölge olan pH 4,0 civarında maksimum tutma göstermiştir. Bu ikilik, eş zamanlı hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimleri mümkün kılarak tutmayı artırır. THMA ligandındaki amin grubunun pKa'sının 6,0 civarında olduğu göz önüne alındığında, sabit faz pH 4,0'da kısmen protonlanmış halde kalır ve deprotonlanmış analitlerle anyon değişim etkileşimlerini destekler. pH 3,0'da, pKa'sı 4,0 civarında olan analitler çoğunlukla nötr formlarındadır ve bu da elektrostatik etkileşimlerin azalmasına ve dolayısıyla daha kısa

alıkonma sürelerine yol açar. Ancak, pH 3'te anyonik kalan 3,5-DNS ve 3,5-DNB gibi daha güçlü asitler, sürekli iyonik etkileşimler nedeniyle güçlü tutma göstermeye devam eder. Ayrıca, pH 6,0 ile 7,5 arasında tutma sürelerinde önemli bir değişiklik olmaması, analit çözünürlüğünün (logS) bu aralıkta maksimuma ulaşmasına bağlanabilir (Ek-17). logD azalmaya devam etse de, sulu çözünürlük sabit hale gelir ve bu da kararlı tutma sürelerine yol açar. Bu, bu pH aralığında, alıkonmanın bölme katsayısından (logD) daha çok çözünürlük (logS) tarafından yönetildiğini gösterir.

Sonuç olarak, THMA-Mix SP üzerindeki benzoik asit türevlerinin alıkonma davranışları, çözücü etkilerini, logD/logS ilişkilerini ve pH'a bağlı iyonlaşma durumlarını içeren karışık modlu bir etkileşim mekanizması tarafından yönetilir. U şeklindeki alıkonma profilleri, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve iyonik katkıları içeren bir mekanizmayı destekler. Çan şeklindeki pH alıkonma eğilimleri, özellikle çalışma pH aralığında iyonik etkileşim için uygun pKa değerlerine sahip analitler için, sabit fazın anyon değişim özelliklerini doğrular.

4.6. Tekrarlanabilirlik ve stabilite performansının değerlendirilmesi

Adenin'i bir prob olarak kullanarak gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik (Tablo 4.2) ve kararlılık (Tablo 4.3) testleri, THMA-Mix-SP sabit fazının zaman içinde kararlı ayırma performansını koruduğunu göstermektedir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında (başlangıç, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 24 saat ve 48 saat), kromatogramlar ve Tablo 4.2'de verileri, tutma sürelerinde (%RSD = 0,37) ve korunan pik şeklinde önemli bir kayma göstermemektedir ve bu da kolonun aktif yüzey bölgelerinin değişmeden kaldığını ve analitik koşullar altında sürekli olarak güvenilir sonuçlar sağladığını göstermektedir.

Tablo 4.2. THMA-Mix-SP için tekrarlanabilirlik çalışmaları

Probe	Tekrar Sayısı							%RSD
	İlk	2 saat	4 saat	6 saat	24 saat	48 saat	Ortalama	
Adenin	14,69	14,62	14,65	14,55	14,47	14,42	14,57	0,37

Kararlılık testleri, kolonun performansını uzun süreli kullanımdan (iki ay) ve yüksek pH'a (pH 9,0, 24 saat) maruz kaldıktan sonra değerlendirmiştir (Tablo 4.3) . Bu

iki aylık süre boyunca, kolon yaklaşık 10.000 kolon hacminde çeşitli çözücülere, pH'ı 3 ila 8 arasında değişen hareketli fazlara maruz bırakılmış ve 400'den fazla analiz gerçekleştirilmiştir. İki ay sonra, adenin alıkonma süresinde yalnızca hafif bir azalma gözlemlendi (14,31 dakikadan 14,18 dakikaya), bu da durağan fazın kimyasal yapısının büyük ölçüde korunduğunu gösteriyor. Yüksek pH stresine maruz kalan kolon için alıkonma süresi hafifçe azaldı (13,55 dakika); bu, durağan fazın hidrojen bağlarında ve ya iyonik etkileşim bölgelerinde küçük bir değişiklik olduğunu gösterse de, bu değişiklik önemli değildir ve tepe asimetrisi (As) veya teorik plaka sayısı (N) üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmamıştır.

Tablo 4.3. THMA-Mix-SP için kararlılık testleri

Probe/	Alıkonma süreleri (dk)		
	ilk	2 Ay sonra	pH 9.0 için 24 saat
Adenin	14,31	14,18	13,55

Genel olarak, bu sonuçlar THMA-Mix-SP durağan fazının hem kısa süreli tekrarlanan analizlerde hem de değişen pH değerlerine sahip gerçekçi uzun süreli koşullar altında oldukça tekrarlanabilir ve dayanıklı bir performans sağladığını göstermektedir. Bu özellikler, karmaşık matrisler için bir analitik platform olarak güvenilirliğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

4.7.THMA-Mix SP'nin ACE C18 ve Kromasil-Aminopropil SP'lerle ayırma performansının karşılaştırılması

Yeni geliştirilen THMA-Mix-SP sabit fazının ayırma performansı, HILIC modu için laboratuvarda hazırlanmış bir aminopropil silika sabit fazı (Kromasil-amino kolonu) ve RPLC modu için ticari olarak temin edilebilen bir ACE C18 kolonu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Amino silika kolonları ticari olarak yaygın olarak temin edilebilir ve uzun yıllardır etkili HILIC kolonları olarak başarıyla kullanılmıştır. Amino grubunun güçlü bazikliği nedeniyle (yaklaşık 3'lük bir pK_b değeri ile), kararlı bir katyonik yapı oluşturmak için kolayca protonlanırlar ve güçlü bir anyon değişim etkisi sağlarlar. Bu nedenle, yeni geliştirilen karışık mod kolonumuzun ayırma performansını bir amino kolonu ile karşılaştırmak, HILIC modundaki performansını göstermek için oldukça anlamlıdır. Kromasil-amino kolonu, Kromasil silika jele bağlanmış 3-

aminopropil trimetoksi silan kullanılarak şirket içinde sentezlendi ve daha sonra yukarıdaki prosedüre göre paketlenildi. Kromasil-amino kolonu nükleobazlar/nükleozitler için kullanılırken, ACE C18 kolonu diğer tüm analit grupları için karşılaştırma amacıyla kullanıldı.

THMA-Mix-SP'nin HILIC ayırma performansını karşılaştırmak için, dokuz nükleobaz/nükleozit karışımı Kromasil-amino kolonunda ayrıldı. EK-22'da gösterildiği gibi, bir SU/ACN (25/25, v/v) mobil faz sistemi kullanılarak, sekiz analit 22 dakikalık bir çalışma içinde tamamen çözüldü. Buna karşılık, THMA-Mix-SP, 19 dakikadan daha kısa bir sürede tüm dokuz analitin temel ayırma işlemini başarıyla gerçekleştirdi (Şekil 4.4). Amino kolonu, THMA-Mix-SP'den daha güçlü analit etkileşimleri sağlasa da, daha düşük ayırma seçiciliği sergiledi. Bu sonuçlar, yeni karışık mod kolonunun üstün HILIC performansı sağladığını ve yapısal olarak benzer polar bileşiklerin hızlı ve yüksek çözünürlüklü ayrılması için etkili bir platform olarak güçlü bir potansiyel gösterdiğini açıkça göstermektedir.

RPLC'de ilk olarak polar olmayan bileşikler (alkil benzenler, PAH'lar ve Sudan boyaları) için bir karşılaştırma yapıldı. Tamamen apolar olan ACE C18 kolonu, esas olarak hidrofobik etkileşimler yoluyla etkileşime girer. Bu nedenle, bu üç analit grubunu güçlü bir şekilde korur ve etkili bir ayırma gerçekleştirir, ancak önemli ölçüde uzatılmış analiz süreleri pahasına. Çalışma sürelerini makul bir düzeye düşürmek için, mobil fazdaki ACN içeriği alkil benzenler ve PAH'lar için %80'e ve Sudan boyaları için %85'e çıkarıldı ve kolon sıcaklığı sırasıyla 30 °C ve 50 °C'ye yükseltildi. Bu agresif koşullara rağmen, alkil benzenler ve PAH'lar için analiz süreleri 10 ve 12 dakika, Sudan boyaları için ise 23 dakikaydı (EK-21 Ek-24). Buna karşılık, THMA-Mix-SP aynı üç analit grubunu 7–9 dakika içinde ayırdı (Şekil 4.6). Analitler ile sabit faz arasındaki aşırı spesifik etkileşim genellikle istenmeyen sonuçlara yol açar. Bu etki fenollerin, anilinlerin ve benzoik asitlerin ayrılmasında daha belirgindir. THMA-Mix-SP ile dokuz analit 17 dakika içinde ayrıldı (Şekil 4.9), ACE C18 ise 23 dakika ayırdı ancak fenol (2) ile 3-metoksifenol (3) ve siyanofenol (5) ile nitrofenol (6) arasında temel ayırmayı başaramadı (EK-24). Temel ayırma zorlandığında, çalışma süresi 40 dakikaya kadar uzadı. Benzer bir durum anilinleri için gözlemlendi. THMA-Mix-SP ile 10 anilin odasında 15 dakika ayrıldı (Şekil 4.8), ACE C18 sütunu ile ayırmak 22 dakika sürdü ve o-fenilendiamin (2) ile 2-hidroksianilin (3) ve 4-aminoanilin (1) ile o-toluidin (6) düzgün bir şekilde ayıramadı (Ek-25). Daha iyi ürünler için daha düşük bir ACN'nin kullanılması, fenollere benzer şekilde önemli ölçüde daha uzun çalışma süreleri ile

sonuçlandırılmıştır. Fenoller ve anilinler için açıkça tanımlanmış gibi, C18 kolonu hem polar hem de apolar çiçekler içeren karışımları ayırmak için yetersizdir. Bunun nedeni, C18 kolonunun hidrofobik analitler ile güçlü bir şekilde etkileşime girmesi ve apolar türler için yüksek seçicilik sağlaması, ancak polar analitlere karşı daha zayıf etkileşimler ve daha düşük seçicilik sergilemesidir.

Sonuç olarak, C18 kullanarak polar değiştirme düzenleyicilere sahip fenoller ve anilinleri ayırma, daha zor hale gelir ve kabul edilebilir bir dosya elde etmek için daha uzun analiz gerektirir. Benzoik asitler için benzer bir eğilim gözlemlendi. THMA-Mix-SP ile sekiz benzoik asit türü sadece 7 dakika içinde mükemmel bir seçicilikle ayrılırken (Şekil 4.9), ACE C18 kolonu 35 dakika içinde sadece yedi analiti ve 15 dakikadan daha kısa analiz programları içinde sadece altı analiti ayırabildi (Ek-26). THMA-Mix-SP'nin benzoik asitleri için üstün ayırma performansı açıkça katyon değişim kabiliyetine sahiptir. Bu sonuçlar, THMA-Mix-SP'nin hem polar hem de apolar yapılar içeren karışımlar için, özellikle fenoller, anilinler ve benzoik asitler gibi fonksiyonel içerirler için C18 sütunundan daha iyi ayırma performansı göstermektedir. Beklendiği gibi, alkil benzenler, PAH'lar ve Sudan boyları gibi tamamen apolar çiçekler için seçiciliği C18'den daha düşüktür; Ancak yine de önemli ölçüde daha kısa çalışma süreleri ile isteğe bağlı bir performans sunar. THMA-Mix-SP fazındaki polar ve apolar fonksiyonel açıdan gelişmiş, farklı analit tipleriyle benzer iletim güçlerini mümkün kılar ve daha düzenli analiz koşulları ve etkili ayırma sağlar. Buna karşılık, C18 kolonunun apolar analitleri aşırı derecede güçlü tutması, karmaşık polar-apolar karışımları ayırmada zorluklarla karşılaşır. Sonuç olarak, THMA-Mix-SP'nin polardan apolara, bazik ila asitler ve nötr ila iyonik türlere kadar çok çeşitli analitlerin ayrılmasında oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır.

ACE C18 kolonu değişimi tüm analit grupları için keskin ve simetrik tepe noktaları elde edildi. ACE C18 için teorik plaka sınıfı, metre başına yaklaşık 100.000 plakaya ulaşan THMA-Mix-SP kolonunun yaklaşık iki katıdır. Yapmak gerekirse, laboratuvarımızda karşılaştırma sentezlenen ve paketlenen Kromasil-amino kolonu, metre başına yaklaşık 52.000 plaka teorik plaka sayısı ve pik asimetrisi (As) değerleri 1,40 ila 1,85 arasında değişti. Bu sonuçlar, Kromasil-amino kolonunun, metre başına yaklaşık 35.000 plaka teorik plaka sayısı ve 0,99 ila 1,21 arasında As değerleri gösteren THMA-Mix-SP'den daha keskin ancak biraz daha asimetric pikler bulunduğunu göstermektedir. Bu tutarsızlık, paketlenme kalitelerindeki farklılıklara bağlanabilir. Geleneksel C18 kolonlarından farklı olarak, karışık modlu sabit fazların

paketlenmesinin sağlanması daha karmaşıık ve daha fazla hassasiyet gerektirir. THMA-Mix-SP kolonu için koşullar daha iyi optimize edilmiş olsa da, ayrıntılı ve ayrıntılı paket paketleri paketlemeyi iyileştirebilir ve böylece kolonun mevcut yapısı iki ayakta durabilir.



5. SONUÇLAR

THMA-Mix-SP sabit fazı, silika parçacıklarının tris(hidroksimetil)aminometan ile tek adımlı fonksiyonelleştirilmesini içeren basit, zaman açısından verimli ve düşük maliyetli bir prosedürle sentezlendi. Bu pratik sentetik yol, karmaşık reaktiflere veya çok adımlı protokollere olan ihtiyacı ortadan kaldırarak sabit fazı rutin kromatografik uygulamalar için oldukça erişilebilir hale getirir. Sentezlendikten sonra, kolon geniş bir polarite spektrumunda dikkate değer bir ayırma performansı sergiledi ve nükleobazlar ve nükleozitler, orta derecede polar süstitüe fenoller ve anilinler ve zayıf asidik benzoik asit türevleri gibi oldukça polar bileşikler başarıyla çözdü. Özellikle etkileyici olanlar, HILIC koşulları altında dokuz nükleobaz/nükleozitin tamamen temel çizgi ayrımı ve iyon değişiminin tercih edildiği sulu koşullar altında 7 dakika içinde sekiz benzoik asidin verimli elüsyonuydu. Yeni karışık modlu kolon, hem polar hem de polar olmayan analitler içeren karışımların ayrılmasında C18 kolonuna göre açık bir avantaj göstermektedir. Ayrıca, kısa analiz süreleri içerisinde tamamen polar olmayan bileşikler etkin bir şekilde ayırma yeteneği, C18 kolonununkine benzer rekabetçi performansını vurgular. Bu sonuçlar, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve zayıf anyon değişim mekanizmalarına girme kapasitesinden kaynaklanan kolonun çok işlevliliğini vurgular. Genel olarak, THMA-Mix-SP, karmaşık analit karışımları için üstün seçicilik ve ayırma verimliliği sunarak birden fazla tutma mekanizmasının eş zamanlı olarak kullanılmasını sağlayan çok yönlü karışık mod platformu sağlar.

