



**YENİ KARMA-MOD KOLON DOLGU MADDELERİNİN SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Salih Erkan YENG

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ KARMA-MOD KOLON DOLGU
MADDELERİNİN SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

SALİH ERKAN YENG

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**Haziran-2018
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır**

Bu tez eşim Şükran, oğlum Kaan ve kızım Berrak'a ithafen yazılmıştır.

TEZ KABUL VE ONAYI

Salih Erkan YENG tarafından hazırlanan “YENİ KARMA-MOD KOLON DOLGU MADDELERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması 11./06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Tarık ARAL (Danışman)

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Murat SÜNKÜR

Üye

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim DOLAK

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Bahattin İŞCAN
FBE Müdürü



Bu tez çalışmasının bir kısmı Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırmaya projeleri Koordinatörlüğü (BTÜBAP) tarafından BTÜBAP-2012-FED-3 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Salih Erkan YENG

Tarih: 11.06.2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS YENİ KARMA-MOD KOLON DOLGU MADDELERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Salih Erkan YENG

**Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Tarık ARAL

2018, 68 Sayfa

Jüri

**Doç. Dr. Tarık ARAL
Dr. Öğr. Üyesi Murat SÜNKÜR
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim DOLAK**

Sabit faz, yüksek performanslı sıvı kromatografisi'nin (HPLC) çekirdeğidir, Yüksek ayırma etkinliği ve mükemmel seçiciliğe sahip oluşu daima araştırma konusu olmuştur. Karma modlu sabit fazlı sıvı kromatografisinin, yüksek ayırma seçiciliğinin, kayda değer ölçüde yüksek yükleme kapasitesinin ve yüksek ayırma verimliliğinin olduğu kanıtlanmıştır. Bu sabit fazlar, HPLC'de hazırlama yöntemleri ve uygulama alanlarına göre sınıflandırılır.

Bu tez kapsamında L-isoleusinden yola çıkılarak 2 farklı karma-mod sabit faz sentezlenmiş olup yapıları karakterize edildi. L-isoleusinden 4-fenilbütül amin ve 3-aminoasetanilid ile ayrı ayrı etkileştirilmesini takiben –boc koruyucu grubun kaldırılması ile sırasıyla Ile-PBA ve Ile-AA bileşikler sentezlendi. Amin grubu içeren bu bileşiklerin dimetiloksalatın aşırısı ile etkileştirildiğinde Ile-PBA-DMO ve Ile-AA-DMO bileşikler sentezlendi. Bu iki bileşiğin, 3-aminopropiltrimetoksisilanı takiben HPLC kalitesinde küresel silika jel (5µm-60Å) ile etkileştirilmesi ile sırasıyla Ile-PBA-Mix ve Ile-AA-Mix dolgu maddeleri sentezlendi. Sentezlenen dolgu maddelerinin yapısı element analizi, FTIR, SEM, BET ve katı faz ¹³C NMR ile karakterize edildi. Dolgu maddeleri 250x4.6 mm ölçülerinde boş HPLC kolonlarına doldurularak iki farklı HPLC kolonu hazırlandı. Hazırlanan kolonların bazı kromatografik özellikleri tesbit edilmiş olup veriler tablo halinde verildi.

Anahtar Kelimeler: Karma-mod kromatografisi, Polar sabit fazlar, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, HILIC, Ters faz

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF NEW MIXED-MODE STATINARY PHASES

Salih Erkan YENG

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MECHANICAL ENGINEERING**

Advisor: Doç. Dr. Tarık ARAL

2018, 68 Pages

Jury

Doç. Dr. Tarık ARAL

Dr. Öğr. Üyesi Murat SÜNKÜR

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim DOLAK

Chromatographic stationary phase is the core of high-performance liquid chromatography (HPLC) system. There into, the development of novel stationary phases with high separation efficiency and excellent selectivity has always been the focus of the study. Mixed-mode stationary phases have been proved to be with the merits of high separation selectivity, remarkably high loading capacity, and high separation efficiency. These stationary phases are classified based on the HPLC modes, emphasizing the preparation methods and further applications.

In this work, two novel multifunctional stationary phases based on silica gel was synthesised starting from L-isoleucine. L-isoleucine was reacted with 4-phenylbutylamine and 3-aminoacetilide to obtain boc-Ile-PBA and boc-Ile-AA. Deprotection of these compounds gave Ile-PBA and Ile-AA. These compounds were reacted with dimethyloxalate to obtain Ile-PBA-DMO and Ile-AA-DMO. Following by Ile-PBA-DMO and Ile-AA-DMO were reacted with 3-aminopropyltrimethoxysilane, reacted with spherical silica gel (5µm-60Å) gave Ile-PBA-Mix and Ile-AA-Mi stationary phases. The prepared stationary phases were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy (IR), scanning electron microscopy (SEM), Brunauer Emmett and Teller (BET) and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR). The prepared stationary phases were filled into empty HPLC column (250x4.6 mm) to optained two different HPLC columns. Some chromatographic properties of these new columns were given as tabulated form.

Keywords: Mixed-mode chromatography, Mixed-mode stationary phase, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), Synthesis of amides

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana bıkmadan her koşulda sorularımı sabırla cevaplamaya çalışan, öğrenme isteğimi güdüleyen ve çok yönlü bakış açısı kazandıran sayın hocam Doç. Dr. Tarık Aral'a göstermiş olduğu ilgisinden ve bilgisinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca büyük yardımları ve emeği geçen sayın hocam Arş. Gör. Dr. Hayriye Aral'a çok teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında desteklerini her zaman hissettiğim eşim Şükran YENG'e, oğlum Kaan ve kızım Berrak'a sonsuz teşekkürler...

Salih Erkan YENG
BATMAN-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ.....	2
2.1. Karma Mod Sabit Fazların Hazırlanması	2
2.2. Karma Mod Sabit Fazların Karakteristikleri	3
2.3. Parçacık Temelli Karma Mod Sabit Fazlar.....	3
2.4. RPLC/HILIC.....	3
2.5. RPLC/IEC	11
2.6. HILIC/IEC	18
2.7. Diğer Tür sabit Fazlar	19
2.8. Monolitik Temelli Karma Mod Sabit Fazlar	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Reaktifler ve Materyaller	28
3.2. Kolonların Paketlenmesi.....	28
3.3. Sentez.....	29
3.3.1. N-boc-Ile-PBA'nın sentezi	29
3.3.2. Ile-PBA'nın sentezi : boc grubunun uzaklaştırılması	30
3.3.3. Ile-PBA-DMO'nun sentezi	30
3.3.4. Dolgu Maddesinin Hazırlanması (Ile-PBA-Mix)	31
3.3.5. N-boc-Ile-AA'nın Sentezi.....	31
3.3.6. Ile-AA'nın Sentezi: Boc- grubunun uzaklaştırılması	32
3.3.7. Ile-AA-DMO'nun Sentezi	32
3.3.8. Dolgu Maddesinin Hazırlanması (Ile-AA-Mix)	32
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Yeni Bileşiklerin ve Dolgu Maddelerinin Sentezi	33
4.2. Dolgu Maddelerinin Karakterizasyonu.....	35
4.3. Kolon Stabilite Testleri	39
4.3.1. Ile-PBA-Mix için Stabilite Testi.....	39
4.3.2. Ile-AA-Mix için Stabilite Testleri.....	40
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
6. REFERANSLAR	42

SPEKTRUMLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	56



SİMGELER VE KISALTMALAR

HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
RPLC	: Reversed-Phase Liquid Chromatography (Ters Faz Sıvı Kromatografisi)
NPLC	: Normal-Phase Liquid Chromatography (Normal Faz Sıvı Kromatografisi)
HILIC	: Hydrophilic Interaction Chromatography (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi)
MHPLC	: Mixed-Mode High-Performance Liquid Chromatography Mixed-Mode Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
FTIR	: Fourier transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
DCC	: Dicyclohexylcarbodiimide (Disikloheksilkarbodiimid)
AcOH	: Acetic acid (Asetik asit)
MeOH	: Metanol
EtOH	: Etanol
ACN	: Asetonitril
H	: Heksan
HILIC	: Hydrophilic Interaction Chromatography (Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi)
THF	: Tetrahidrofur
RI	: Refractive index (Kırılma İndeksi)
FL	: Floresan
EC	: Elektrokimyasal
MS	: Mass spectrometric (Kütle Spektrometresi)
SAX	: Strong Anion Exchange (Güçlü Anyon Değişimi)

WAX	: Weak Anion Exchange (Zayıf Anyon Değişimi)
WCX	: Weax Cation Exchange (Zayıf Katyon Değişimi)
SCX	: Strong Anion Exchange (Güçlü Anyon Değişimi)
ODS	: Oktadesil silan
ERLIC	: Elektrostatik itme hidrofilik etkileşim kromatografisi
DCC	: Disikloheksilkarbodiimid
HOBt	: 1-hidroksibenzotriazol



1. GİRİŞ

1960'ların sonlarında, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sabit fazı ve düşük basıncı öngördüğünden dolayı yaygın bir şekilde kabul görmüştür. HPLC çeşitli alanlarda nitel ve nicel tayinlerde kullanılıp ayırma biliminde en popüler ve güçlü tekniklerden biridir. (Zhang ve ark. 2014, Zhu ve ark. 2013, Finessi ve ark. 2014, Zhao ve ark. 2014, Liang ve ark. 2015, Yang ve ark. 2015)

Kromatografik sabit faz, HPLC sisteminin çekirdeğidir. Alıkonma mekanizmaları, ayırma seçiciliği ve kolon etkinliği HPLC sisteminde kullanılan sabit fazlar tarafından belirlenir. (Rajwade ve ark. 2008, Zhang ve ark. 2008, Janas ve ark.2016, Liu ve ark. 2008, Sun ve ark. 2016). Geleneksel HPLC'de sabit fazlar genellikle tekli etkileşim mekanizmasına sahiptir. (Benhaim ve ark. 2008, Jandera ve ark. 2011, Kumar ve ark. 2008, Guo ve ark. 2014, Jiang ve ark. 2014, Gennari ve ark, 2011). Genellikle çok zayıf olsa da ikinci bir etkileşim gözlemlenebilir.

Karma mod (Mixed-mode) sabit fazlar, sabit fazların bir türüdür; (Liu ve ark. 2008, Hinterwirth ve ark. 2010, Liu ve ark. 2010, Liu ve ark. 2012, Liu ve ark.2011) sabit fazlar ile analitler ve en az iki etkileşim bulunmalıdır, her ikisi de analitlerin tutulması içindir. Geleneksel tek modlu sabit fazlar ile karma mod sabit fazları karşılaştırdığımızda oldukça yüksek yükleme kapasitesi ve yüksek ayırma veriminden dolayı karışık mod'un yüksek ayırma seçiciliğinin avantajlarına sahip olduğunu gözlemleriz. (Zhao ve ark. 2015).

Son birkaç yılda, sayısız karma mod sabit faz küçük moleküllerin ve farklı tutma modlarına sahip makromoleküllerin her ikisinin ayrılması için tasarlanmış, hazırlanmış ve hala da kullanılmaktadır.

Sabit fazlar HPLC modlarına dayalı olarak, hazırlanma yöntemlerine ve diğer uygulamalara göre sınıflandırılır. Ayrıca, son zamanlarda gelişen HPLC için monolitik tabanlı karma mod sabit fazlar da mevcuttur. (Yang ve ark. 2011).