KAYNAKLAR

- Alpert, A. (1990). Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography*, 499, 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3)
- Alpert, A. J. (2018). Effect of salts on retention on hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1538, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.038>
- Aral, H., Celik, K. S., Altindag, R., & Anal, 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>
- Bicker, W., Wu, J. Y., Yeman, H., Albert, K., & Lindner, W. (2011). Retention and selectivity effects caused by bonding a polar urea-type ligand to silica: A study on mixed-mode retention mechanisms and the pivotal role of solute-silanol interactions in the hydrophilic interaction chromatography elution mode. *Journal of Chromatography A*, 1218, 882–895. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.073>
- Bo, C., Dai, X., Chen, W., & Cao, R. (2018). Controllable preparation of a reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatographic stationary phase with adjustable selectivity. *Analytical Methods*, 10, 5387–5397. <https://doi.org/10.1039/C8AY01944D>
- Bo, C., Jia, Z., Dai, X., & Wei, Y. (2020). Facile preparation of polymer-brush reversed-phase/hydrophilic interaction/ion-exchange tri-mode chromatographic stationary phase by controlled polymerization of three functional monomers. *Journal of Chromatography A*, 1619, 460966. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460966>
- Bo, C., Wang, X., Wang, C., & Wei, Y. (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>
- Burgos-Gil, R., Peris-Garcia, E., Ruiz-Angel, M. J., Baeza-Baeza, J. J., & Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (2019). Protocol to compare column performance applied to hydrophilic interaction liquid chromatography. *Micro chemical Journal*, 149, 103973. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103973>
- Buszewski, B., & Skoczylas, M. (2019). Multi-parametric characterization of amino acid- and peptide-silica stationary phases. *Chromatography*, 82, 153–156. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3569-2>
- Cai, J., Cheng, L., Zhao, J., Fu, Q., Jin, Y., Ye, Y., & Liang, X. (2017). A polyacrylamide-based silica stationary phase for the separation of carbohydrates

- using alcohols as the weak eluent in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1524, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.005>
- Cai, T., Zhang, H., Chen, J., Li, Z., & Qiu, H. (2019). Polyethyleneimine-functionalized carbon dots and their precursor co-immobilized on silica for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1597, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.026>
- Chirita, R. I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A. L., & Elfakir, C. (2011). Investigations on the zwitterionic stationary phases in the hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5939–5963. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.002>
- Chu, Z., Zhang, L., & Zhang, W. (2018). Preparation and evaluation of maltose modified polymer-silica composite based on cross-linked polyglycidyl methacrylate as higher performance liquid chromatography stationary phase. *Analytica Chemical Acta*, 1036, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.027>
- Chung, H., Shimura, A., & Matsui, T. (2018). Discriminant and simultaneous HPLC analysis of reducing and non-reducing monosaccharides on a polyethyleneimine-attached hydrophilic interaction liquid chromatography column. *Food Science and Technology Research*, 24, 501–508. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.501>
- Guo, Y., & Fattal, B. (2021). Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography. *Analytica Chemical Acta*, 1184, 339025. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339025>
- 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>
- Guo, Y., & Gaiki, S. (2011). Retention and selectivity of stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5920–5938. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.05>
- Guo, Y., & Shah, R. (2015). Detailed insights into the retention mechanisms of caffeine metabolites in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1463, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.018>
- Guo, Y., Srinivasan, S., & Gaiki, S. (2007). Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interactions using a design of experiments. *Chromatography*, 66, 223–229. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0264-0>
- Heaton, J., Graya, N., Cowan, D. A., Plum, R. S., Legido-Quigley, C., & Smith, N. W. (2012). Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid

- chromatography for the separation of ephedrine's. *Journal of Chromatography A*, 1228, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.026>
- Heaton, J., Wang, X., Barber, W. E., Buckenmaier, S. M. C., & McCalley, D. V. (2014). Practical observations on the performance of bare silica in hydrophilic interaction chromatography compared with C18 reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1328, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.058>
- 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, Y., Cai, T., Zhang, H., Chen, J., Li, Z., & Qiu, H. (2019). Poly(itaconic acid)-grafted silica stationary phase prepared in deep eutectic solvents and its unique performance in hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 191, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.072>
- 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>
- Ikegami, T., Taniguchi, A., Okada, T., Horie, K., Arase, S., & Ikegami, Y. (2021). Functionalization using polymer or silane? A practical test method to characterize hydrophilic interaction chromatography phases in terms of their functionalization method. *Journal of Chromatography A*, 1638, 461850. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461850>
- Iturrospe, E., Manuela da Silva, K., Andujar, B. T., Cuykx, M., Boeckmans, J., Vanhaecke, T., Covaci, A., & van Nuijs, A. L. N. (2021). An exploratory approach for an oriented development of an untargeted hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry platform for polar metabolites in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461807. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461807>
- Mendez, A., Bosch, E., Roses, M., & Neue, U. (2003). Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*, 986, 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01899-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01899-X)
- Molnarova, K., & Kozlik, P. (2020). Comparison of different HILIC stationary phases in the separation of hemopexin and immunoglobulin G glycopeptides and their isomers. *Molecules*, 25, 4655. <https://doi.org/10.3390/molecules25204655>
- Nguyen, H. P., Yang, S. H., Wigginton, J. G., Simpkins, J. W., & Schug, K. A. (2010). Retention behavior of estrogen metabolites on hydrophilic interaction chromatography stationary phases. *Journal of Separation Science*, 33, 793–802. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900680>

- Olsen, B. A. (2001). Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, 913, 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01063-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01063-3)
- Oyler, A. R., Armstrong, B. L., Cha, J. Y., Zhou, M. X., Yang, Q., Robinson, R. I., Dunphy, R., & Burinsky, D. J. (1996). Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phase complements reversed-phase liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *Journal of Chromatography A*, 724, 378–383. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00987-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00987-6)
- Peng, H., Wang, X., Peng, J., He, Y., Chen, Y., Chen, F., & Li, S. (2018). Preparation and evaluation of surface-bonded phenyl glycine zwitterionic stationary phase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5941–5950. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1211-7>
- Peng, Y., Zhang, F., Pan, X., Hou, Y., & Yang, B. (2017). Poly(vinyl alcohol)-cationic cellulose copolymer encapsulated SiO₂ stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *RSC Advances*, 7, 21336–21341. <https://doi.org/10.1039/C7RA01958K>
- Petrol, K., Care, A., Waterstraad, M., Berguist, P. L., & Sunna, A. (2019). Mixed-mode liquid chromatography for the rapid analysis of biocatalytic glucaric acid reaction pathways. *Analytica Chemical Acta*, 1066, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.023>
- Qian, K., Peng, Y., Zhang, F., Yang, B., & Liang, X. (2018). Preparation of a low bleeding polar stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 182, 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.009>
- Qian, K., Yang, Z., Zhang, F., Yang, B., & Dasgupta, P. K. (2018). Low-bleed silica based stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 90, 8750–8755. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01796>
- Qiao, L., Li, H., Shan, Y., Wang, S., Shi, X., Lu, X., & Xu, G. (2014). Study 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., Lu, W., Chang, M., Shi, X., & Xu, G. (2018). Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1559, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.037>
- Qiao, L., Shi, X., & Xu, G. (2016). Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 81, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.021>

- Subirats, X., Abraham, M. H., & Roses, M. (2019). Characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography retention by a linear free energy relationship. Comparison to reversed- and normal-phase retentions. *Analytica Chemical Acta*, 2019, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.010>
- Subirats, X., Justicia, A., & Roses, M. (2018). Chasing the elusive hold-up time from an LFER approach. *Journal of Chromatography A*, 1571, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.017>
- Suttapitugsakul, S., Sun, F., & Wu, R. (2020). Recent advances in glycoproteomic analysis by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 92, 267–291. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04651>
- Takafuji, M., Shahruzzaman, M., Sarahara, K., & Ihara, H. (2018). Preparation and characterization of a novel hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with pyridinium-based zwitterionic polymer-grafted porous silica. *Journal of Separation Science*, 41, 3957–3965. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800578>
- Takegawa, Y., Deguchi, K., Ito, H., Keira, T., Nakagawa, H., & ShinIchiro, N. (2006). Simple preparation of isomeric sialylated N-glycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 29, 2533–2540. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600133>
- Zhang Y., Zhong H., Zhou S., Han H., Zhang M., Qiu H. A docosyl-terminated polyamine amphiphile-bonded stationary phase for multimodal separations in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1642, 462045. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462045>
- Zhou H., Chen J., Li H., Quan K., Zhang Y., Qiu H. Imidazolium ionic liquid-enhanced poly(quinine)-modified silica as a new multi-mode chromatographic stationary phase for separation of achiral and chiral compounds. *Talanta* **2020**, 211, 120743. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120743>
- Sýkora D., Řezanka P., Záruba K., Král V. Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases. *J. Sep. Sci.* **2019**, 42(3), 411–437. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801048>
- Yang Y., Zhou J., Liang Q., Dai X., Yang H., Wan M., Ou J., Liao M., Wang L. Comparing the separation performance of poly(ethyleneimine) embedded butyric and octanoic acid based chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A* **2023**, 1706, 464268. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464268>
- Luo K., Zhao L., Liu Y., Zhang Y., Chen W., Tang S. Hydrophobic/hydrophilic separation performance evaluation of a mixed-mode ionic liquid embedded stearyl thioglycolate functionalized silica stationary phase. *J. Chromatogr. A* **2023**, 1706, 464279. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464279>
- Aral T., Aral H., Ziyadanoğulları B., Ziyadanoğulları R. 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* **2015**, *131*, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.060>
- Aral H., Çelik K.S., Altındağ R., Aral T. Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. *Talanta* **2017**, *174*, 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.014>
- Wang Q., Long Y., Yao L., Xu L., Shi Z.-G., Xu L. Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase. *Talanta* **2016**, *146*, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.009>
- Wei W., Long H., Liu Y., Zhang Y., Chen W., Tang S. Preparation and application of a novel imine-linked covalent organic framework@silica composite for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatographic separations. *Anal. Chim. Acta* **2023**, *1276*, 341635. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341635>
- Yang Y., Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*(49), 8813–8825. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.009>
- Bui T.N.H., Verhage J.J., Irgum K. Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*(19), 2965–2976. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000154>
- Ren X., Zhang K., Gao D., Fu Q., Zeng J., Zhou D., Wang L., Xia Z. Mixed-mode liquid chromatography with a stationary phase co-functionalized with ionic liquid embedded C18 and an aryl sulfonate group. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1564*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.017>
- Liang T., Fu Q., Shen A., Wang H., Jin Y., Xin H., Ke Y., Guo Z., Liang X. Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1388*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019>
- Xian H., Peng H., Wang X., Long D., Ni R., Chen J., Li S., Zhang Z., Peng J. Preparation and evaluation a mixed-mode stationary phase with imidazolium and carboxyl group for high performance liquid chromatography. *Microchem. J.* **2019**, *150*, 104131. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104131>
- Yang H., Guo B., Dai X., Liao M., Ou J., Yang Y., Zhong L., Jiang Y., Wen J., Wang L. Octadecylamine dendrimers modified silica for novel mixed-mode liquid chromatographic stationary phases. *Microchem. J.* **2024**, *197*, 109798. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109798>
- Dembek M., Bocian S. Phosphodiester stationary phases as universal chromatographic materials for separation in RP LC, HILIC, and pure aqueous mobile phase. *Materials (Basel)* **2023**, *16*(9), 3539. <https://doi.org/10.3390/ma16093539>

- Dembek M., Bacskey I., Buratti A., Catani M., Felinger A., Buszewski B., Bocian S. Retention mechanism on phosphodiester stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography and purely aqueous mobile phase part II: Overloading with limited soluble samples. *J. Chromatogr. A* **2024**, 1715, 464596. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464596>
- Hosseini E.S., Tabar Heydar K. Preparation of two amide-bonded stationary phases and comparative evaluation under mixed-mode chromatography. *J. Sep. Sci.* **2021**, 44, 3321–3330. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100291>
- Hu K., Zhang Y., Liu J., Chen K., Zhao W., Zhu W., Song Z., Ye B., Zhang S. Development and application of a new 25,27-bis(L-phenylalaninemethylester-N-carboxylmethoxy)-26,28-dihydroxy-para-tert-butylcalix[4]arene stationary phase. *J. Sep. Sci.* **2013**, 36(3), 445–453. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200850>
- Hu Y., Kadotani J., Kuwahara Y., Ihara H., Takafuji M. Zwitterionic polymer-terminated porous silica stationary phases for highly selective separation in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2023**, 1693, 463885. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463885>
- Wang X., Wang X., Wu J., Yu J., Zeng H., Yang H., Peng H., Zhou G., Peng J. Preparation of dicationic ionic liquid modified silica stationary phase for mixed-mode liquid chromatography and its application for food additive detection. *Anal. Chim. Acta* **2024**, 1321, 343018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343018>
- Liu H., Jiang Y., Liu X., Zhang S. Preparation and application of ionic liquid-modified stationary phases in high performance liquid chromatography. *Sep. Sci. Technol.* **2012**, 47(2), 237–246. <https://doi.org/10.1080/01496395.2011.608402>
- Sun M., Feng J. Ionic liquid-functionalized dendrimer grafted silica for mixed-mode chromatographic separation and online solid-phase extraction. *Sep. Purif. Technol.* **2023**, 305, 123266. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.123266>
- Liang R., Zhang C., Zhang Y., Wang Y., Yang C., Wu Y. A composite hydrogel modified silica stationary phase for mixed-mode liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2023**, 1707, 464300. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464300>
- Zheng Y., Wan M., Zhou J., Luo Q., Gao D., Fu Q., Zeng J., Zu F., Wang L. Striped covalent organic frameworks modified stationary phase for mixed mode chromatography. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1649, 462186. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462186>
- Luo Q., Zhong Z., Zheng Y., Gao D., Xia Z., Wang L. Preparation and evaluation of a poly(N-isopropylacrylamide) derived graphene quantum dots based hydrophilic interaction and reversed-phase mixed-mode stationary phase for complex sample analysis. *Talanta* **2021**, 224, 121869. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121869>

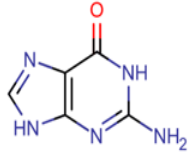
- Wu Y., Luo K., Liu Y., Chen W., Bai Z., Tang S. Innovative preparation of ureido/dodecyl dual-functionalized silica as a versatile mixed-mode stationary phase for high-resolution chromatographic separations. *J. Chromatogr. A* **2022**, 1665, 462834. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462834>
- Fan C., Liu B., Li H., Quan K., Chen J., Qiu H. N-Vinyl pyrrolidone and undecylenic acid copolymerized on silica surface as mixed-mode stationary phases for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1655, 462534. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462534>
- Shen Q., Tang C., Xu X., Liu G., Shao S., Yao W., Dong S. Novel PEI/Zein core-shell composite as mixed-mode stationary phase for high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2024**, 1730, 465159. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465159>
- Zeng L., Wu H., Jiang L., Li H., Shi B., Lei F. Fabrication of polyethyleneimine grafted maleopimaric acid glycidyl methacrylate ester stationary phase for mixed-mode liquid chromatography. *Microchem. J.* **2024**, 197, 109893. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.109893>
- Wang L., Wei W., Xia Z., Jie X., Xia Z.Z. Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 80, 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.001>
- Zhang M., Gong L., Liu G., Kang J. Preparation of a monolithic column with a mixed-mode stationary phase of reversed-phase/hydrophilic interaction for capillary liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2019**, 42(6), 1014–1021. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800826>
- Hefnawy M., El-Gendy M., Al-Salem H., Marenga H., El-Azab A., Abdel-Aziz A., El Gamal A., Alanazi M., Obaidullah A., Al-Hossaini A., Hefnawy A. Trends in monoliths: Packings, stationary phases and nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **2023**, 1691, 463819. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463819>
- Dinh N.P., Jonsson T., Irgum K. Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218(35), 5880–5891. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.037>
- Cavazzini A., Marchetti N., Guzzinati R., Pasti L., Ciogli A., Gasparrini F., Laganà A. Understanding mixed-mode retention mechanisms in liquid chromatography with hydrophobic stationary phases. *Anal. Chem.* **2014**, 86(10), 4919–4926. <https://doi.org/10.1021/ac500248b>
- Stevenson P.G., Fairchild J.N., Guiochon G. Retention mechanism divergence of a mixed mode stationary phase for high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218(14), 1822–1827. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.078>
- Lemasson E., Richer Y., Bertin S., Hennig P., West C. Characterization of retention mechanisms in mixed-mode HPLC with a bimodal

- reversed-phase/cation-exchange stationary phase. *Chromatographia* **2018**, *81*, 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3477-5>
- Bernardi S., Gétaz D., Forrer N., Morbidelli M. Modeling of mixed-mode chromatography of peptides. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1283*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.054>
- Lämmerhofer M., Richter M., Wu J., Nogueira R., Bicker W., Lindner W. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*(17), 2961–2975. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800178>
- Song Q., Zhao K., Xia H., Liu J., Bai Q. A novel reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode stationary phase based on horizontal polar-copolymerized approach for separation of small organic molecules and inorganic anions. *Talanta* **2019**, *197*, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.075>
- Mumin M.Y., Aral H., Sunkur M., Aral T. A new mixed-mode stationary phase derived from [2-(3,4-epoxycyclohexyl)ethyl]trimethoxysilane as a coupling reagent and its RPLC/HILIC/IEC applications. *Chem. Select* **2022**, *7*(47), e202204069. <https://doi.org/10.1002/slct.202204069>
- Ruiz R., Ruiz-Angel M.J., García-Alvarez-Coque M.C., Ràfols C. Hydrophobic and cation exchange mechanisms in the retention of basic compounds in a polymeric column. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.084>
- Lievore G., Bozza D., Catani M., Cavazzini A., Chenet T., Pasti L., Ferrazzano L., Cabri W., Macis M., Ricci A., De Luca C., Felletti S. Benefits of a mixed-mode stationary phase to address the challenging purification of an industrially relevant peptide: A proof-of-concept study. *Separations* **2022**, *9*(5), 125. <https://doi.org/10.3390/separations9050125>
- K. Hu, W. Zhang, H. Yang, Y. Cui, J. Zhang, W. Zhao, A. Yu, S. Zhang, Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography, *Talanta* **152** (2016) 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.038>.
- D. Kotani, I. D'Acquarica, A. Ciogli, C. Villani, D. Capitani, Reversed-phase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases for liquid chromatography: Preparation, characterization, and chromatographic evaluation, *J. Chromatogr. A* **1232** (2012) 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.028>.
- S. Liu, H. Xu, J. Yu, D. Li, M. Li, X. Qiao, X. Qin, H. Yan, Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 8989–8997. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9064-9>.

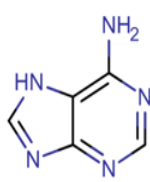
- X.D. Cheng, X.T. Peng, Q.W. Yu, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Preparation and chromatographic evaluation of a novel phosphate ester-bonded stationary phase with complexation and hydrophobic interactions retention mechanism, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.013>.
- T. Liang, Q. Fu, A. Shen, H. Wang, Y. Jin, H. Xin, Y. Ke, Z. Guo, X. Liang, Preparation and chromatographic evaluation of newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019>.
- Qiao L., Duou A., Shi X., Li H., Shan Y., Lu X., Xu G., Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1286 (2013) 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.066>.
- H. Liu, J. Chen, M. Takafuji, H. Ihara, H. Qiu, A new route for synthesis of N-methylimidazolium-grafted silica stationary phase and reevaluation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Talanta* 164 (2017) 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.037>
- Y. Zhang, Y. Zhang, G. Wang, W. Chen, P. He, Q. Wang, Simultaneous separation of polar and non-polar mixtures by capillary HPLC based on an octadecylsilane and taurine derivatized silica continuously packed column, *Talanta* 161 (2016) 762–768. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.022>.
- Q. Wang, M. Ye, L. Xu, Z.G. Shi, A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications, *Anal. Chim. Acta* 888 (2015) 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.058>
- Y. Guo, S. Gaiki, Retention behaviour of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>
- Zhou J, Wan M, Dai X, Yang H, Yang Y, Ou J, Liao M, Liu J, Wang L. Polar-embedded phenyl dendritic stationary phase for multi-mode chromatographic separation. *Microchem J.* 2023;185:108303. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108303>

EKLER

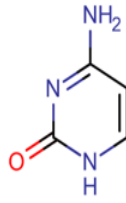
EK1. Bu çalışmada incelenen nükleobazların/nükleozitlerin yapıları



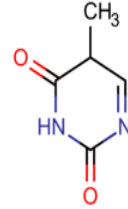
Guanine



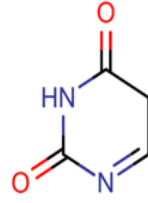
Adenine



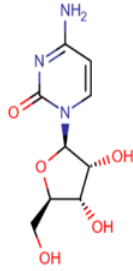
Cytosine



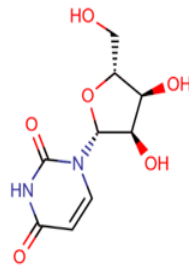
Thymine



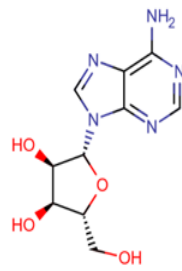
Uracil



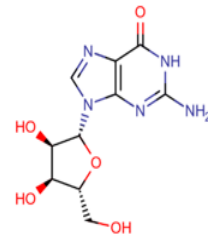
Cytidine



Uridine

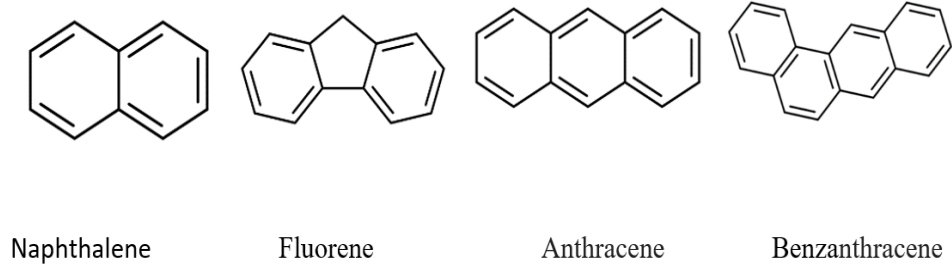
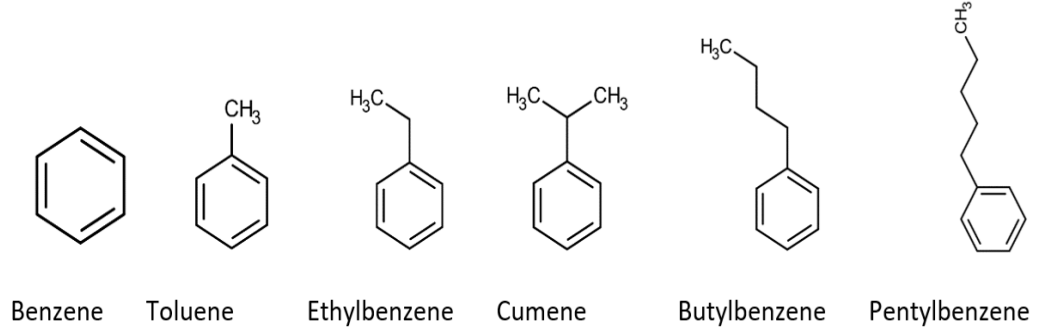


Adenosine

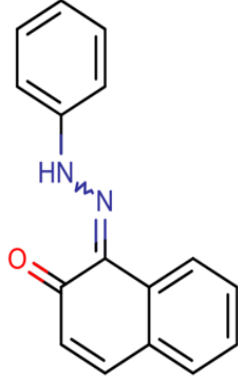


Guanosine

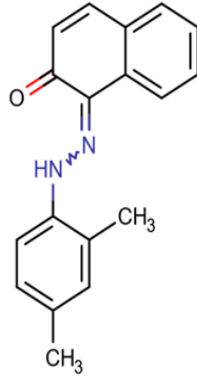
EK2. Bu çalışmada incelenen polar olmayan bileşiklerin (alkilbenzenler ve PAH'lar) yapıları



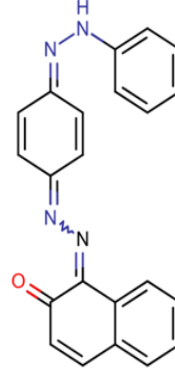
EK3. Bu çalışmada incelenen Sudan Boyalarının yapıları



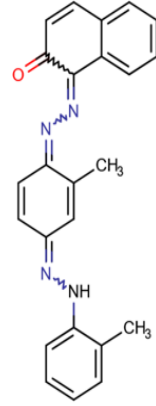
Sudan I



Sudan II

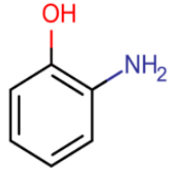


Sudan III

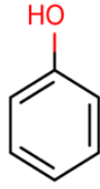


Sudan IV

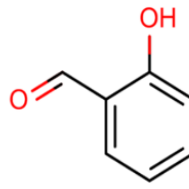
EK4. Bu çalışmada incelenen süstitüe fenollerin yapıları