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1. Karma Mod Sabit Fazların Hazırlanması

Karma modlu sabit fazların hazırlanması için en önemli adımlardan biri, inorganik silika jel ile organik olarak işlevselleştirilen reaktifler arasındaki köprüdür. Uçta işlevselleştirilmiş propiltrimetoksisilan (PDMS) 3-aminopropiltrimetoksisilan (APS) (Li ve ark. 2011), gibi silan bağlama reaktifleri, 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPS) (Qiao ve ark. 2015), ve 3-kloropropiltrimetoksisilan (CPS) (Sun ve ark. 2013) sıklıkla kullanılır. Genel olarak, karma modlu sabit fazlar hazırlamak için üç önemli yöntem vardır.

Birinci yöntem, organik olarak işlevselleştirilen reaktiflerin, trimetoksisilil ile etkileştirilmesi ve sonra da organik ligandla modifiye edilmiş propiltrimetoksisilan (PTMS)'ın silika gel ile muamele edilmesidir. Böylece, yeni organik ligand doğrudan silika yüzeyine bağlanmış olur (Aral ve ark. 2015). Ara maddeleri sıklıkla trimetoksisilil olan organik fonksiyonize reaktiflerin saflaştırılması ve izolasyonu genellikle gereklidir. Dahası, trimetoksisilil sonlu olan organik fonksiyonize reaktiflerin çözünürlüğünün bilinmemesi sonraki aşamalarda uygun çözücülerin seçimini zorlaştırmaktadır. (Zhang ve ark. 2014)

İkinci yöntem, silikanın öncelikle PTMS ile etkileştirilmesidir. Sonra, organik olarak fonksiyonize edilmiş reaktifler doğrudan silika yüzeyine aşılanırlar. En sık kullanılan PTMS reaktifi aminopropilsilan (APS)'dir. Organik olarak işlevselleştirilmiş reaktifler, reaktif anhidrit (Li ve ark.2011), metil ester (Hu ve ark.2013), karboksil (Ray ve ark.2012) veya epoksi grupları (Li ve ark.2014) aminosilika yüzeyine direkt olarak bağlanabilir. İkinci yöntemde susuz ortamda reaksiyon gerçekleştiği için, nispeten birinci yöntem daha basittir. (Zhang ve ark.2015)

Üçüncü yöntem, silikanın ilk önce MPS ile etkileştirilmesidir. Sonra organik fonksiyonize reaktifler alil veya vinil reaktif gruplarla, “ thiol-ene” click kimyası (Qiao ve ark.2014) ya da yüzeysel başlamış radikal zincir transfer reaksiyonu (Qiu ve ark.2012) merkaptosilika yüzeyine bağlanır. Bu yöntem ikinci yöntemden daha çok benzetilmektedir. Bununla birlikte, üçüncü yöntemin bağlanma miktarı genellikle önceki iki yöntemden daha yüksektir çünkü; her MPS tarafından organik olarak daha da işlevselleştirilen bir reaktif merkaptosilika yüzeyinde birden fazla polimerize edilebilir. Dahası, klasik alkin-azid Huisgen reaksiyonu ile karşılaştırıldığında, bu metod için hazırlanan evreler hareketsiz metal iyonlarının tortulaşmasını önleyebilir.

(Liu ve ark.2012) Bu metodun tek sakıncası polimerleşme dercesini kontrol etmenin kolay olmamasına ek olarak merkaptosilika ve alkenil grupları arasında eş zamanlı reaksiyon meydana gelmesidir. (Zhang ve ark. 2015, Qiao ve ark. 2014, Qiu ve ark. 2012, Liu ve ark.2012, Shi ve ark. 2015)

2.2. Karma Mod Sabit Fazların Karakteristikleri

Karma mod sabit fazlar sık olarak birçok farklı özellikteki çoklu gruplarla dizayn edilir. Örneğin; ters fazlı sıvı kromatografisi sabit fazları (RPLC), sıkça hidrofobik alkanlar (Qiao ve ark.2015, Wang ve ark. 2015,Cai ve ark. 2012), aromatik imidazol gruplar (Liu ve ark. 2015, Sun ve ark. 2014), azobenzenler (Qiu ve ark. 2013), kaliks (Zhao ve ark. 2014) arenler (Hu ve ark.2013,Lu ve ark.2014), dizayn edilince, hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografinin sabit tipli fazları (HILIC), sıkça polaramidler (Aral ve ark. 2015, Ohshima ve ark. 2015) , anilinler (Iverson ve ark. 2014), tersiyer amonyum (Qiao ve ark. 2015, Li ve ark. 2011, Liu ve ark. 2015, Qiao ve ark. 2015) , aminoasitler (Li ve ark. 2011) , polisakkaritler (Lu ve ark. 2014, Liang ve ark. 2015) ve/veya hidroksil gruplara (Wang ve ark. 2015) sahiptir. Ayrıca, üçüncül aminler, kuaterner amonyum gruplar (Jin ve ark. 2015, Zimmermann ve ark. 2015) veya karboksil grupları (Cai ve ark. 2012, Yang ve ark. 2015) oluşturan durağan fazlar, sıklıkla iyon değişim kromatografinin (IEC) alıkonma karakteristiğini yansıtır. Aslında karma mod sabit fazların çoğu, karma modla ayrılabilen farklı gruplara gömülüdürler.

2.3. Parçacık Temelli Karma Mod Sabit Fazlar

Parçacık temelli karma modlu sabit fazlar, geçtiğimiz yıllarda genişçe raporlandı, aynı zamanda bu sabit fazların hepsi silika jel temelinde hazırlandı. HPLC tiplerinin temelinde, bu sabit fazlar şu şekilde sınıflandırılabilir; RPLC/HILIC, RPLC/IEC, ve HILIC/IEC.

2.4. RPLC/HILIC

HILIC sıkça güçlü polar bileşikler ayırmada kullanılırken, RPLC çoğunlukla orta ve zayıf polar analitleri ayırtmada kullanılır. Böylece, karma-mod RPLC/HILIC (Gargano ve ark.2013) hem RPLC hem de HILIC'in eksikliklerinin üstesinden gelerek polar ve nonpolar analitlerin eşzamanlı ayrılması için kullanılabilir. Yakın zamanda bildirilen RPLC/HILIC sabit fazlar tablo 1 de özetlenmiştir.

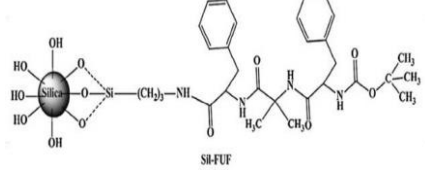
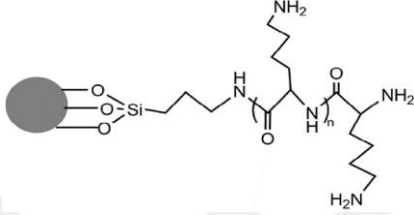
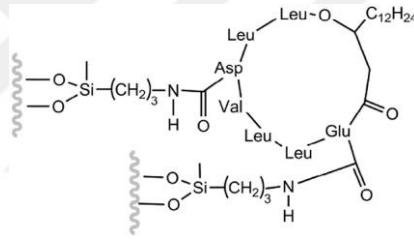
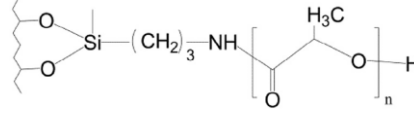
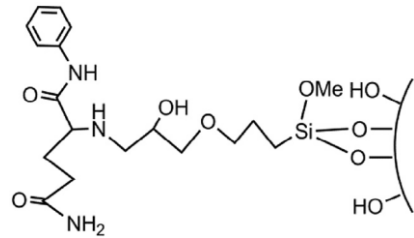
Amino asit/peptid ile değiştirilmiş silika karma mod RPLC/HILIC sabit fazların (Ray ve ark.2012) geniş bir kategorisidir. Örneğin; Zhang ve arkadaşları (Li ve ark.2011), bir poli-*L*-lizin ile aşılınmış silis bazlı sabit faz rapor etmiştir. Önce, trifosjen ile Cbz-*L*-lizin reaksiyonu yoluyla Cbz-*L*-lizin N-karboksihidrüer monomeri sentezlendi. Daha sonra, hazırlanan dehidrasyon-kondensasyon reaksiyonu yoluyla N-karboksihidrit monomeri aminosilika yüzeyine doğrudan bağlanmıştır. Çünkü, yeni sabit faz hem polar gruplara / terminal amin gruplarına hem de hidrofobik alkil zincirlerine sahip olduğundan, karma mod RPLC ve HILIC ayrımı eşzamanlı olarak gerçekleştirilebilir. Bu fenollerin, anilinlerin ve hidrofilik bileşiklerin ayrılması için başarıyla kullanılmıştır. Sürfaktin, yedi amino asitten ve bir β -hidroksil yağ asidinden oluşan bir siklik heptapeptid'dir. Sürfaktin'in hidrofobik ve hidrofilik kısımları, karma mod RPLC / HILIC sabit fazının hazırlanması için potansiyel bir aday haline getirir. Kuroda ve arkadaşları (Ohyama ve ark.2014) aminosilika ve peptidler üzerindeki karboksil grupları arasındaki amid bağı oluşumu vasıtasıyla RPLC / HILIC için sürfaktan ile modifiye edilmiş silika bazlı bir sabit faz hazırladı. Bu, karma mod sabit bir faz hazırlamak için, biyosürfaktan kullanımını bildiren ilk çalışmadır. Ayrıca, poli (*L*-laktik asit) modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz, aynı grupta ayrıca hazırlandı (Ohyama ve ark.2015). Poli (*L*-laktik asit)-modifiye sabit fazın önemli bir karakteristiği karboksil gruplarının güçlü π - π etkileşimi ile elektrostatik bir kaynak olarak çalışabilmesidir. Yüksek verimlilik nedeniyle, polisiklik hoş kokulu hidrokarbonların (PAHs) tanınması için daha uygundur.

Aral ve çalışma arkadaşları (Aral ve ark. 2015) sabit faz yeni bir amid silika sentezlediler. Yeni sabit faz, fenil halkasında bağılı bir amid grubu, polar olmayan alkil / fenil grupları ve polar terminal amid grubu ile tasarlandı. Böylece, RPLC modunda fitohormonlar / fenoller ve HILIC modunda nükleotidler / nükleosidler ayrılması için kullanılabilir. Ayrıca, mobil fazın yüksek / düşük pH derecelerinde iyi tolerans gösterdi. Örneğin; 2,4'lük pH'lı 1.000 katlık sütun hacmi sütundan hareketli faz sürekli pompalanmasına rağmen, adenin muhafaza edilmesinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Yeni sabit fazın bir sabit fazın hazırlama prosedürünün biraz zaman alması ve dört adımda gerçekleşmesi bir dezavantajdır.

Glikozitler, RPLC / HILIC sabit fazlarının hazırlanması için de kullanılabilir. Örneğin, Liang ve arkadaşları (Liang ve ark. 2015). ribodiyozit A- modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz hazırladılar.

Tablo 1

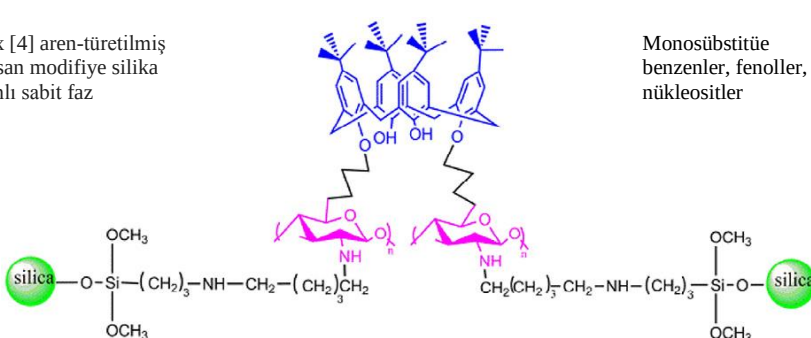
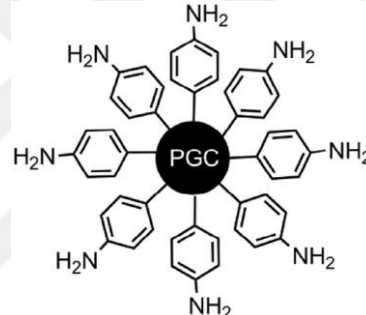
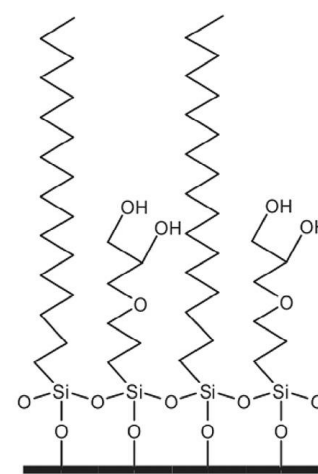
Karma mod RPLC/HILIC sabit fazlar (Zhang ve ark. 2016)

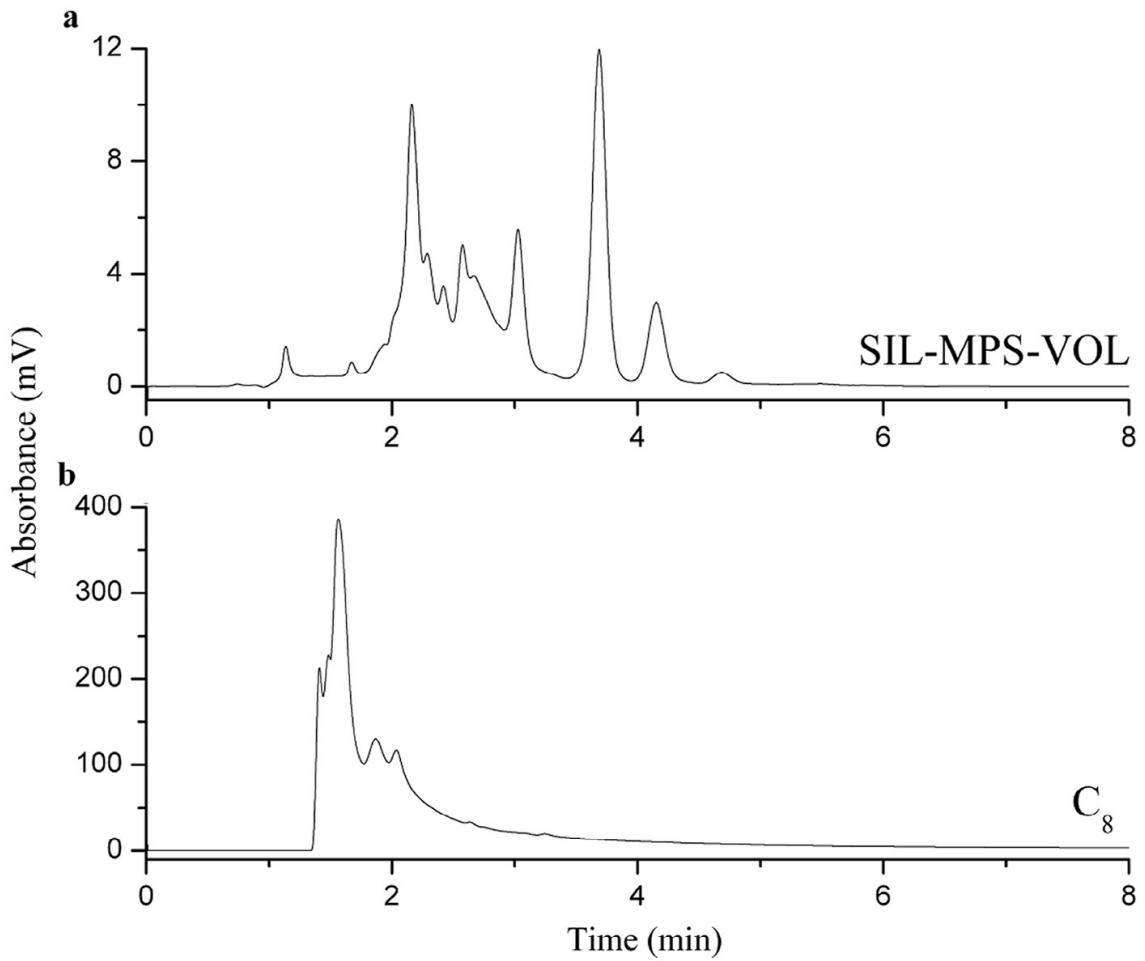
Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
Peptid Boc-Phe-Aib-Phe-OH-modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		Alkilbenzenler, PAHlar, steroidler, kiral bileşikler, nükleobazlar, nükleozitler, sülfür esaslı ilaçlar	Adenozin için 53.000 tabaka / m	[30]
Poli-L-lisin ile değiştirilmiş silika tabanlı sabit faz		Fenoller, anilinler, hidrofil bileşikler	-	[25]
Surfaktin ile modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		Alkilbenzenler, nükleik asitler, nükleozitler, vitaminler, ksantinler	Polar bileşikler için 2300-11.000 tabaka / m	[54]
Poli (L-laktik asit) modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		Alkilbenzenler, PAHlar, nükleik asitler, nükleozitler, vitaminler, ksantinler	-	[37]
Amid silika tabanlı sabit faz		Nükleotidler, nükleozitler, fitohormonlar, fenoller	-	[28]

(Devamı bir sonraki sayfada)

Tablo 1 (Devamı)

Karma mod RPLC/HILIC sabit fazlar (Zhang ve ark. 2016)

Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
Calix [4] aren-türetilmiş Kitosan modifiye silika tabanlı sabit faz		Monosüstitüe benzenler, fenoller, nükleositler	-	[42]
Anilin ile modifiye edilmiş PGC tabanlı Sabit faz		Fenoller, nükleobazlar, karboksilik asitler, temel ilaçlar	-	[38]
C ₁₈ -diol ile modifiyeli silika tabanlı sabit faz	 C18-Diol	Nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar, Tanaka test karışımı, nükleositleri, nükleobazlar, temel ilaçlar, L. japonica karışımı	-	[44]



Şekil 1. *Trichoderma*'nın sekonder metabolitlerinin yüksek polar bileşeninin imidazolium ile gömülü C₈ kolonu üzerinde ayrılmış kromatogramları (a) ve piyasadan temin edilebilir C₈ kolonu (b)'dan basıldı).

Ribodiyozit A'nın terminal alkeni, merkaptosilika yüzeyine “tiol-en” click kimyası üzerinden tek seferde direkt bağlanabilir. Yeni durağan faz, ticari olarak temin edilebilen diol kolonuna kıyasla daha güçlü bir hidrofilik özellik gösterdi ve amino kolonu ile farklı seçicilik sergiledi. Geliştirilen yeni fazın önemli bir kullanımında “*Lycopus lucidus* Turcz”dan elde edilen oligosakkaritlerin ayrıştırılmasındaki verimdir.

Son zamanlarda iyonik sıvılardan, karma mod RPLC/HILIC sabit fazları hazırlamak için faydalanılmaktadır. Örneğin; (Zhang ve ark. 2011) beş hoş aromatik bileşik ve altı suda çözünen vitaminlerin RPLC/HILIC ayrıştırması için imidazolin tipi silika temelli sabit faz hazırladılar. Qiao ve grubu merkaptosilika yüzeyinde 1-vinil-3-bütylimidazolium L-laktatın tek seferde aşılansıyla yeni bir imidazolium-gömülü C₈-bazlı sabit faz hazırladı (Qiao ve ark.2015). Yeni sabit fazın önemli uygulaması,

Trichoderma'nın ikincil metabolitinin polarlığı yüksek olan komponentini ayrıştırmasıdır, çünkü bunun içinde biyolojik çeşitliliği olan aktif maddeler patojenik bitki mantarlarına antagonize, bakteri ve böcek antagonistiği vardır. Şekil 1.a da görüldüğü gibi, geliştirilen sütun kullanıldığında nispeten yüksek seçicilik ve çözünürlük ile yaklaşık 10 pik görülebilir. Ancak, ticari olarak bulunan C₈ kolonu kullanıldığında sadece bir ana pik görüldü (şekil 1.b) Sonradan, hem hidrofilik hemde hidrofobik bileşikler ayrıştırmak için imidazolium gömülü N,N-dimetilaminopropil ile fonksiyonize edilmiş silika tabanlı sabit fazda hazırlandı. Nükleozidlerin ve nükleik asit bazlarının ayrılması için geliştirilen kolonun verimliliği 58.000 plaka / m ulaştı (Liu ve ark. 2015).

En sık kullanılan monokatyonik ILS, dikatyonik ILS, ve trikatyonik ILS iyonik sıvıların eş zamanlı olarak iki veya üç pozitif yüklü parçacıkla karşılaştırıldığında, anyonik ve katyonik kısımların ayarlanmasıyla daha geniş bir fizikokimyasal özellik serisine sahip olabilir. Shi ve arkadaşları (Qiao ve ark.2015) trikatyonik IL-modifiyeli silika tabanlı sabit fazlar hazırlamak için daha fazla yararlandılar. İlk önce, 1,3,5- {tris (3-vinylimidazolyum) metil} mesitylenetris (bis (triflorometan) -sülfonimid) ve 1,3,5- {tris (3-vinylimidazolyum) metil} benzenetris(bis (triflorometan) sülfonimid) iki aşamada sentezlendi. Daha sonra, elde edilen trikatyonik IL'ler merkaptosilika yüzeyine doğrudan aşılmiştir. Geliştirilen kolonların tipik bir uygulaması flavonoidlerin ayrılmasıdır. Flavonoidler, benzer yapılara sahip geniş sayıda glikozit ve şeker içeren fenolik anti-oksidanların geniş bir kategorisidir. Bu nedenle, konvansiyonel kolonlarla, verimli biçimde ayrıştırmak oldukça zordur.