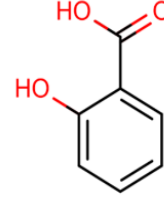
2-Aminophenol



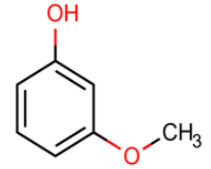
Phenol



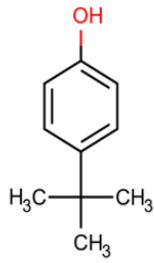
Salicylaldehyde



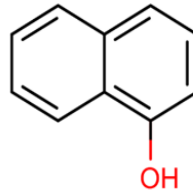
Salicylic acid



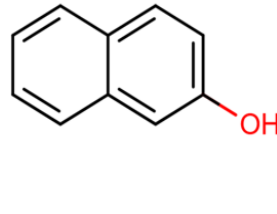
3-Methoxyphenol



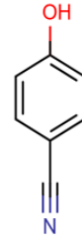
4-tert-butylphenol



1-Naphtol

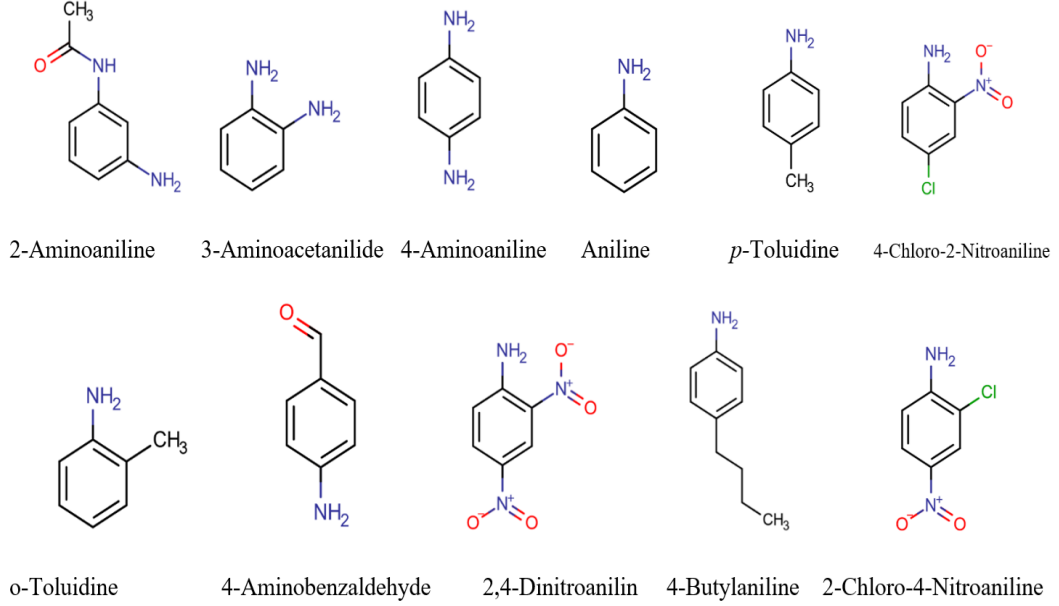


2-Naphtol

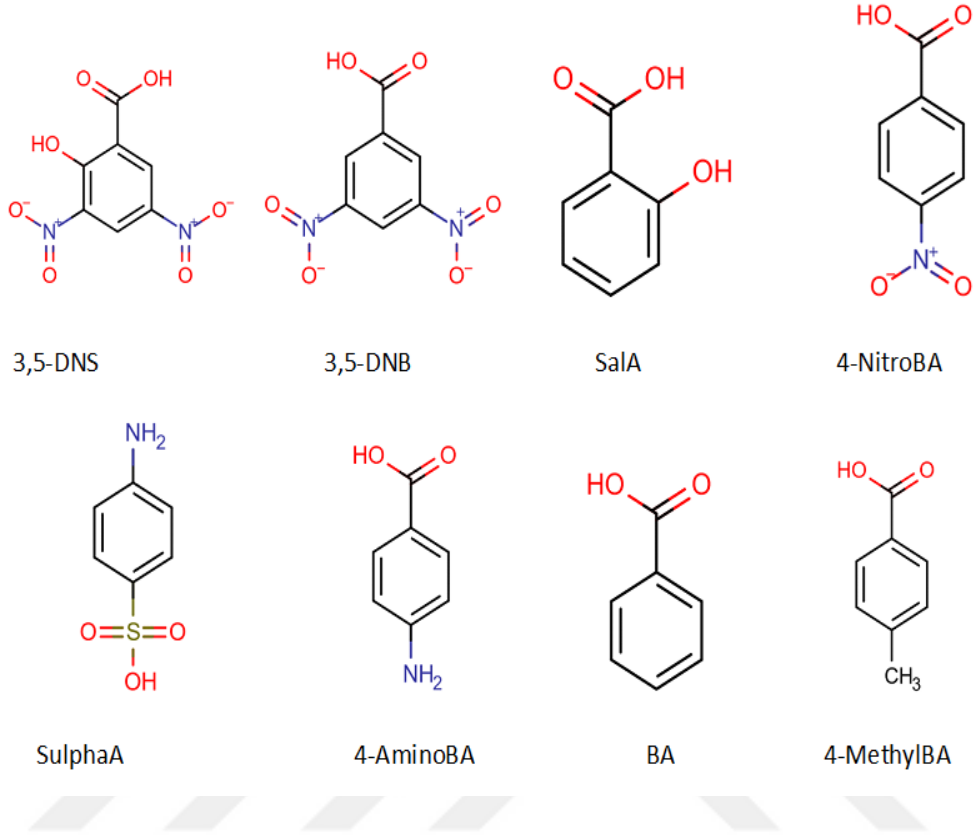


4-Cyanophenol

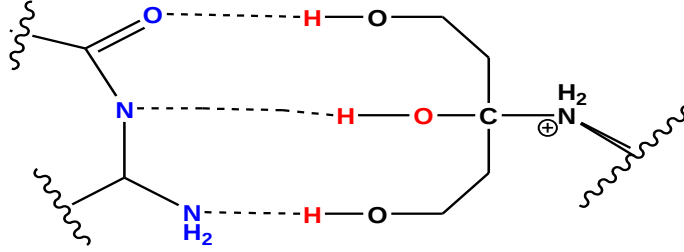
EK5. Bu çalışmada incelenen süstitüe anilinlerin yapıları



EK6. Bu çalışmada incelenen benzoik asitlerin yapıları

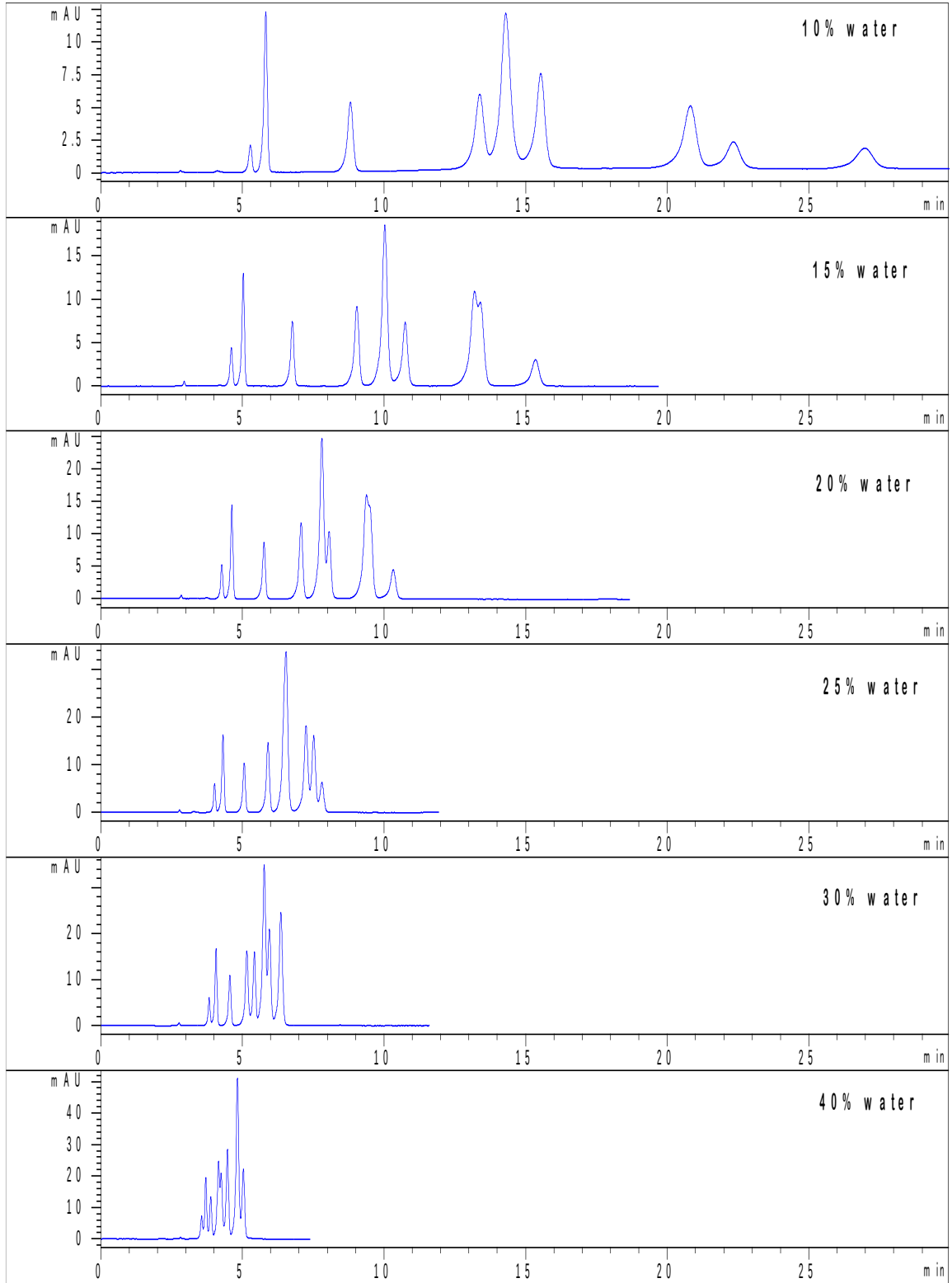


EK7. THMA-Mix SP ile güçlü bir şekilde alıkonan nükleobazlar/nükleozitler için önerilen etkileşim mekanizması

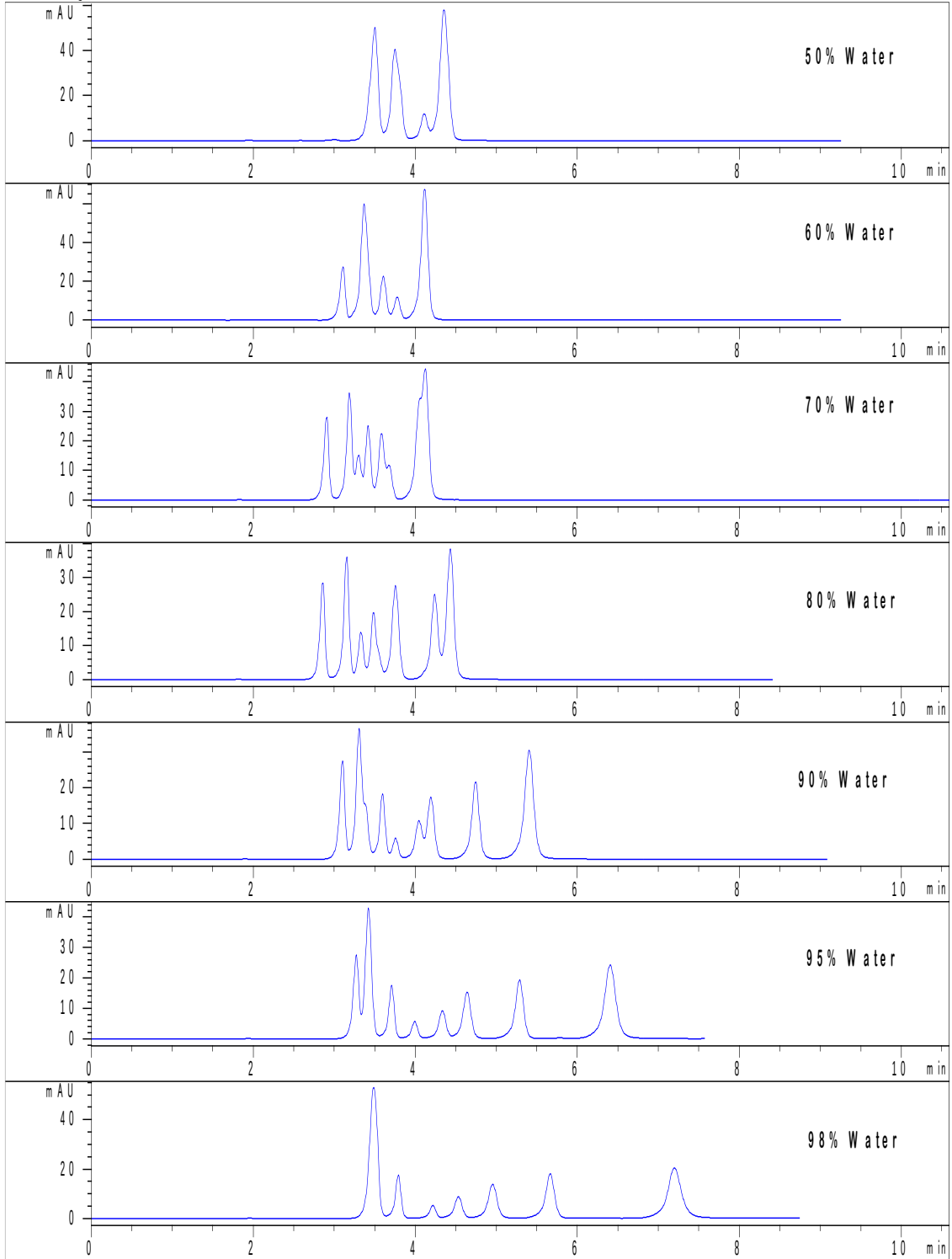


A: analytes' cite stationary phase's cite

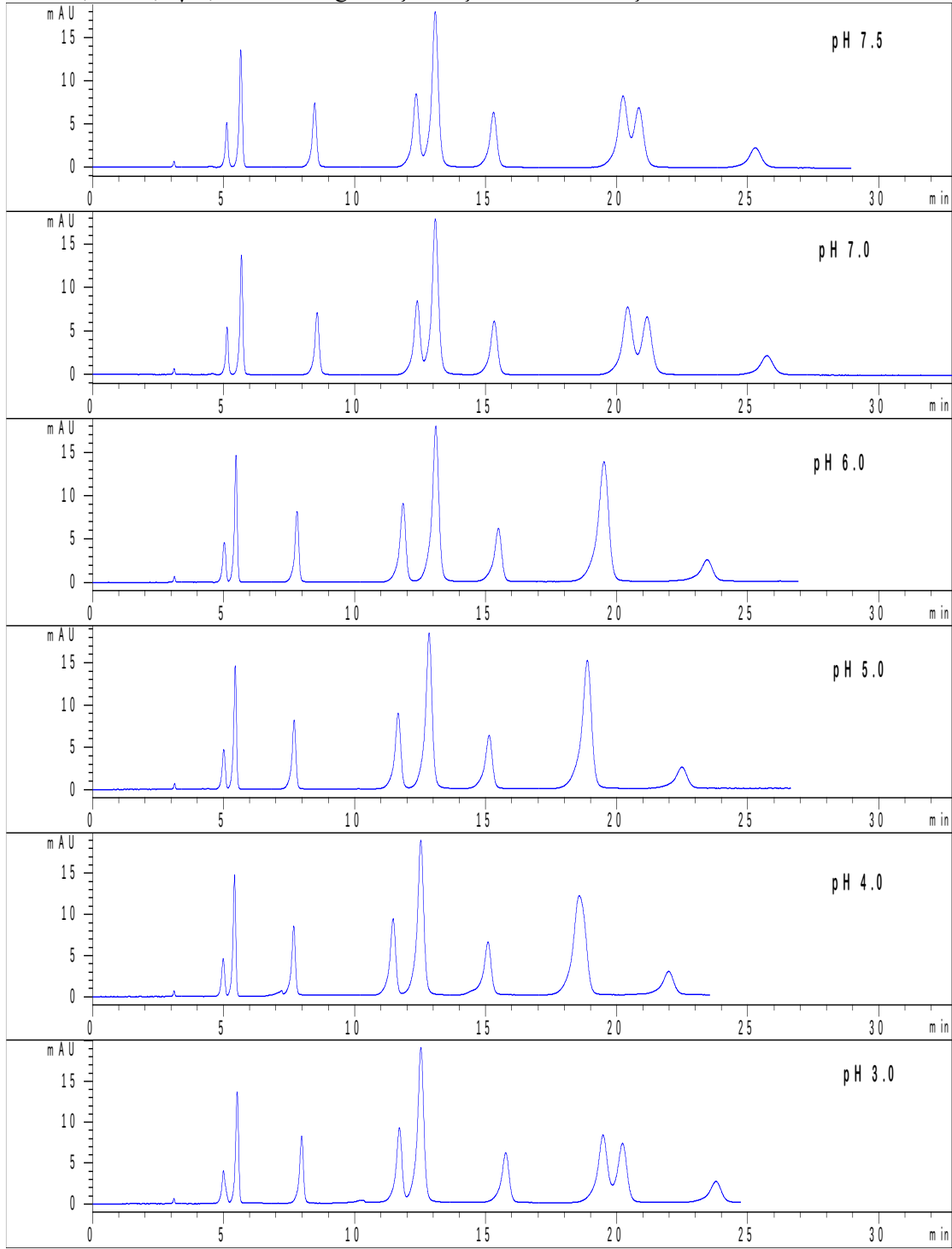
EK8. THMA-Mix sabit fazında nükleobazlar/nükleozitlerin ayrılmasında su oranının etkisi.
Koşullar: akış hızı: 1 mL/dak, sıcaklık: 20 0C, diğer koşullar Şekil altında verilmiştir.



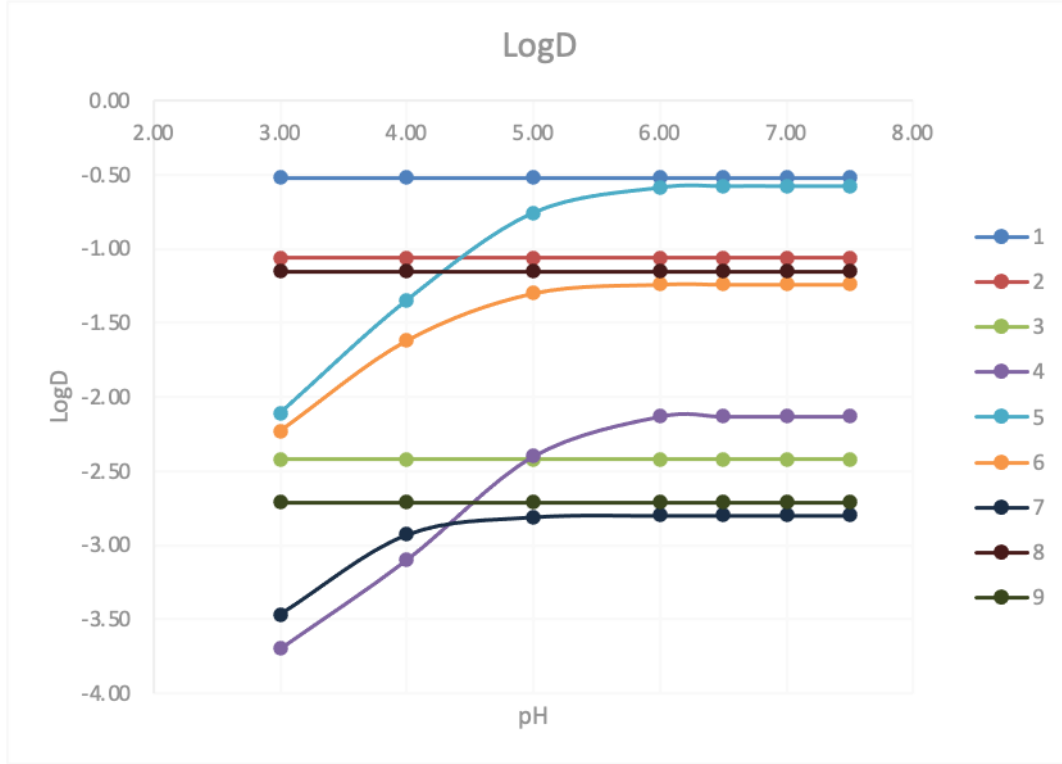
EK9. (EK 8'in devamı) THMA-Mix sabit fazında nükleobazlar/nükleozitlerin ayrılmasında su oranının etkisi. Koşullar: akış hızı: 1 mL/dak, sıcaklık: 20 0C. Diğer koşullar Şekil altında verilmiştir.



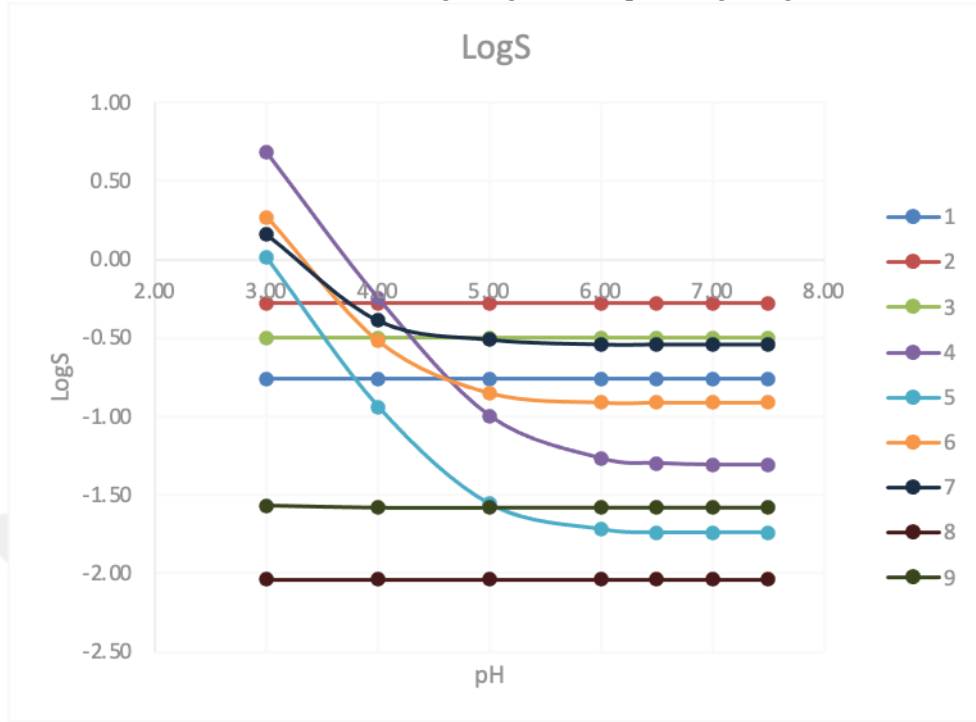
EK10. pH'ın THMA-Mix sabit fazındaki nükleobazlar/nükleozitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: Hareketli faz; ACN/su: 90/10, (10 mM format, asetat veya fosfat tamponları), 1 mL/dak, 20 °C, 2µL, 265 nm. Diğer koşullar Şekil 4'te verilmiştir



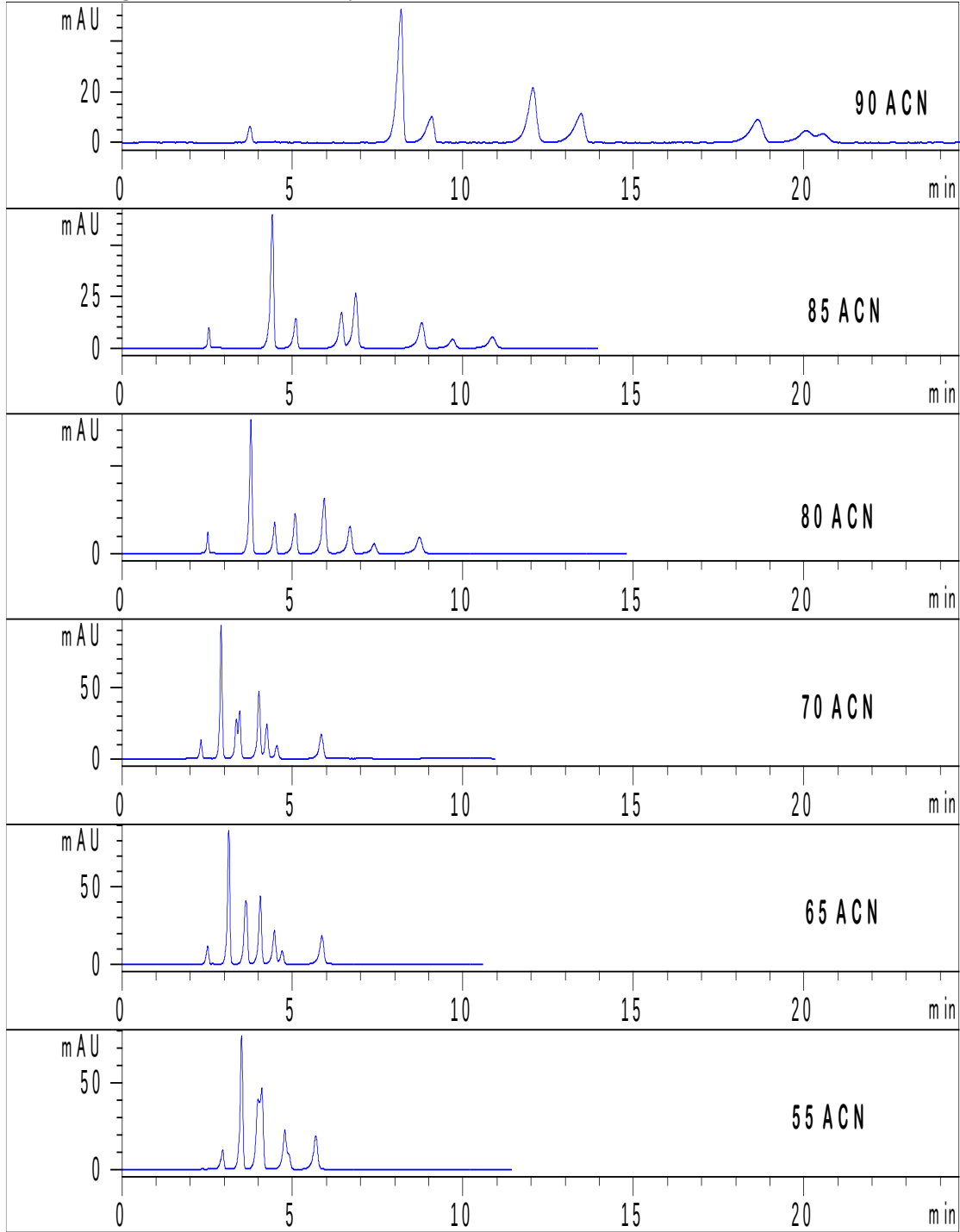
EK11. Nükleobazların/nükleozitlerin LogD değerlerinin pH'a bağlı değişimi.



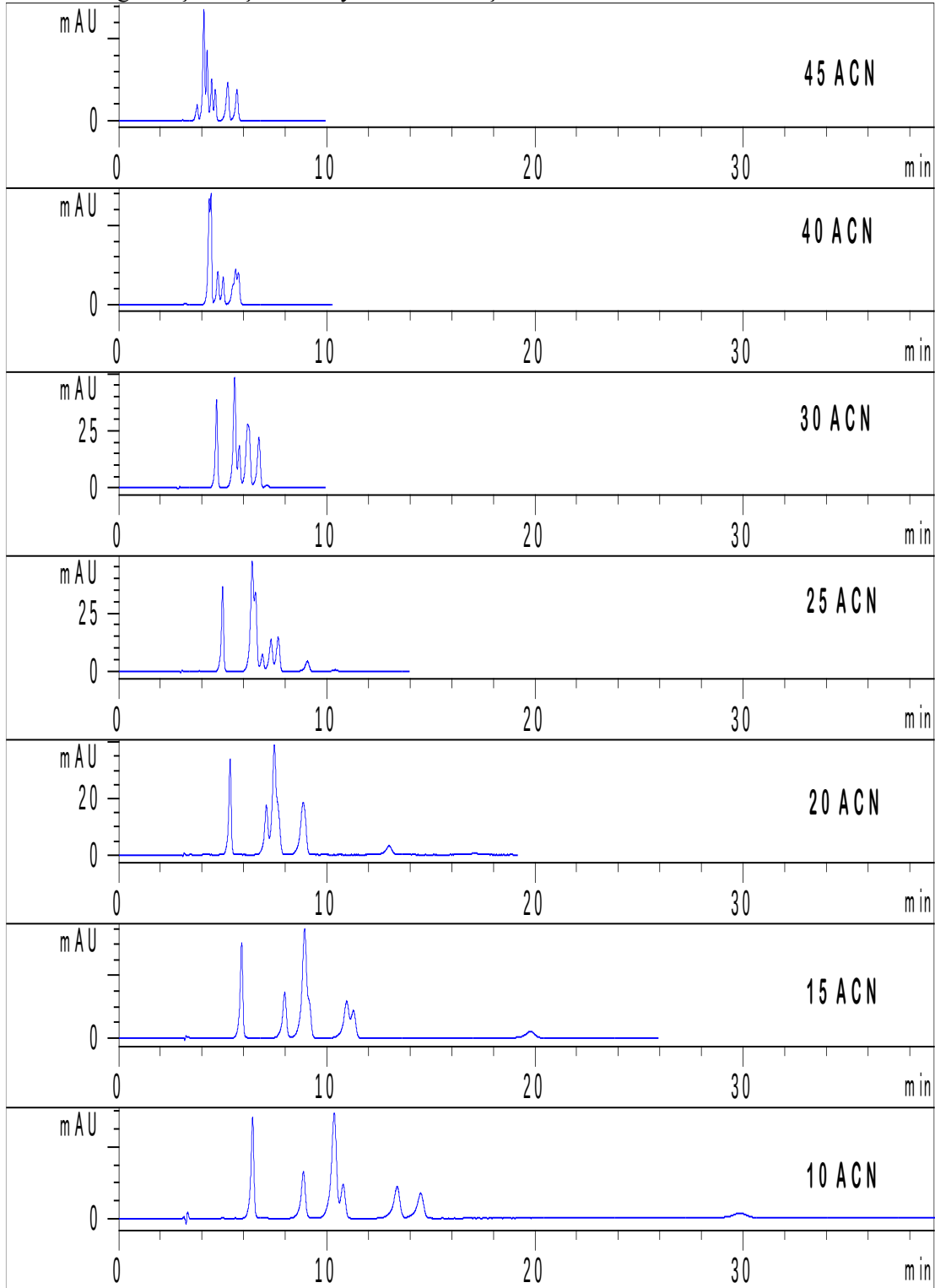
EK12. Nükleobazların/nükleozitlerin LogS değerlerinin pH'a bağlı değişimi.