Geliştirilen kolonlarla, soya fasülyesinden elde edilen flavonoidlerin ayrıştırılması yüksek verimle başarıldı. İmidazolium ILS modifiyeli iyonik sıvı sabit fazların büyük bir avantajı da, imidazolium ILS iyonik sıvılar tarafından sağlanan çoklu etkileşimlere bağlı olarak yüksek şekil ve düzlemsel seçiciliktir. Örneğin; 6 dakika içinde o-terfenil, m-terfenil ve trifenilin (R: 3.09 ve 4.35) geliştirilen 1-vinil-3-bütilimidazolium L-laktat ile modifiyeli sabit fazla elde edildi. Ancak, aynı ayrıştırma zaman aralığında ticari olarak elde edilen C₈ kolonunu kullanınca, o-terfenil ve m-terfenil/trifenilinin in R değeri m-terfenil ve trifenilin pikleri üst isteyken sadece 0,92 idi.(Qiao ve ark. 2015)

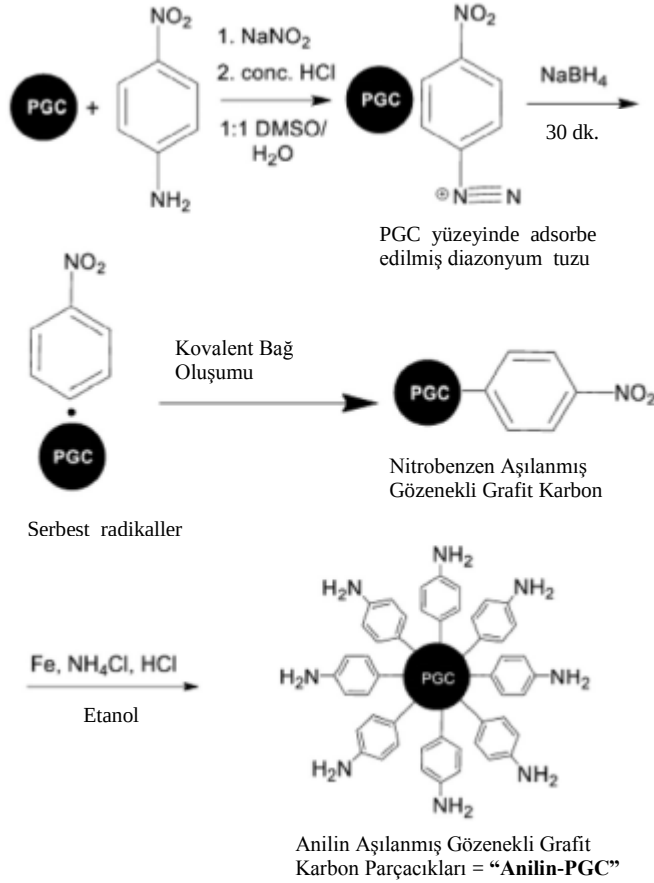
Benzen türevleri de aynı zamanda karma mod RPLC/HILIC sabit fazlarını hazırlamak için kullanılabilir.(Qiu ve ark.2013) sülfonik azobenzen ile polimerize olmuş silika tabanlı sabit bir fazı iki aşamada dizayn edip, hazırladılar. İlk olarak, p -

[(aminofenil) azo] benzensülfonik asidin 2-izosiyanatoetil metakrilat ile reaksiyona sokulması yoluyla polimerize olabilen sülfonik azobenzen monomeri hazırlandı. Ardından, hazırlanan monomer doğrudan merkaptosilisin yüzeyine aşıldı. Yeni sabit faz güçlendirilmiş RPLC'de steroidlerin ayrılması için seçicilik gösterdi. Ayrıca HILIC'de nükleotidlerin ve bazların başarılı bir şekilde ayrılması da sağlandı.

Lu ve grubu bir kaliks hazırladılar; bu sabit faz, mono-substituted benzenlerin, fenollerin ve nükleositin ayrılması için aren-türevli kitosan-bağlı silika tabanlı bir sabit fazdı (Lu ve ark. 2014). Ancak hazırlık prosedürleri biraz zaman alıcıdır, altı aşamada gerçekleşir.

(Iverson ve ark. 2014). Gözenekli grafit karbona (PGC) dayanan anilin ile modifiye edilmiş sabit faz hazırlamak için kullanıldı. Şekil 2 de gösterildiği gibi, önce, 4-nitroanilin diazonyum tuzu PGC'nin yüzeyi üzerine adsorbe edildi, ardından PGC ile kovalent bağ oluşturmak üzere sodyum borhidrit ile indirgendir. Daha sonra, 4-nitroanilin, nitro grubu demir tozu ile daha da indirgenerek anilin ile modifiye edilmiş PGC'ye dayalı sabit faz elde edildi. Anilin gruplarından PGC matrisine geliştirilen sabit faz, hem HILIC hemde zayıflamış RPLC tutma özelliklerini göstermiştir. Yeni kolonun seçiciliği nükleobazların ayrılması için seçiciliği diğer 10 HILIC kolonundan farklıydı. En önemlisi, PGC matrisinin yüksek pH kararlılığından (0-14 pH aralığında bile olsa) yararlanan geliştirilmiş sabit faz, düşük pH'da (pH 2,0 gibi) mükemmel dengeleme ile ayrılmak için kullanılabilir.

Wang ve ark. (2015) Oktadesil-triklorosilan (OTS) ve γ -glisidoksipropiltrimetoksisilan (GOPS) ile ikili fonksiyonlu olarak C₁₈ ve diol (C₁₈-Diol) grubu modifiye edilmiş silika bazlı faz hazırladılar. Polar eter ve tiyol gruplarının eklenmesinden dolayı geliştirilen sabit faz, saf sulu, hareketli fazda çalıştırıldığında klasik C₁₈ sabit fazın ıslanmayı önleme özelliğini engelleyebilir. Bu nedenle, polar bileşiklerin %100 sulu fazda, yüksek stabilite ile ayrışmasında kullanılabilir. Ek olarak dahil edilen diol grupları artık silanollerin aktivitesini redüklemeyebilir, bu da temel analitlerin ayrışması için pik şekli geliştirir



Şekil 2. Anilin ile fonksiyonelize edilmiş PGC bazlı sabit faz hazırlanması için şematik diyagram.

2.5 RPLC/IEC

IEC sıklıkla, iyonik bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılır. IEC/RPLC 2D-LC sistemi geniş olarak proteom araştırmasında kullanıldı.(Qiao ve ark.2011).Apaçık görüldü ki karma mod sabit fazların geniş uygulama alanları vardır. Genel olarak, elektrostatik etkileşimli polar gruplar, RPLC/IEC sabit fazları hazırlamak için RPLC materyallerinin yüzeyine tutturulur. Geçtiğimiz sürede, RPLC/IEC sabit fazları, RPLC anyon içeren değişim kromatografi (AEX) ve RPLC katyon değişim kromatografi (CEX) sabit fazları tablo 2 deki gibi özetlendi.

İmidazol temelli türevler, karma tip RPLC/AEX sabit fazları hazırlamak için geniş bir seçici sınıftır.(Sun ve ark. 2009) , bir poli (1-alkil imidazol) aşılantı silika bazlı durağan faz tasarladı. İlk olarak, bir terminal trimetoksisilil grubu olan poli (1-alkil imidazol)u, 1-metilimidazol ile MPS'nin reaksiyonu ile hazırladılar. Daha sonra, elde edilen poli (1-alkil imidazol) doğrudan silika yüzeyine aşılantıdır. Yeni sabit fazın bariz bir özelliği, kalıntı silanoller ve imidazolün azot atomu arasındaki hidrojen

bağının oluşturulması nedeniyle geliştirilmiş pik şekli, büyük sterik engelin yanı sıra elde edilebilmesidir. Böylece, silanollerin olumsuz etkisi azaltılabilir. Ayrıca geliştirilen sabit faz, ARC tipinde inorganik anyonların ayrılması için kullanılabilir. Aynı grupta, inorganik anyonların ayrılması için benzimidazol ile modifiye edilmiş silika bazlı sabit faz hazırlandı ve kolon verimliliği 67.200 tabaka/m ye ulaştı.(Sun ve ark.2013)

(Sun ve ark.2014), dikatyonik imidazolium IL ile karma mod RPLC/AEX durağan fazı hazırlamak için faydalandılar. İlk önce IL-1,1'-(1,6-heksandiol) bis (1-vinylimidazolium) bromür, 1-vinylimidazolün 1,6-dibromoheksan ile reaksiyona sokulması yoluyla sentezlendi. Daha sonra, elde edilen IL doğrudan merkaptosilika yüzeyine aşılarmıştır. Dikasyonik IL-modifiyeli sabit faz, monokasyonik IL-modifiyeli sabit faz dan daha fazla etkileşim alanı sağladığından arttırılmış ayırma seçiciliği elde edilmiştir. Yeni durağan faz, PAH ların anilinlerin ve organik/inorganik anyonların ayırması için başarıyla kullanıldı.

Karma modlu HPLC / ALEX sabit fazlar hazırlamak için, Calixarene (Zhao ve ark.2012) tabanlı türevler daha fazla kullanılmıştır.(Hu ve ark.2013) 25,27-bis (L-fenilalanin metil ester-N-karbonilmetoksi)-26,28-dihidroksi-para-tert bütilkalsiks [4] arene modifiyeli silika tabanlı sabit faz geliştirdiler. Önce, fenilalanin ile süstitüe edilmiş kaliksarenler, L-fenilalanin metil eter hidroklorür ile kaliks [4] aren diasetik asit klorür reaksiyonu yoluyla sentezlendi. Sonra, elde edilen fenilalanin-süstitüe kaliksaren doğrudan aminosilika yüzeyine aşılandı. Ticari olarak karşılaştırıldığında piyasada mevcut bulunan C₁₈ kolonuna göre, geliştirilen sabit faz silika yüzeyindeki artık silanollerin etkili şekilde sınırlandırılması nedeniyle bazik bileşikler için mükemmel simetrik pik sergiledi. Ayrıca geliştirilen sabit faz, toz haline getirilmiş bebek maması formülünde, melamin'in mantar dışı katkı maddesinin hızlı ayrılması ve tespiti için reaktifler veya tampon çözeltisi iyon çifti eklenmeden mobil fazda kullanılabilir. Aynı grupta, Şekil 3'te gösterildiği gibi hazırlanmış V-şekilli bir bis (tetraoksa kaliks [2] aren [2] triazin) modifiye edilmiş silika bazlı sabit fazlar hazırlandı. Hidrojen bağlama, hidrofobik, n- π ve π - π etkileşimleri gibi çoklu mekanizmalar yeni sabit faz tarafından üretilebildiğinden, alkilbenzenler, benzen türevleri, flavonoidler ve inorganik anyonlar da dahil olmak üzere çeşitli bileşikler başarıyla ayrılabilir. Aynı zamanda geliştirilen durağan faz da hayvan idrarında clenbuterol analizi için kullanılabilir. Bununla birlikte, geliştirilmiş sabit fazın kolon verimliliği, benzen için 11,300 tabaka / m'den biraz daha düşüktür.(Hu ve ark.2014)