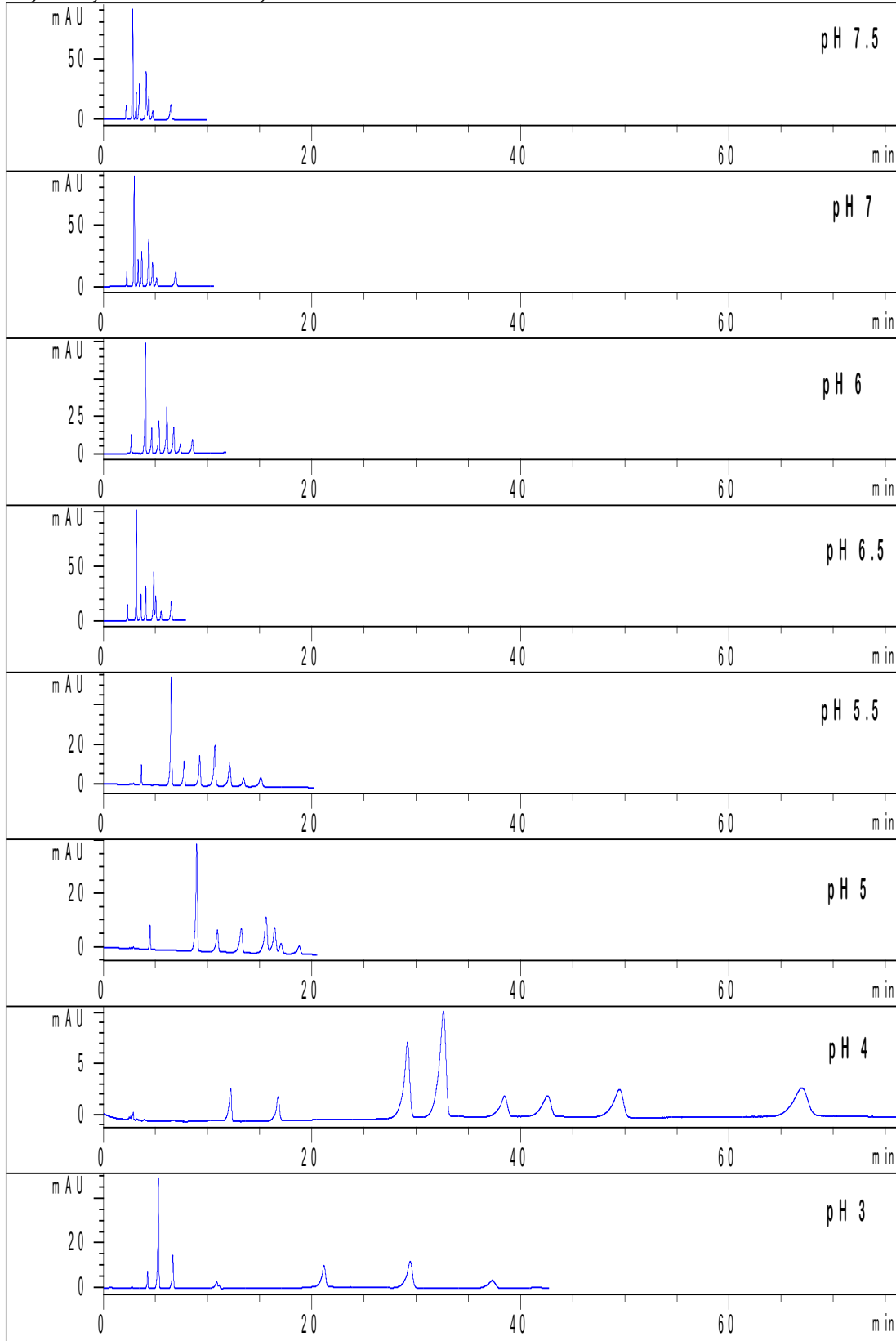
EK13. (Ek-13 (Bölüm 1))ACN yüzdesinin THMA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/Tampon (pH:6,5, 20 mM, Fosfat): 1 mL/dk., 25 oC, 2 mikrol, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 8 veya 9'da verilmiştir.



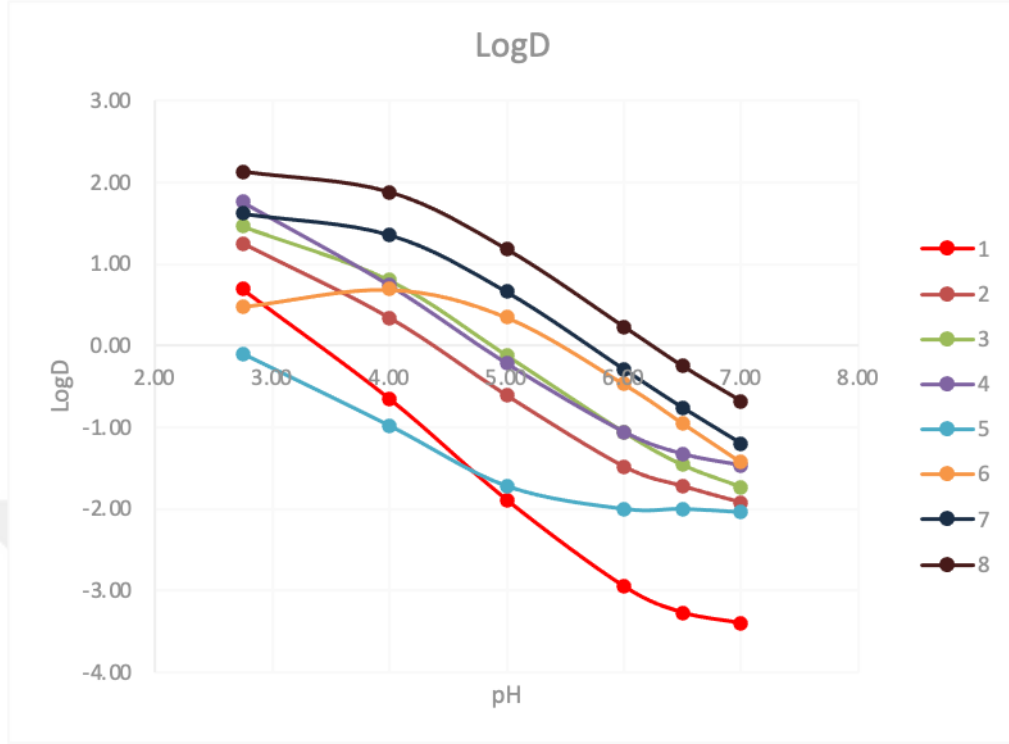
EK14.(Ek-11 (Bölüm 2) ACN yüzdesinin THMA-Mix SP'de benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/Tampon (pH:6,5, 20 mM, Fosfat): 1 mL/dk., 25 oC, 2 mikrol, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 8 veya 9'da verilmiştir.



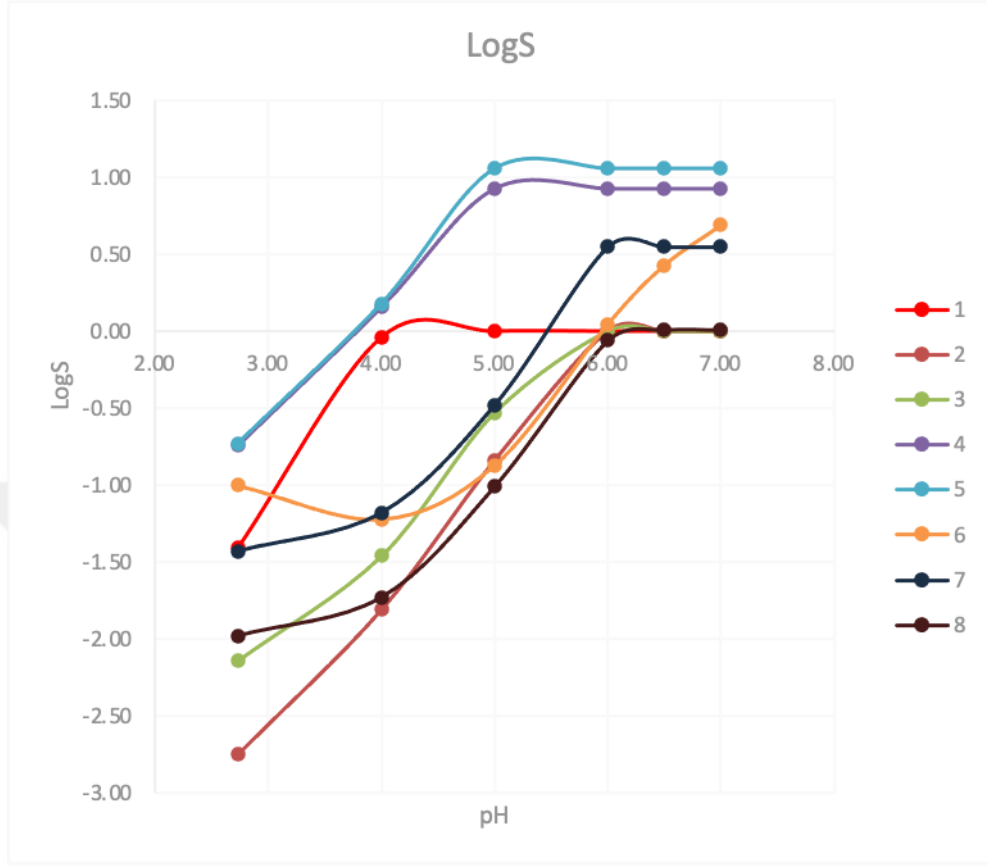
EK15. pH'ın DEA-Mix sabit fazında benzoik asitlerin ayrılması üzerindeki etkisi. Koşullar: ACN/su (20 mM format, asetat veya fosfat tamponları): 80/20, 1 mL/dak, 2 μ L, 240 nm. Diğer koşullar Şekil 9'da verilmiştir.



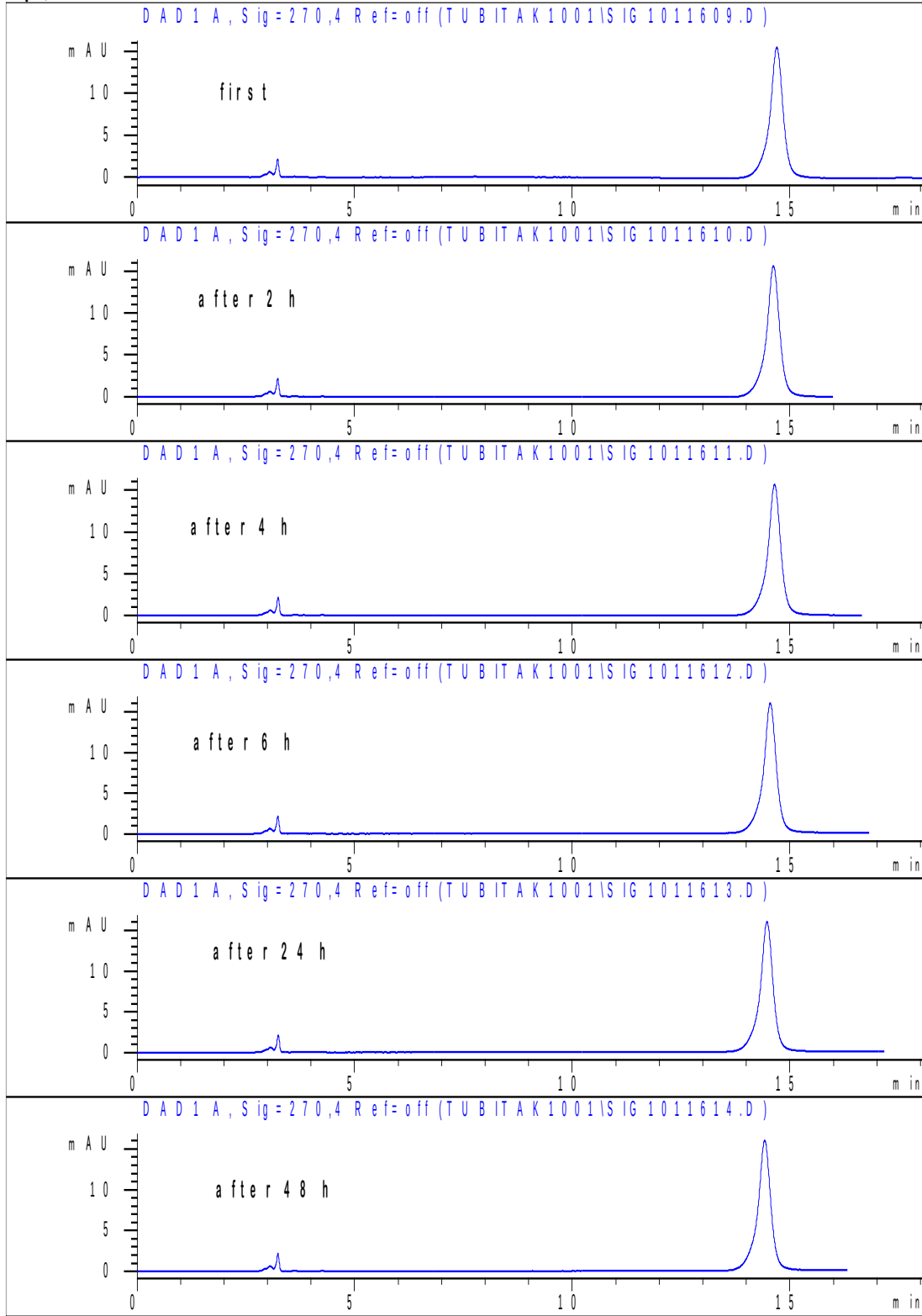
EK16. Benzoik asitlerin LogD değerlerinin pH'a göre değişimi.



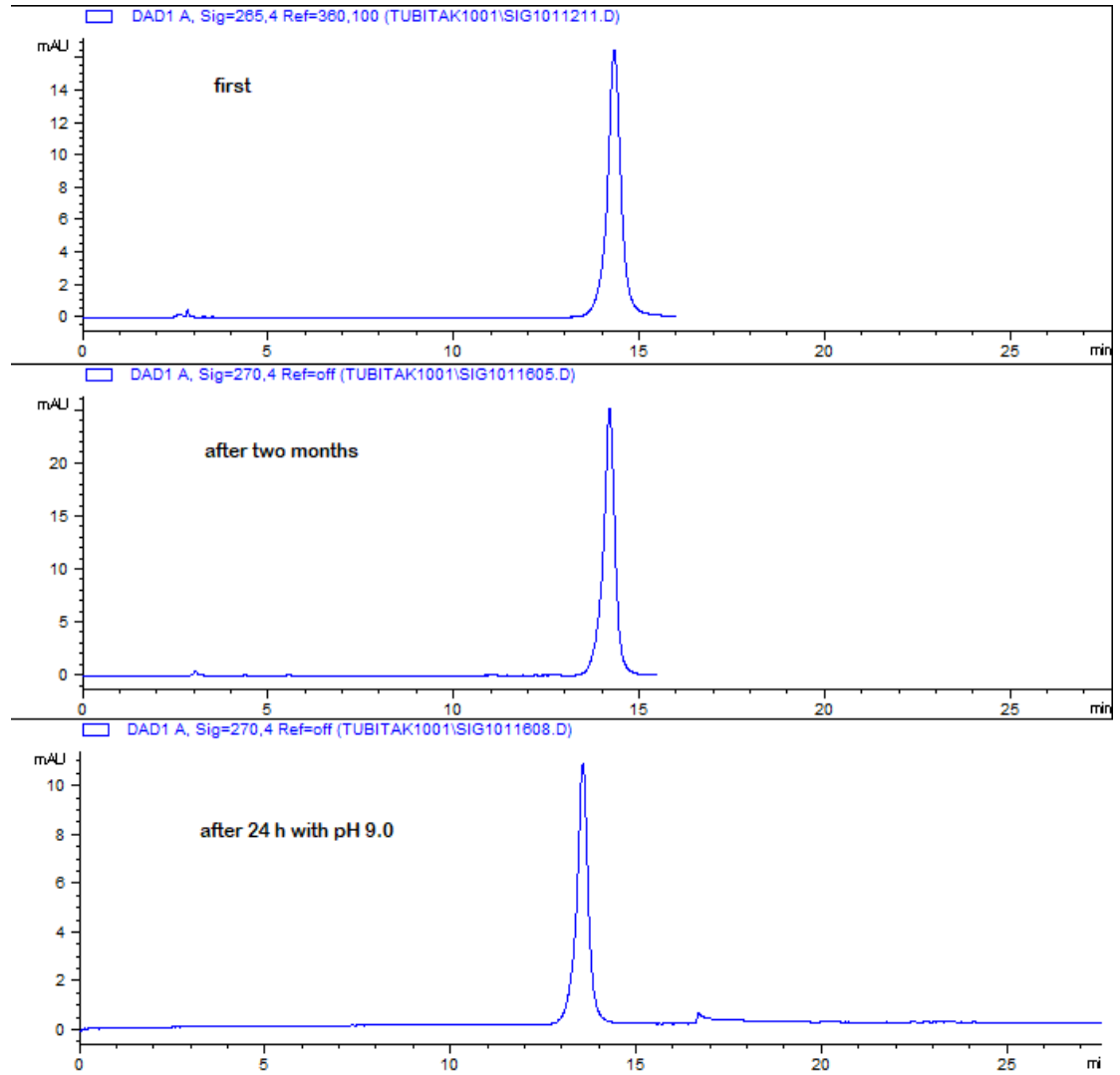
EK17. Benzoik asitlerin pH'a bağılı LogS değerlerinin değişimi.