Tablo 2

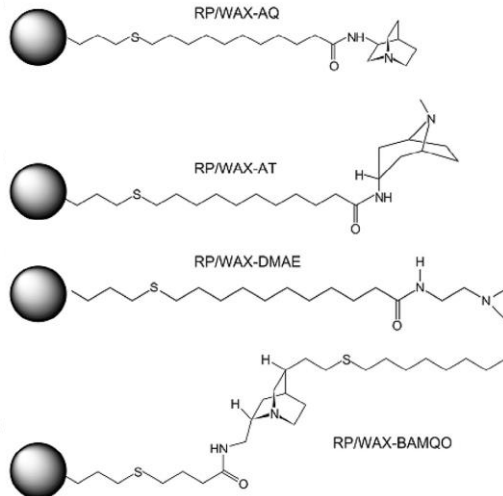
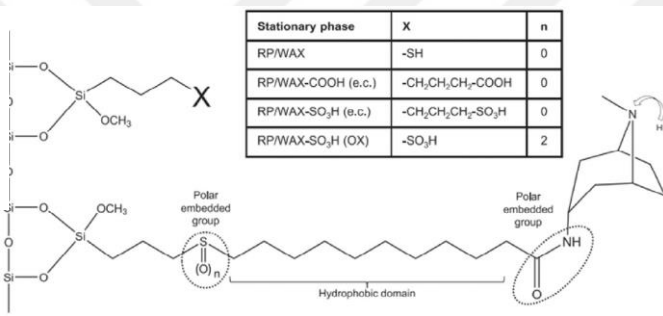
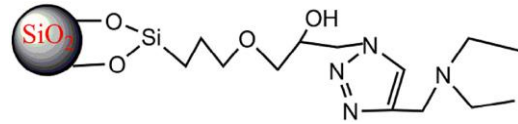
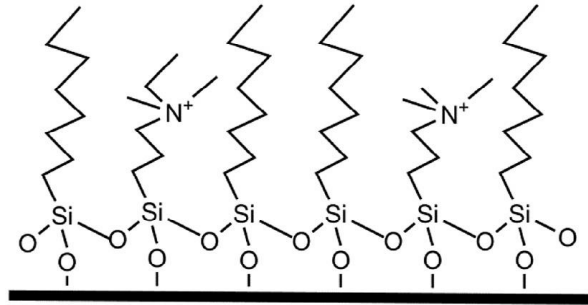
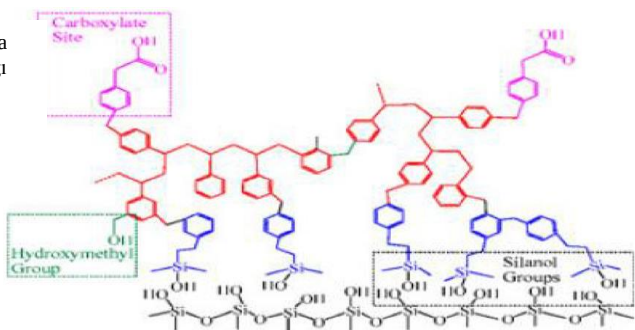
Karma mod RPLC/IEC sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
Poli (1-alilimidazol) modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		PAH, anilinler, fenoller, inorganik anyonlar	PAH'lar için 17.400-23.600 tabaka / m	[56]
Benzimidazol ile değiştirilmiş silika tabanlı sabit faz		PAH'lar, ftalatlar, anilinler, fenoller, inorganik anyonlar, organik anyonlar	inorganik anyonlar için 51.300-67.200 tabaka / m	[27]
Dicationic imidazolium IL modifiye silika tabanlı sabit faz		PAH'lar, anilinler, inorganik anyonlar, organik anyonlar	inorganik anyonlar için 43.700 tabaka / m	[44]
PHE-Cx4 modifiye silika tabanlı sabit faz		PAH'lar, anilinler, fenoller, Tekli süstitüe benzenler, Tanaka test karışımı, flavonoidler, fluorokinolonlar, melamin içinde toz bebek formül	-	[29]
V-şekilli bis (tetraoksakaliks [2] aren [2] triazin) - modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		Alkilbenzenler, benzen türevleri, flavonoidler, inorganik anyonlar, hayvan idrarında clenbuterol	Benzen için 11,300 tabaka/ m	[58]
Decaaza -siklofan modifiye edilmiş Silika tabanlı sabit faz		Alkilbenzenler, inorganik anyonlar, süt örneğinde triazinler	Toluen için 28.000 tabaka / m	[59]
N- (10-undesenoil) -3-aminokuinuklidin modifiye silika tabanlı sabit faz		Peptitler	-	[60]

(Devamı bir sonraki sayfada)

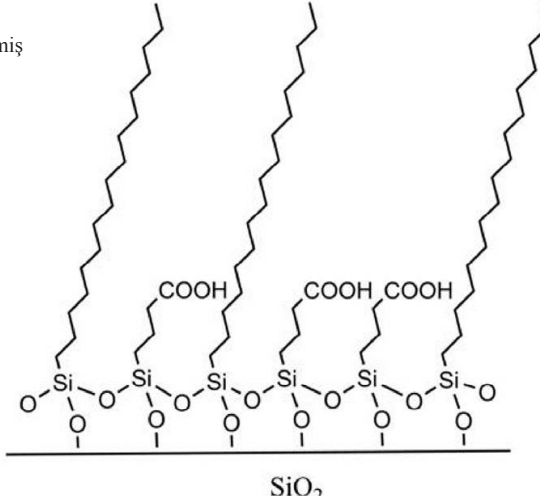
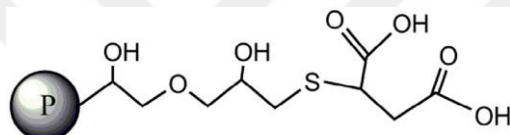
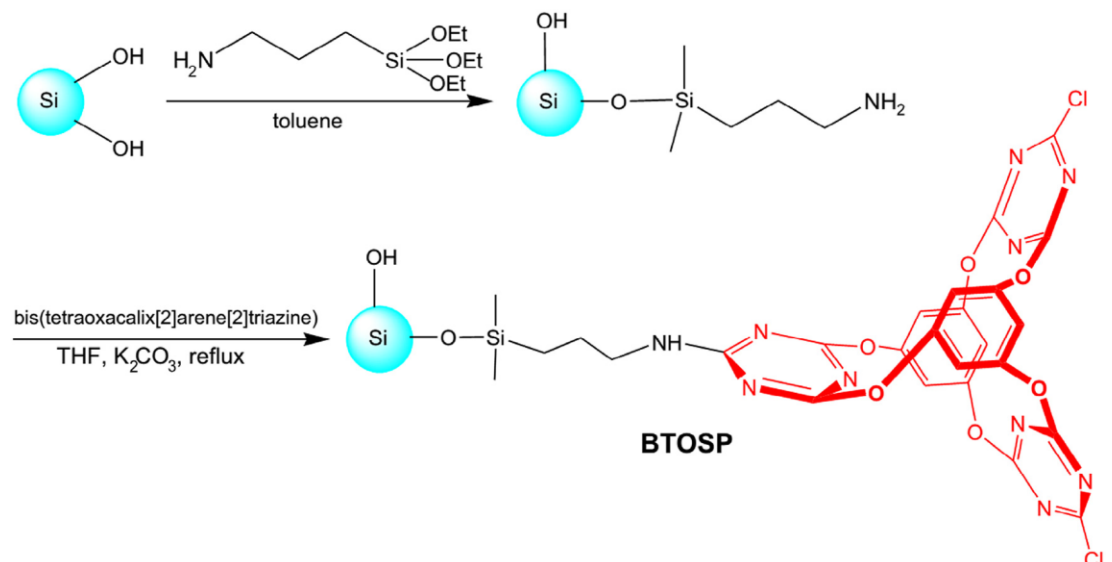
Tablo 2 (Devamı)

Karma mod RPLC/IEC sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans															
(a) N-undekanoil-3-aminoquinuclidine, (b)N- (10-undekanoil) -3-aminotropane, (c) N, N-dimetil-N-10-undekanoil-1,2-etandiamin ve (d) N-butanoil-(2S, 4S, 5R) -2-aminometil-5 -[(2-oktiltiyo) etil] -kinuklidin değiştirilmiş silika tabanlı sabit fazlar		Alkilbenzenler, ksantinler, nükleozitler, vitaminler	-	[50]															
Polar gömülü N-undekanoil) -3-aminotropan ile modifiye edilmiş silika tabanlı sabit fazlar	 <table><thead><tr><th>Stationary phase</th><th>X</th><th>n</th></tr></thead><tbody><tr><td>RP/WAX</td><td>-SH</td><td>0</td></tr><tr><td>RP/WAX-COOH (e.c.)</td><td>-CH₂CH₂CH₂-COOH</td><td>0</td></tr><tr><td>RP/WAX-SO₃H (e.c.)</td><td>-CH₂CH₂CH₂-SO₃H</td><td>0</td></tr><tr><td>RP/WAX-SO₃H (OX)</td><td>-SO₃H</td><td>2</td></tr></tbody></table>	Stationary phase	X	n	RP/WAX	-SH	0	RP/WAX-COOH (e.c.)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -COOH	0	RP/WAX-SO ₃ H (e.c.)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -SO ₃ H	0	RP/WAX-SO ₃ H (OX)	-SO ₃ H	2	Alkilbenzenler, nükleozitler, fenilalanin ve türevleri, triptofan ve türevleri	-	[51]
Stationary phase	X	n																	
RP/WAX	-SH	0																	
RP/WAX-COOH (e.c.)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -COOH	0																	
RP/WAX-SO ₃ H (e.c.)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -SO ₃ H	0																	
RP/WAX-SO ₃ H (OX)	-SO ₃ H	2																	
3-Dietilamino-1-propin modifiye Silika tabanlı sabit faz		Model Proteinler	-	[64]															
XCharge C8SAX değiştirilmiş silika tabanlı sabit faz		Antosiyanin izomerleri	Antosiyanin izomerleri için 40.000 tabaka / m	[50]															
Karboksil grubuna özgü polistiren ağı modifiye silika tabanlı sabit faz		Temel ilaçlar	-	[66]															

Tablo 2 (Devamı)

Karma mod RPLC/IEC sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
C18WCX ile modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz		Model peptitleri, model proteinlerinin triptik sindirimleri, fare beyninin çözünebilir protein fraksiyonunun triptik özümleri	Etilbenzen için 55.800 tabaka / m	[45]
Çift fonksiyonlu polimer tabanlı Sabit faz		Model proteinler, rekombinant insan interferonu -γ	-	[52]
 BTOSP				

Şekil 3. V-şekilli bis (tetraoksa kaliks [2] aren [2] triazin) modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz hazırlanması için şematik diyagram.

Ayrıca, bir dekaaza-siklofana dönüştürülmüş silika temelli sabit fazlar, aynı grupta süt numunesindeki triazin tayini için hazırlanmıştır. (Hu ve ark.2015)

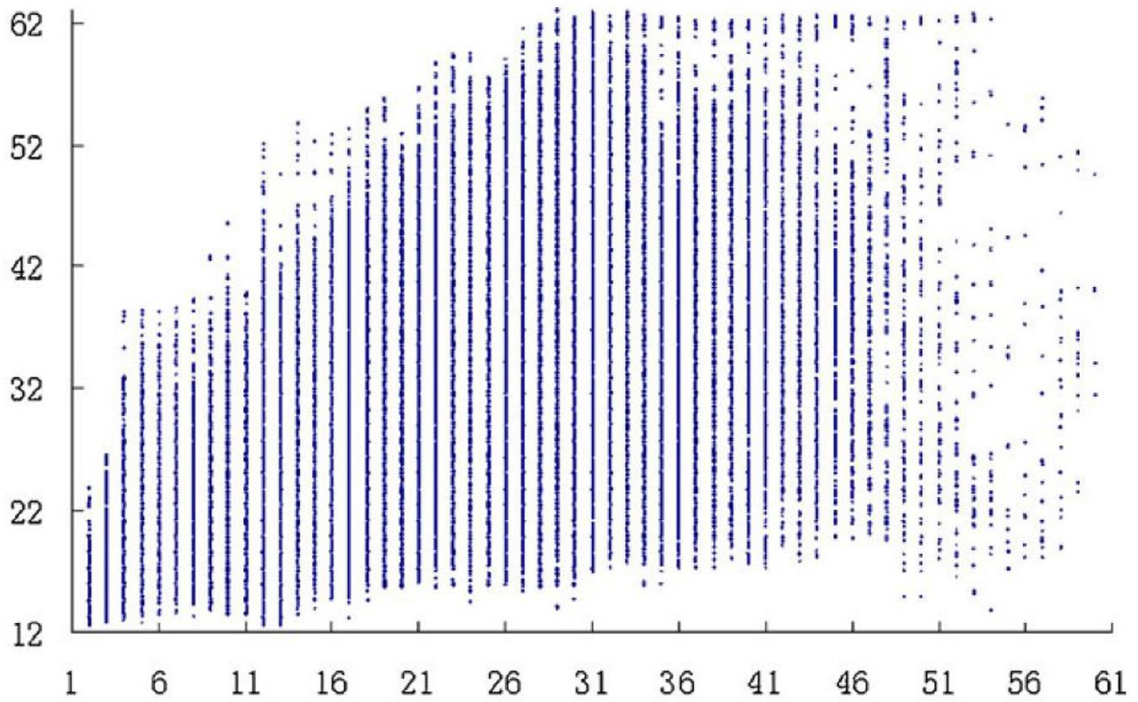
(Nogueira ve ark.2005), (Lämmerhofer ve ark.2011). yüzeyden bağlı N-10-undesenil-3-aminoquinuclidine silika esaslı sabit bir faz hazırladılar. Önce N- (10-undesenoil) -3-aminoquinuclidine, 3-aminoquinuclidine baz ile N-10-undecenoic asit klorid'in reaksiyonu ile sentezlenir. Ardından, merkaptto silika yüzeyine doğrudan aşılır. Polar amid / sülfid grupları ile qinuoklidinyum halkasının anyon değiştirme yerinin yakınındaki yüzeyden dolayı, hidrofobik alkil zincirinin eşzamanlı olarak verilmesinden karma mod RPLC / AEX ayrımı elde edilebilir. Yeni sabit faz ilk kez yan ürünleriyle peptitleri ayırmak ve saflaştırmak için kullanıldı. RPLC saflaştırma protokolüne kıyasla yüksek yükleme kapasitesi ve verim sağlandı. Daha sonra, suda ve yağda çözünen vitaminlerin (Dabre ve ark.2011). ve sentetik oligonükleotidler (Zimmermann ve ark.2014) ayrılması için kullanılmıştır. Son zamanlarda, N-undecenoylated, 3-aminoquinuclidyn'in 3-aminotropan, 2-dimetilaminoetilamin veya N-butenoil-(2S, 4S, 5R) -2-aminometil-5 -[(2-oktiltio) etil]-qinuoklidiyn'in bağlanması ile bir dizi sabit faz daha da hazırlandı.(Lämmerhofer ve ark.2008) Yakın tarihli çalışmasında (Yang ve ark.2015) birkaç yeni sabit faz, merkaptto silika yüzeyinde N-undesenil-3- α -aminopropanın immobilizasyonu ile sentezlendi ve bunu takiben tiol-uç kaplamalı (örneğin allilsülfonik asit ve 3 -butenoik asit) modifiye edilmemiş tiollere dönüştürüldü. Ko-iyonik uç kaplamalı bu yeni sabit fazların en büyük avantajı, daha yumuşak elüsyon koşullarında daha düşük iyonik kuvvet ile ayrılmaya izin veren asidik analitlerin çabuk ayrıştırılmasıdır. Bu nedenle, kütle spektrometresi (MS) dedektörü ile tipleme için daha uygundur.

Bai ve yardımcıları (Zhao ve ark.2015). alkin-azid Huisgen reaksiyonu yoluyla bir 3-dietilamino-l-propen fonksiyonlu silika bazlı sabit faz hazırladılar. Yeni sabit faz, üçüncül bir amin ve iki metil grubu içeren bir ligand ile dizayn edildi. Geliştirilen sabit faz, protein ayrılması için kullanıldığında makromoleküllerin analizi için uygunluğunu gösteren mükemmel kütle geri kazanımları ve biyoaktivite sergiledi. Geliştirilen kolon temelinde, yüksek verimliliği olan model proteinlerin ayrılması için tek bir kolona sahip yeni bir off-line 2D LC sistemi oluşturuldu.

Jin ve ark.2015 ticari olarak satılan XCharge C8SAX sabit fazı kullanarak cis-trans izomerik antosiyaninleri ayırmıştır. Antosiyanin, bir fenolik bileşik grubudur ve bu fenolik bileşikler, çoğu meyve ve sebze için karakteristik renkleri verirler. Önceki çalışmalar antosiyaninlerin kalp rahatsızlığı ve kanser gibi kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi için potansiyel olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır.(Hou ve ark.2003). Bununla birlikte, az sayıda çalışma, doğal ürünlerden izomerik antosiyaninlerin saflaştırılması için etkili olduğu bildirilmiştir. XCharge C8SAX sabit faz uygulayarak, iki yeni antosiyanin cis-trans izomerik antosiyanin çiftini içeren altı saf antosiyanin, vahşi *Lycium ruthenicum* Murr'dan saflaştırıldı ve kimyasal yapılar ayrıca nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve MS ile doğrulandı. En önemlisi, beş tanesi ilk defa bitkiden elde edildi.

Dahası, karma mod RPLC / CEX sabit fazlar da bildirilmiştir. Örneğin, (Zhang ve ark.2011) tamamen polisajlı silika tabanlı sabit fazlı bir polistiren ağı hazırladı. Bazı karboksilik grupların daha ileri bir şekilde eklenmesiyle, geliştirilen sabit faz hem RPLC hem de CEX tutma modlarını sergiledi. 43 temel ilacın ayrılması için kullanıldığında, piyasada bulunan C₁₈ kolona kıyasla çok farklı bir seçicilik gözlemlendi ve ortogonal ayırma için iyi bir adaylık gösterdi. Yeni sabit fazın önemli bir özelliği, tamamen bağlı polimer ağ yapısı, bağlı fazın hidrolizini etkili bir şekilde önleyebildiğinden, yaygın olarak kullanılan silikat bazlı sabit fazlarla karşılaştırıldığında mükemmel stablitedir.

Cai ve ark.2012 yeni bir RPLC / CEX sabit faz hazırlamak için çift fonksiyonlu reaktifler olarak OTS ve 3-siyanopropil triklorosilan kullandılar. İlk olarak, OTS ve 3-siyanopropil triklorosilan doğrudan silika yüzeyine aşılmıştır. Ardından, 3-siyanopropil triklorosilanın siyano grubu, yeni sabit fazı elde etmek için sülfürik asit metanol çözeltisi altında hidrolize edildi. 3-karboksipropil grupları katyonik değişim yeri ile yeni durağan fazı sağlayabilirken, oktadesil ligand, yüksek hidrofobikliğe sahip yeni durağan fazı oluşturur. Geliştirilen sabit fazın ilk boyut olarak, sıçan beyin örneklerinin çözünabilir protein fraksiyonunun triptik özümlemleri ayırmak için bir çevrim dışı 2D-RPLC / CEX-RPLC sistemi daha imal edildi. Nano-FPLC kolonu üzerindeki 59 fraksiyonun elüsyon pencereleri Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. Nano-RPLC kolonundaki 59 fraksiyonun elüsyon pencereleri. Numuneler önce tek boyutlu ayırma için C18WCX kolonuna enjekte edildi ve ayrıldı. Fraksiyonlar ayrıca RPLC-MS / MS ile analiz edildi.

Geliştirilen 2D sisteminin ortogonalitesi, geleneksel 2D-RPLC/RPLC sisteminden daha iyi performans gösterdi ve 4397 eşsiz peptidi olan 1031 protein, 100 mikrogram'lık numunelerden başarıyla tespit edildi. Yeni kolonun bir potansiyel faydası, temel peptitlerin tanımlanmasını iyileştirebilmesidir. Ayrıca, poli (glisidil bazlı metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) mikroküreciklerine dayanan, çift işlevli karma mod RPLC / CEX sabit faz (Yang ve ark.2015) rekombinant insan interferon- γ 'nın inklüzyon cisimlerinden saflaştırılması için, hazırladılar.

2.6. HILIC/IEC

(Zhu ve ark.1991), HILIC sabit fazının eşzamanlı olarak IEC tutma mekanizmasına sahip olduğunu ilk olarak bulmuşlardır. HILIC/IEC kavramı bundan sonra önerildi. HILIC/IEC genellikle polar ve hidrofilik bileşiklerin ayrılması için kullanılır. Geleneksel kromatografi modlarına faydalı bir ektir.Yakın zamanda bildirilen HILIC / IEC sabit fazlar Tablo 3'te özetlenmiştir.

Yang ve diğer yazarlar karma mod HILIC / AEX sabit fazlar hazırlamak için çeşitli çalışmalar yürüttüler. Önce, amin-azid Huisgen reaksiyonu (Liu ve ark.2012)

vasıtasıyla azid-silika üzerinde propargilamin'in aşılınmasıyla amino ile modifiye edilmiş silika tabanlı sabit bir faz imal edildi. Geliştirilen sabit faz basittir ve kolayca hazırlanabilir. Yeni sabit fazın serbest amino grubu ve triazol halkası, inorganik anyonların iyi seçicilikle ayrılması için geleneksel amino sabit fazından daha iyi performans gösterir. İnorganik anyonların ayrılması için kolon verimliliği 71.000-74.000 tabaka/m ulaştı. Ayrıca kutuplu nükleozidlerin, organik asitlerin ve bazların başarılı bir şekilde ayrılması da sağlandı. Aynı grupta, amid ile modifiye edilmiş silika tabanlı sabit faz da asparaginin karşılık gelen azido grubuna aktarılmasıyla ve ardından aynı usul vasıtasıyla alkin silika üzerine bağlanarak hazırlandı.(Shen ve ark.2013)

(Qiao ve ark.2014) glukamyum-bazlı IL'nin verilmesiyle karma mod HILIC / AEX sabit fazın hazırlanması için yenilikçi bir çalışma yürüttü. Önce, N,N-dialil-N-metil-D-glukaminyum bromür, N-metil-D-glukamin'in allil bromid ile reaksiyona sokulur. Ardından, hazırlanan IL doğrudan merkaptosilika yüzeyine aşılınmıştır. Yüksek dördüncül amonyum grubunun ve glikoz yapısının varlığı, daha önce bildirilen imidazolium tabanlı sabit fazlardan daha güçlü hidrofiliteye sahip yeni statik hale getirir. Kolon verimliliği, sitidin için 80.000 tabaka/m ulaştı ve 16 flavonoidin, nükleozid monofosfatların, siklik nükleotidlerin ve nükleozid difosfat karışımından nükleotidlerin ayrışması için iyi verim elde edildi.

Glutasyon, serbest amino grubu ve iki karboksil grubu içeren doğal olarak hidrofilik bir tripeptittir. (Shen ve ark.2013) glutatyonun tiol grubunun ve "tiyol-en" click kimyası yoluyla vinil-silika reaksiyonu ile glutatyon modifiyeli silika tabanlı sabit faz hazırladılar. Yeni sabit fazın önemli bir uygulaması, temel chitoooligosakkaritler, nötr fruktosan ve yüksek oranda asidik carrageenan oligosakkaritleri gibi HILIC, CEX veya HILIC / CEX modlarında karbohidratların yüksek verimli ayrıştırılmasıdır. Fruktozun ayrılması için tipik kromatogram Şekil 5'te gösterilmektedir. Polimerizasyon derecesi 2 ila 48 arasında değişen fruktoz en iyi pik şekli ile etkin bir şekilde ayrılmıştır.

2.7. Diğer Tür sabit Fazlar

Tablo 4'te özetlendiği gibi, RPLC / HILIC / AEX, RPLC / AEX / normal faz sıvı kromatografisi (NPLC) ve RPLC / NPLC gibi karma mod sabit fazların bazı başka türleri de bildirilmiştir.