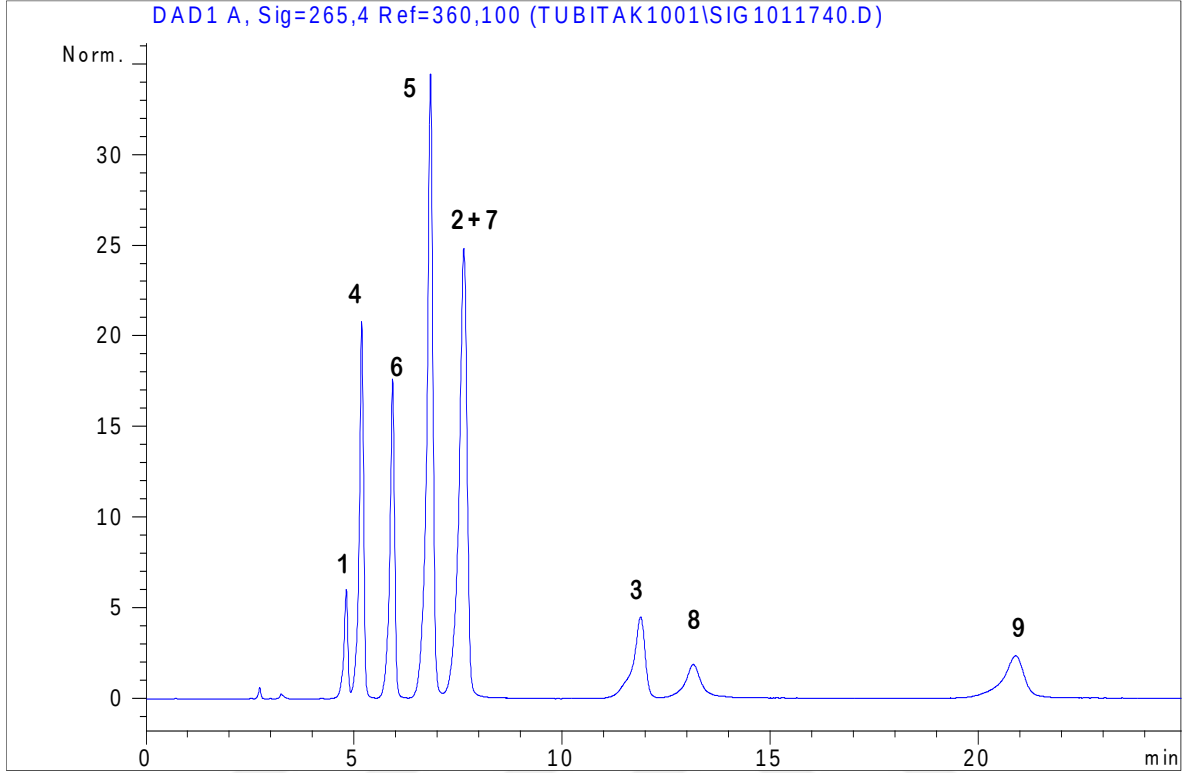
EK18. Tekrarlanabilirlik çalışmaları. Prob: adenin. Koşullar: ACN/su: 10/90, 1 ml/dak, 20 °C, 2 µl, 265 nm.



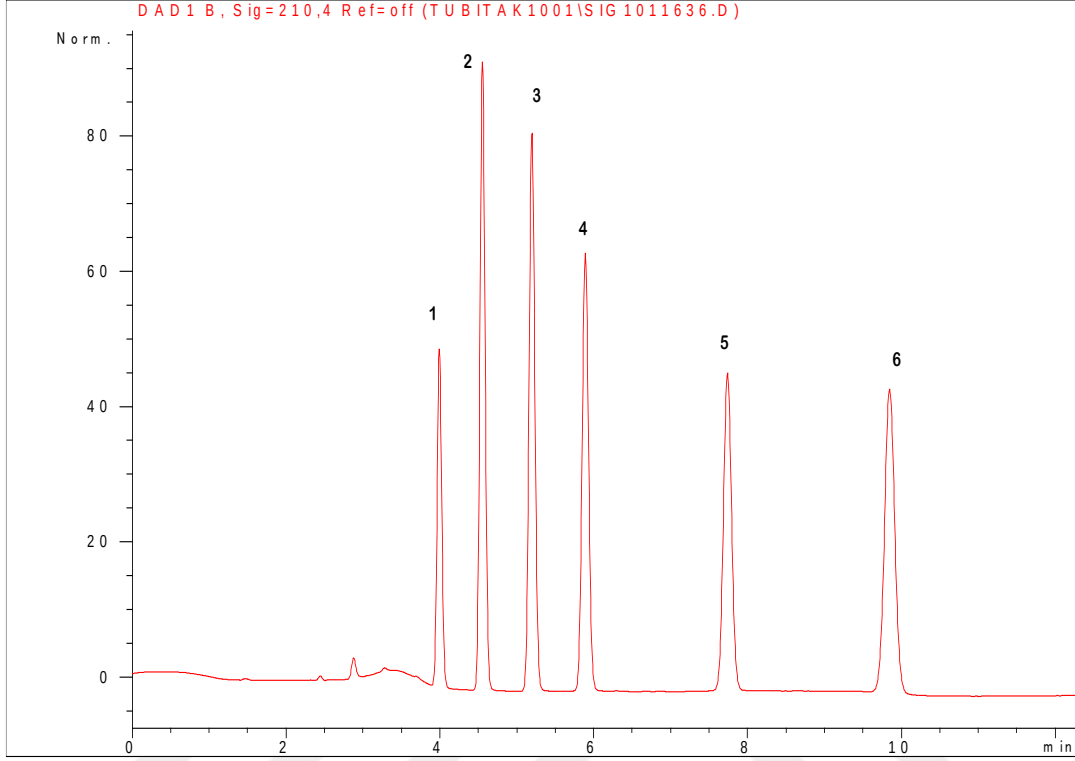
EK19. Stabilite Testleri. Prob: Adenin. Koşullar: ACN /su: 10/90, 1 ml/dak, 20 0C, 2 µl, 265 nm.



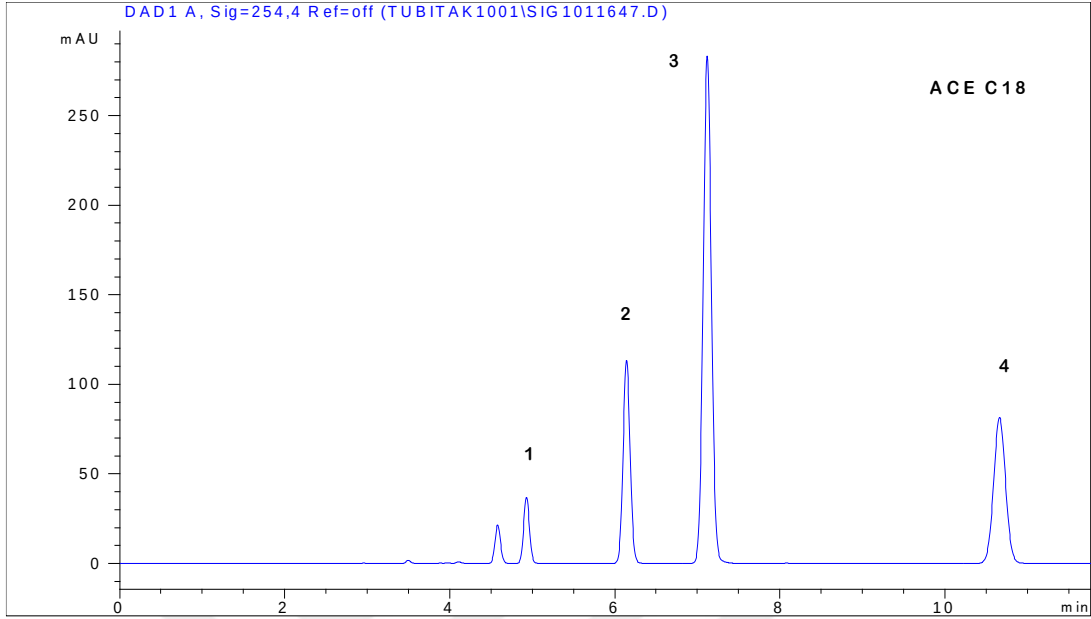
EK20. Aminopropil silika SP üzerinde nükleobazların/nükleozitlerin ayrılması. Koşullar: ACN/su: 75/25, 20 °C, 1,0 ml/dak, 2 µl, 265 nm. Analitler: 1; timin, 2; urasil, 3; uridin, 4; adenzin, 5; adenin, 6; sitozin, 7; sitidin, 8; guanin, 9; guanozin.



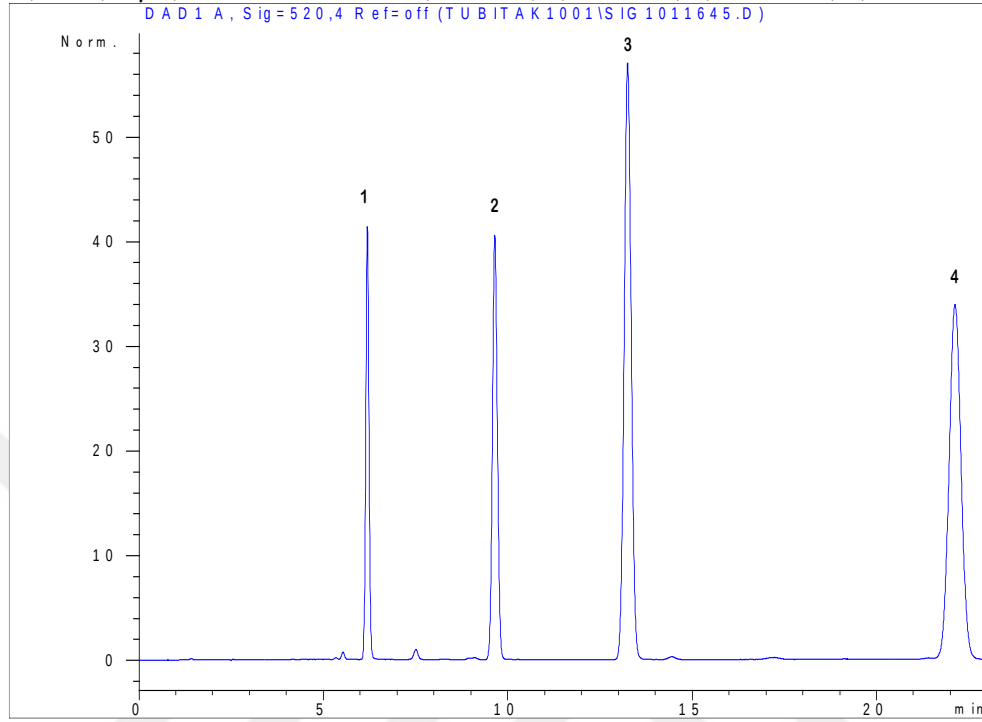
EK21. Alkilbenzenlerin ACE C18 kolonu ile ayrılması. Koşullar: ACN/su: 80/20, 30 °C, 1 ml/dak, 254 nm. Analitler: 1; benzen, 2; toluen, 3; Etilbenzen, 4; Kümen, 5; Butilbenzen, 6; Pentilbenzen.



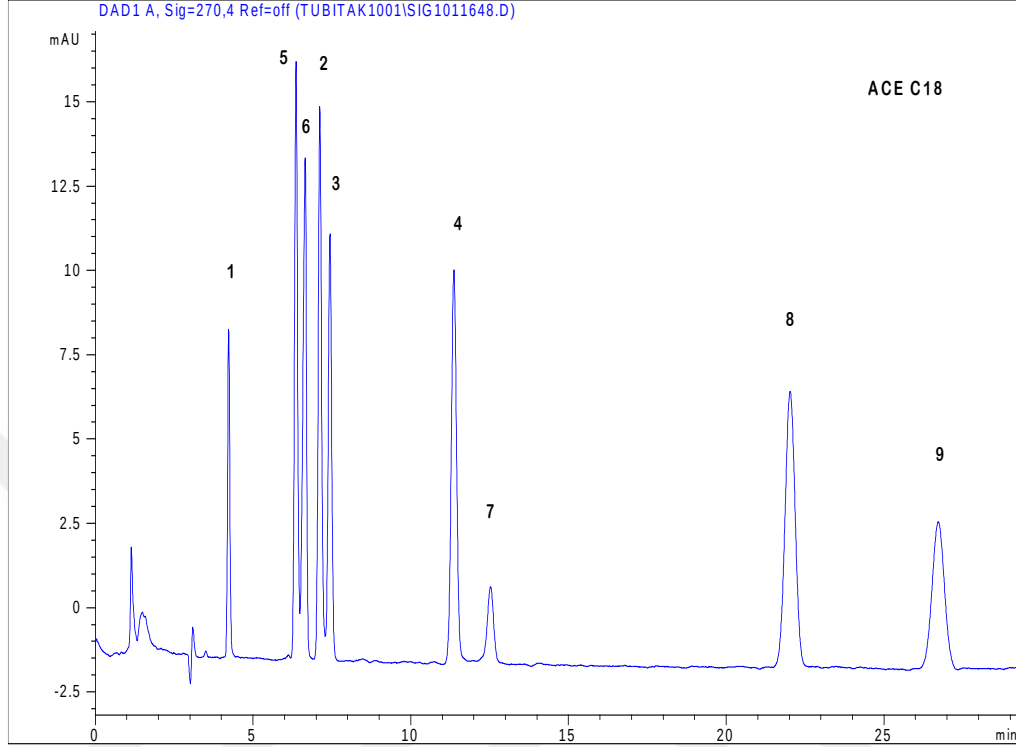
EK22. ACE C18 kolonu ile PAH'ların ayrılması. Koşullar: ACN/su: 80/20, 30 °C, 1 ml/dak, 254 nm. Analitler: 1; Naftalin, 2; Floren, 3; Antrasen, 4; Benzantrasen.