(Qiu ve ark.2012) yeni bir poli (iyonik sıvı) graflanmış silika tabanlı sabit faz hazırladı. İlk olarak, IL monomeri, 1- (2-akriloiloksiüdesil) -3-metil-imidazolyum

bromür başlangıç maddeleri olarak akrilolil klorür ve 11-bromo-1-undekanol ile iki aşamalı olarak hazırlandı. Ardından, elde edilen IL doğrudan merkaptosilikanın yüzeyine aşıldı. Geliştirilen sabit faz katyonik imidazolium, karboksil grubu ve hidrofobik alkil zinciri gibi çoklu etkileşim bölgelerine sahip olduğu için karma mod RPLC / HILIC / AEX ayrımı elde edilebilir. Diğer IL-modifiyeli sabit fazlara benzer şekilde, yeni sabit faz da daha yüksek şekil ve düzlemsel seçicilik gösterdi.

(Li ve ark.2014) bir dendritik polimer modifiye silika (DPS) tabanlı sabit faz hazırladı. DPS sabit faz, 1,4-bütandiol diglisidil eter ve anilin ile art arda gelen aminoepoksi reaksiyonları ile farklı bir sentez şeması vasıtasıyla sentezlendi. Yeni sabit fazın yinelenen dal birimleri, kuaterner amonyum veya tersiyer amin gruplarına sahip fenil halkasının yanı sıra karma mod RPLC / HILIC / AEX tutma mekanizmaları üreten polar hidroksil ve eter grupları gibi çeşitli gruplar içerir.

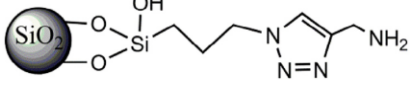
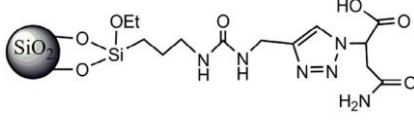
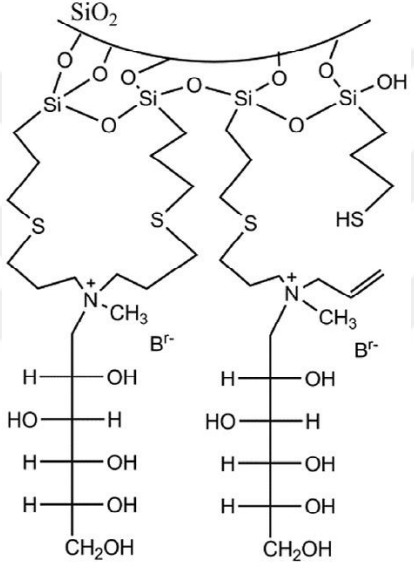
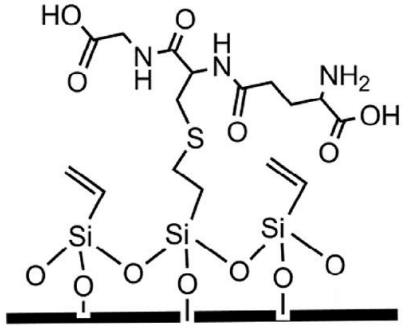
Asidik, bazik ve nötr bileşikler RPLC / AEX modları altında verimli bir şekilde ayrılmışken, kutuplu nükleobazlar ve nükleozidlerin HILIC modunda iyi bir şekilde ayrılması sağlanmıştır.

Cheng ve ark.2013 Şekil 6'da gösterildiği gibi, kompleksleşme ve hidrofobik etkileşim tutma mekanizmalarıyla bir fosfat ester-bağlı silika (PES) bazlı sabit faz hazırladı. PES sabit fazının hazırlanması için ilk önce dietil 2- (3-(trietoksisilil) propiltio) etilfosfonat, 3 mercaptopropiltrietoksisilanın dietil vinilfosfonat ile reaksiyonu sonucu sentezlendi. Ardından PES sabit fazını elde etmek için doğrudan silika yüzeyine aşılanmıştır. 12 fenolün yüksek verimli bir şekilde ayrılması için başarıyla kullanıldı ve piyasada bulunan C₁₈ kolonunun üstündeydi. Ayrıca, RPLC ve HILIC modlarında 10 nükleobaz ve nükleozidin yüksek verimlilikle ayrılması sağlandı.

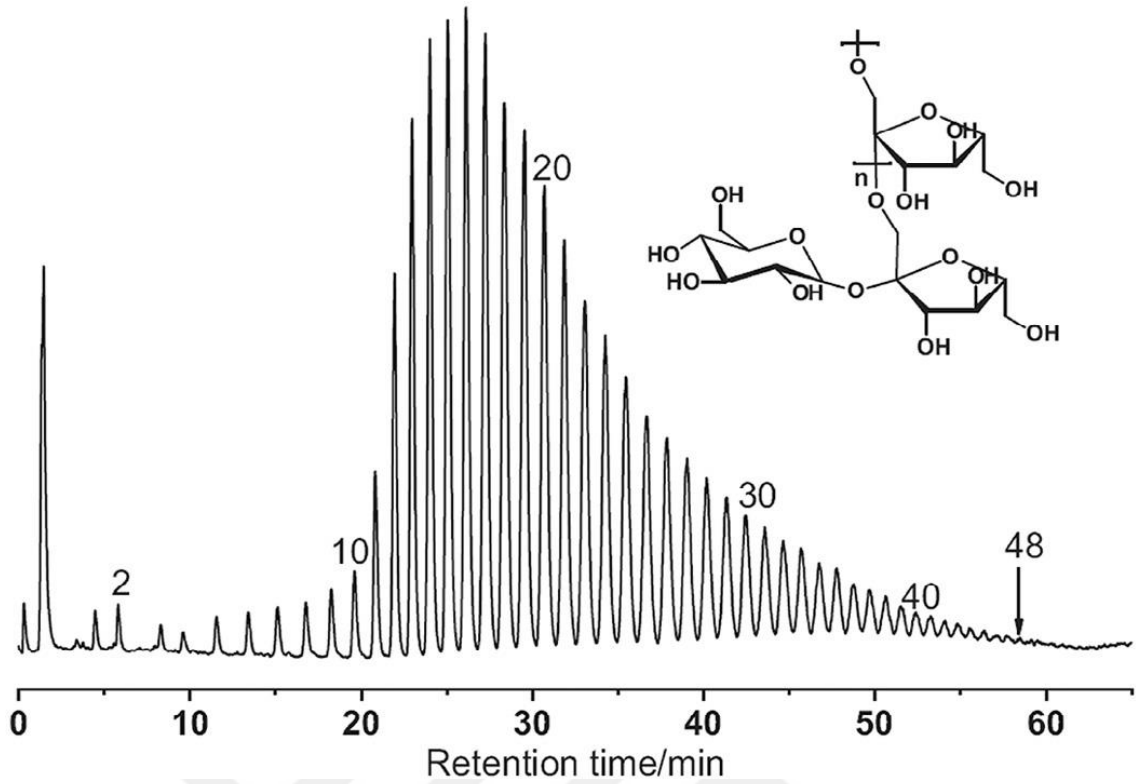
Kinolinyum IL modifiye silika tabanlı sabit fazlar nadiren bildirilmiştir. Luo ve arkadaşları [71] RPLC / AEX / NPLC için bir kinolinyum IL-modifiyeli silika tabanlı sabit faz hazırladılar. Yeni sabit faz, 3-kloropropil-silika yüzeyinde kinolin'in bir kademeli immobilizasyonu ile kolaylıkla hazırlanabilir. İmidazolium IL modifiye sabit fazlarla karşılaştırıldığında, kinolinyum IL modifiye sabit fazlar daha fazla katyona sahiptir, bu nedenle daha zayıf anyon değişimi ve elektrostatik etkileşimlerle birlikte daha güçlü π - π istifleme etkileşimi sağlarlar.

Tablo 3

Karma mod HILICC/IEC sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
Amino-modifiye edilmiş Silika tabanlı sabit faz		İnorganik anyonlar, nükleositler, organik asitler, organik bazlar	71,000-74,000 tabaka/m inorganik anyonlar için	[35]
Amid modifiyeli silika tabanlı sabit faz		Nükleozitler, nükleik asit bazlar, inorganik anyonlar	nükleositler ve nükleik asit bazları için 27,000-35,000 tabaka/ m	[68]
Glucaminium IL-modifiye silika tabanlı sabit faz		Nükleozitler, sübstitüe benzoik asitler, flavonoidler, nükleotidleri	Sitidin için 80.000 tabaka / m	[33]
Glutatiyon-modifiye silika tabanlı sabit faz		oligosakkaritler, model peptitler, triptik insan sindirimleri serum albümin	-	[69]

Silica Gel



Şekil 5. Glutatyon-değiştirilmiş silika tabanlı kolon ile ayrılmış fruktozanın kromatogramı.

Geliştirilmiş kolon aracılığıyla organik bileşikler, PAH'lar ,ftalatlar, parabenler, fenoller ve anilinler dahil etkili bir şekilde ayrılmıştır. Ayrıca, musluk suyu ve şişelenmiş sudaki anorganik anyonların saptanması için de kullanılmıştır ve bu da geliştirilen sabit fazın pratik uygulamalar için potansiyel avantajlarını göstermektedir.

N-ferrosenil (benzoil) amino asit ester tipik bir ferrosen bileşiğidir. Hidrofobik alkil zinciri, polar fenilalanin ve fenil halka gruplarının doğal yapıları, onu karma mod sabit faz hazırlamak için uygun bir organik olarak fonksiyonel reaktöre dönüştürür. (Zhou ve ark.2015) RPLC/NPLC için bir N-ferrosenil (benzoil) amino asit ester ile modifiye edilmiş silika bazlı sabit faz hazırlayan ilk kişilerdir. Yeni sabit faz elde etmek için sentezlenmiş N-ferrosenil (benzoil) amino asit esterleri aminosilika yüzeyine doğrudan aşılabilir. Asit-baz dengesi, hidrofobik yük transfer hidrojen bağlanması, π - π ve dipol-dipol etkileşimleri gibi çoklu mekanizmalar yoluyla PAH'lar, aromatik bileşikler, 5-nitroimidazol ilaçları ve fenollerin ayrılması için başarıyla kullanılmıştır. Geliştirilen sabit fazın önemli bir uygulaması, sebzelerde kalıntı organofosforlu pestisitlerin başarılı bir şekilde tespit edilmesidir.

Tablo 4

Diğer Karma mod sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Tutma modları	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
Poli (iyonik sıvı) -modifiye edilmiş Silika tabanlı sabit faz	RPLC/ HILIC /AEX		PAH'lar, inorganik anyonlar, nükleositler ve bazlar	NO ₃ ⁻ için 52,000 tabaka/m	[34]
Dendritik polimer modifiyeli silika tabanlı sabit faz	RPLC/ HILIC /AEX		PAH'lar, amidler, nükleobazlar, nükleositler	-	[31]
PES sabit fazı	RPLC/ HILIC /AEC		Alkilbenzenler, fenoller, nükleositler, nükleobazlar	nükleozitler ve nükleobazlar için 14.000–70.000 tabaka/ m	[70]
Quinolinium IL-modifiye silika tabanlı sabit faz	RPLC/ AEX /NPLC		PAH'lar, ftalatlar, parabenler, fenoller, anilin, inorganik anyonlar, inorganik Su örneklerinde anyonlar, ftalatlar plastik maddeler	inorganik anyonlar için 31,400–40,600 tabaka/ m	[71]
N-ferrosenil (benzoil) amino asit, ester modifiye silika tabanlı sabit faz	RPLC/ AEX /NPLC		PAH'lar, aromatik bileşikler, 5-nitroimidazol, ilaçlar, fenoller, organofosforlu pestisitler, organofosfor pestisit kalıntısı, sebze örneği	-	[72]
$(\text{EtO})_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ + $\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OEt})_2$ $\xrightarrow[\text{dimethoxybenzoil}]{\text{UV light}}$ $\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OEt})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$ MPTES DEVP					
$\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OEt})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$ + SiO_2 $\xrightarrow[130^\circ\text{C}, 20\text{h}]{\text{toluene, triethylamine}}$ $\text{SiO}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{OEt})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{P}(=\text{O})(\text{OEt})_2$					

Şekil 6. PES sabit fazının hazırlanması için şematik diyagram. ([70] 'den yeniden basılmıştır).