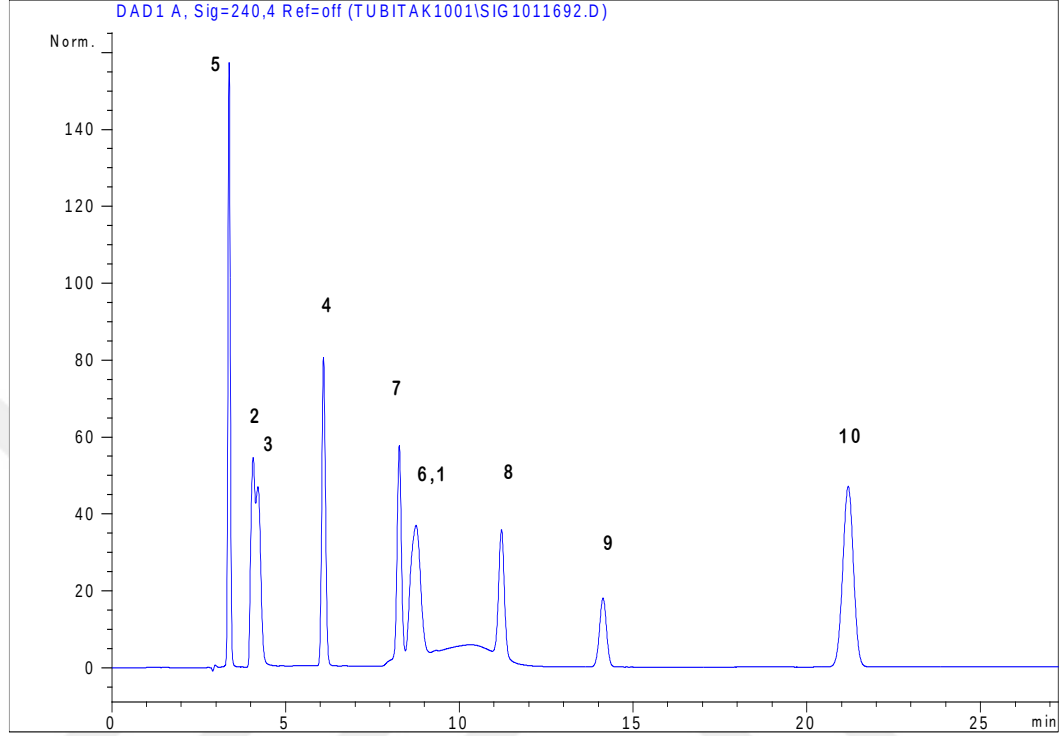
EK23.ACE C18 kolonu ile Sudan Boyalarının Ayrılması. Koşullar: ACN/SU: 85/15, 1,0 mL/dk., 50 C, 2 µL, 520 nm. Analitler: 1; Sudan I, 2; Sudan II, 3; Sudan III, 4; Sudan IV.



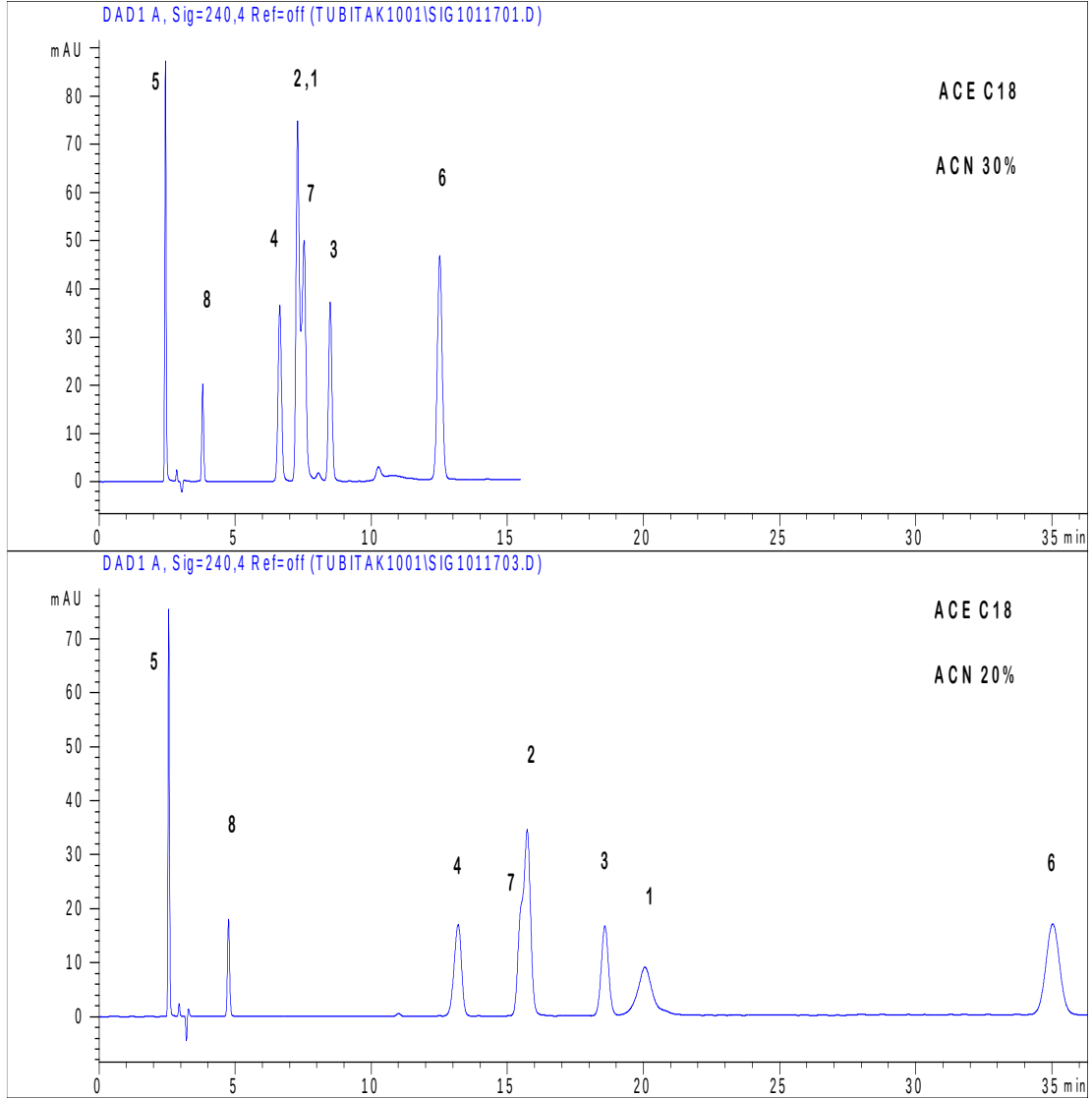
EK24. ACE C18 kolonu ile sübstitüe fenollerin ayrılması. Koşullar: ACN/su: 30/70, 30 °C, 1 dk/dk, 270 nm. Analitler: 1: 2-Aminofenol, 2: Fenol, 3: 3-Metoksi fenol, 4: Salisilaldehit, 5; Siyano fenol, 6; Nitrofenol, 7: ter-bütilfenol, 8: 1- Naftol, 9: 2-Naftol.



EK25. ACE C18 kolonu ile sübstitüe anilinlerin ayrılması. Koşullar: ACN/SU:35/65, 1 ml/dak, 25 °C, 240 nm. Analitler: 1; 4-Aminoanilin, 2; o-fenilendiamin, 3; 2-hidroksianilin, 4; Anilin, 5; 3-Aminoasetanilid, 6; o-Toluidin, 7; p-Toluidin, 8; 2,4-Dinitroanilin, 9; 2-kloro-4-nitroanilin, 10; 4-nitro-2-kloro-anilin.



EK26. ACE C18 kolonu ile benzoik asit türevlerinin ayrılması. Koşullar: ACN/su: 30/70 ve 20/80, 1 ml/dak, 25 °C, 240 nm. Analitler: 1: 3,5-DNS, 2: 3,5-DNB, 3: 4-Nirobenzoik asit, 4: Salisilik asit, 5: Sülfanil asit, 6: 3-Metil benzoik asit, 7: Benzoik asit, 8: PABA.



EK27. (Tablo Ek-27) Bu çalışmada incelenen tüm analitler için hesaplanan QSRR değerleri ve kromatografik parametreler.

	RT order	Analytes	¹ N/m	As ²	LogD	pKa
PAH	1	Naftalen	43773	1,08	2.96	
	2	Floren	29120	1,09	3.74	
	3	Antrasen	24622	1,04	3.95	
	4	Benzantrasen	10793	0,83	4.95	
Alkilbenzen	1	Benzen	43685	1,27	1.97	
	2	toluen	43614	1,25	2.49	
	3	Etilbenzen	38094	1,23	2.93	
	4	Kümen	29422	1,15	3.22	
	5	Butilbenzen	18278	1,03	3.82	
	6	Pentilbenzen	9592	0,80	4.26	
Nükleobaz/Nükleotitler	1	Tiamin	26952	1,17	-0.52	pKa1 = 10.61, pKa2 = 11
	2	Urasil	32421	1,21	-1.06	10.64
	3	Uridin	25295	1,16	-2.42	10.64
	4	Adenosin	22016	1,12	-2.13	pKa1= 5.03, pKa2> 12
	5	Adenin	30971	1,19	-0.58	pKa1= 4.73, pKa2>12
	6	Sitosin	23540	0,99	-1.24	pKa 1= 4.16, pKa2 >12
	7	Sitidin	25222	1,19	-2.80	pKa1= 3.59, pKa2 >12
	8	Guanin	29661	1,15	-1.15	pKa1= 10.70, pKa2 >12
	9	Guanosin	32214	1,14	-2.71	pKa1= 10.60, pKa2 >12
Sudan Boyaları	1	Sudan I	52419	0,97	4.32	
	2	Sudan II	60762	1,01	5.35	
	3	Sudan III	23673	0,82	5.41	
	4	Sudan IV	8229	0,72	6.32	

EK28. (Tablo Ek-27'nin devamı)

	RT order	Analytes	N/m	As	LogD	pKa
Süstitüe fenoller	1	2-Aminofenol	32598	0,81	0.84	10.35
	2	Fenol	36436	1,15	1.67	10.02
	3	3-Metoksifenol	30669	1,12	1.51	9.49
	4	Salisilikaldehit	33665	0,85	2.03	9.00
	5	4-siyanofenol	27756	0,71	1.51	7.81
	6	4-Nitrofenol	5449	0,78	-0.21	7.07
	7	4-ter-butilfenol	17157	0,93	3.21	10.24
	8	1-Naftol	30401	1,08	2.66	9.60
	9	2-Naftol	31522	1,022	2.66	9.78
Benzoik asitl	1	3.5-DNS	30888	1,08	-3.49	pKa1 = 1.57, pKa2 = 4.54
	2	3.5-DNB	39624	1,35	-1.99	2.86
	3	SalA	38856	1,45	-1.52	2.79
	4	4-NitroBA	37252	1,49	-1.87	3.3
	5	Sülfanilik A	41932	1,47	-2.01	3.39
	6	4-aminoBA	40800	1,54	-1.00	4.77
	7	BA	40500	1,57	-1.54	4.20
	8	3-metilBA		1,45	-1.02	4.26
Süstitüe anilinler	1	4-Aminoanilin	11638	0.48	-1.09	Pka1=3.04, pka2=6.46
	2	2-Aminoanilin	34429	1.12	0.13	Pka1=0.56, pka2=4.74
	3	Anilin	44874	1.08	0.99	4.64
	4	3-Aminoasetanilid	37391	1.00	0.34	4.00
	5	o-Toluidin	34868	1.05	1.54	4.48
	6	p-Toluidin	24674	0.91	1.37	4.99
	7	2,4-Dinitroanilin ³		0.87	1.67	-0.81
	8	2-kloro-4-nitroanilin ³		1.10	1.69	0.62
	9	4-kloro-2-nitroanilin ³		0.64	2.33	0.86
	10	4-Butilanilin ³		1.21	2.73	4.91

EK29.

MC SP2 - Adsorption		NLDFT dV/dW
Relative Pressure (P/Po)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	Pore Width (nm)
0,010361	17,0576	1,24731
0,03035	23,4267	1,30082
0,054747	27,5971	1,35432
0,07382	29,9166	1,42566
0,099774	32,4403	1,47917
0,124727	34,5248	1,54338
0,149774	36,3117	1,62898
0,199439	39,5313	1,68606
0,2497	42,4739	1,77166
0,299698	45,3439	1,85727
0,353093	48,3853	1,94288
0,406902	51,6424	2,02849
0,457754	55,0345	2,1141
0,508196	58,9099	2,1997
0,564904	64,7035	2,31385
0,600841	69,637	2,39946
0,651007	79,5356	2,5136
0,702065	95,3419	2,62774
0,763604	129,851	2,74189
0,797906	159,654	2,88457
0,816484	177,857	2,99871
0,861063	203,834	3,14139
0,925577	206,791	3,28407
1,00216	212,943	3,42675
Desorption		3,59797
Relative Pressure (P/Po)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	
1,00216	212,943	3,91186
0,950127	207,209	4,11162
0,893598	206,259	4,28283
0,852892	205,687	4,48258
0,795172	204,864	4,68234
0,718694	181,233	4,88209
0,69718	141,294	5,11038
0,678296	119,117	5,33866
0,629004	84,4176	5,59549
0,578803	69,5393	5,85231
0,473519	55,7187	6,10914
0,420396	51,3289	6,36596
0,379159	48,6703	6,67986

0,359168	47,4144
0,319485	45,0826

6,96522
7,27911

EK30.

BET surface area: 144,1271 m²/g
 Total pore volume: 0,31331 cm³/g
 Micropore volume: 0,01566 cm³/g
 Mezopore volume: 0,29765 cm³/g

BJH Adsorption dV/dD Pore Volume

MC SP2

Pore Diameter (nm)	dV/dD Pore Volume (cm ³ /g·nm)
17,7557	0,000490773
12,7967	0,0160978
10,9523	0,0399054
9,60122	0,0455747
7,79548	0,0421897
6,45906	0,0303349
5,5463	0,021708
4,94317	0,0144655
4,36841	0,00931313
3,84641	0,00419588
3,42432	0,0023261
3,04565	0,0011471
2,7068	0,000464219
2,41457	0,00161297
2,15033	0,00235731
1,89965	0,00606377
1,72964	0,00851992