2.8. Monolitik Temelli Karma Mod Sabit Fazlar

Son zamanlarda, monolitik tabanlı karma mod sabit fazlar (Zhou ve ark.2013,Bassanese ve ark.2014) Tablo 5'te özetlendiği gibi bildirilmiştir.

(Zhang ve ark.2011) RPLC/HILIC/AEX için bir N-metil imidazolium-fonksiyonlu silika tabanlı monolitik kolon hazırladılar. İlk olarak, tetraetoksisilan (TMOS) ile metiltrimetoksisilan (MTMS) reaksiyonu ile, 200 µm'lik kılcal silika içinde silika tabanlı monolitik matris hazırlandı. Daha sonra CPS, trietilamin varlığında monolit matrisinin işlevselleştirilmesi için kullanıldı. Son olarak, yeni sabit fazı elde etmek için monolitin yüzeyine N-metilimidazol aşlanmıştır. Geliştirilmiş kolonu test etmek için alkilbenzenler, PAHlar, inorganik anyonlar, aromatik asitler, nükleotidler ve fenoller kullanıldı. Bununla birlikte, hafif tırmanma pikleri gözlemlenildi.

Monomer olarak 4-vinilfenilboronik asit (VPBA) ve çapraz bağlayıcı olarak pentaeritritoltriakrilat (PETA) ile, poli (4-vinilfenilboronik asit-ko-pentaeritritol triakrilat) monolitik kolon, tek kademeli *in situ* kopolimerizasyon reaksiyonu yoluyla Lin ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır.(Huang ve ark.2012) VPBA'nın monomeri monolitik kolona hidrofilik ligand, hidrofobik gruplar ve iyon değişimi ve afiniteleri sağlayabilir.

Böylece, yeni kolon, karma mod RPLC / HILIC / CEX / afinite kromatografisi tutma modlarını gösterdi ve sütun verimliliği, alkilbenzenlerin ayrılması için 100.000 plates/m ulaştı.Fenollerin, nükleobazların, anilinlerin ve model proteinlerin çoklu etkileşim mekanizmalarına dayanan esnek seçicilikte ayrılması için başarıyla kullanılmıştır. Geliştirilen kolonun önemli bir özelliği, borik asit yapısına dayanan cis-diol içeren bileşiklerin selektif afinitesidir. Aynı grupta, glutatyonla modifiye edilmiş silika hibrid monolitik kolon, TMOS, γ-metakriloksipropiltrimetoksisilan (γ-MAPS) ve glutatyon varlığında tek aşamalı bir polikondensasyon ve eşzamanlı "tiol-ene" click kimyası ile elde edildi. Geliştirilen kolon karma mod RPLC / HILIC / CEX tutma mekanizmaları sergiledi. Sığır serum albüminin triptik özümlerinin ayrılması için kullanıldığında, 15 kromatografik pik değeri derece elüsyon ile başarılı bir şekilde tanınabilir (Lin ve ark.2014)

Çıplak silis monolit kolon anyon değişimine sahip değildir. Bu nedenle, anyonların ayrılması için bu sütunun kullanılması zordur. (İbrahim ve ark.2012) ticari olarak temin edilebilen çıplak silis monolitik kolonları kaplamak için katyonik nanopartiküller lateks A, lateks B veya lateks C kullanılır. Lateks nanopartiküller,

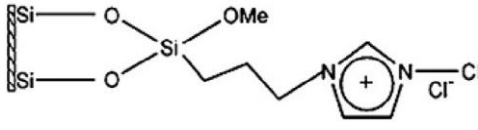
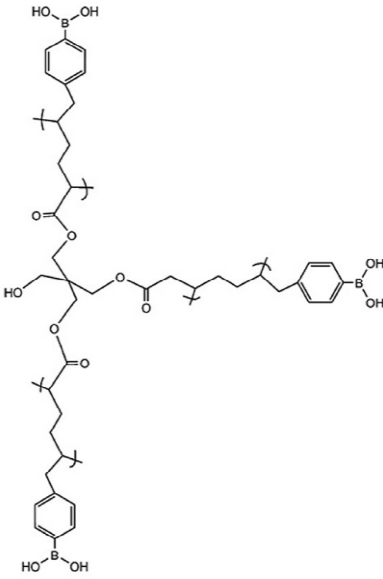
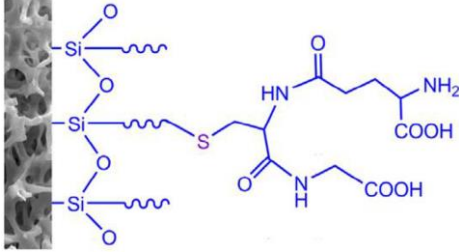
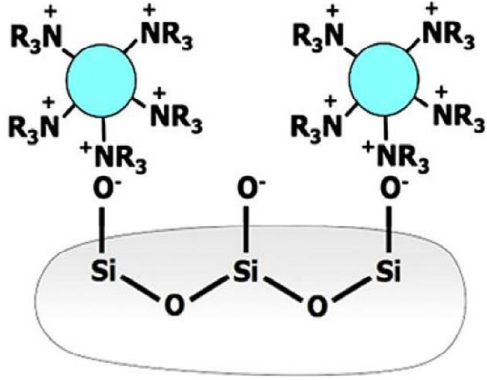
karma modda HILIC / ALEX tutma modlarını gösteren çıplak silikanın yüzeyinde geri dönüşümsüz olarak bağlanabilir. Asetat, format, bromat, nitrat, tiyosiyanat ve iyodür de dahil olmak üzere inorganik anyonların hızlı bir şekilde ayrılması, 2.5 dakikada elde edildi ve kolon verimliliği, 0.85 minimum çözünürlükte 50.000 tabaka / m'ye ulaştı.

(Aydoğan ve ark.2015) Etilen dimetakrilat ve 3-kloro-2-hidroksipropilmetakrilatın in situ polimerizasyonu ile bir polimetakrilat bazlı monolitik kolon geliştirdi, ardından N, N-dimetil-N-dodesilamin ile daha da fonksiyonelleştirildi. Geliştirilen sütun hem hidrofobik alkil gruplarını hem de iyonlaşabilir amin gruplarını içerir. Böylece, alkil-benzenlerin, fenollerin ve inorganik anyonların karma mod RPLC / AEX de ayrıştırması sağlandı. Fonksiyonel monomer gibi pentafluorobenzil imidazolyum bromür ile (POSSMA) süstitüe edilmiş bir çok-yüzlü oligomerik silseskioksan metakril çapraz bağlayıcı olarak, bir pentafluorobenzil imidazolyum bazlı hibrid monolitik kolon Xu ve ark. tarafından hazırlandı. Hazırlanan yeni kolon, pentafluorobenzil grubu ile halojenlenmiş bileşikler arasındaki spesifik etkileşimler (iyon-dipol ve dipol-dipol gibi) nedeniyle halojenli bileşiklerin ayrılması için uygundur (Shan ve ark.2015)

Fonksiyonel monomerler olarak n-oktiltrimetoksisilan (C_8 -TMOS) ve vinilfosfonik asit ile, tek adımlı bir polikondensasyon ve eşzamanlı olarak "Tiyol-ene" klik kimyası ayrıca TMOS ve MPS ile eş zamanlı reaksiyonla C_8 / $PO(OH)_2$ silika hibrid monolitik kolon hazırlamak için kullanıldı. Hazırlanan kolon, RPLC / CEX tutma özelliklerine sahiptir. Yeni sabit fazın önemli uygulaması, gibberellinlerin etkili bir şekilde belirlenmesidir. Pirinç yapraklarında kimyasal türevlendirme ile pipet ucu katı faz ekstraksiyonu ve MS tespiti birleştirilerek, altı endojen giberellin başarılı bir şekilde saptandı ve sadece 5 mg ölçüldü. MRM kromatogramları ile pirinç yapraklarında 5 mg tespit edilen endojen gibberellinler Şekil 7'de gösterilmiştir. (Zhang ve ark.2015)

Tablo 5

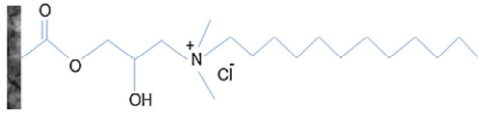
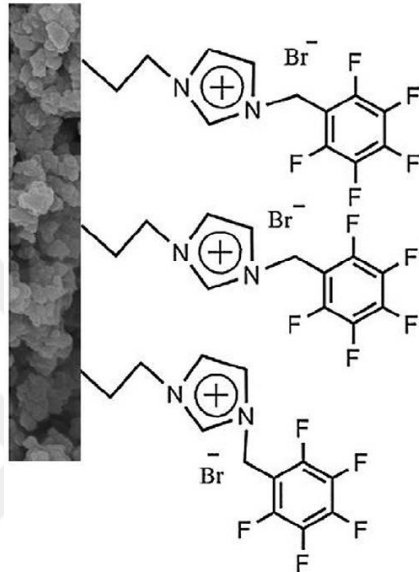
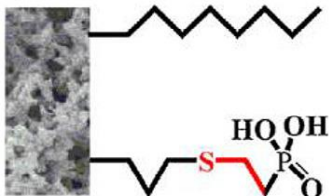
Monolitik tabanlı Karma mod sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Tutma modları	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
N-metil-imidazolyum modifiye silika tabanlı monolitik kolon	RPLC/ HILIC /AEX		Alkilbenzenler, PAH'lar, inorganik anyonlar, aromatik asitler, nükleotitler, fenoller	-	[75]
Poli (4-vinilfenilboronik asit pentaeritritol triakrilat) monolitik sütun	RPLC/HILIC /CEX/Afinite kromatografi		Alkilbenzenler, fenoller, nükleobazlar, anilin, model proteinler	Alkilbenzenler için 43.000–100.000 tabaka/ m	[76]
Glutatyon değiştirilmiş silika hibrid monolitik sütun	RPLC/ HILIC /CEX		Alkilbenzenler, fenoller, amidler, anilin, nükleotidler, model peptitler, sıgırların triptik sindirimleri serum albümin	Alkilbenzenler için 80.000–124.000 tabaka / m	[77]
Lateks kaplı silika tabanlı monolitik sütun	HILIC /AEX		İnorganik anyonlar	inorganik anyonlar için 13.000–50.000 tabaka / m	[78]

(Devamı bir sonraki sayfada)

Tablo 5(devamı)

Monolitik tabanlı Karma mod sabit fazlar (Zhang ve ark 2016)

Sabit faz	Tutma modları	Yapı	Analitler	Kolon verimliliği	Referans
N, N-dimetil-N-dodesilamin modifiye monolitik kolon	RPLC/AEX		Alkilbenzenler, fenoller, inorganik anyonlar	inorganik anyonlar için 23.000 tabaka/ m	[79]
Pentafluoro - benzil imidazolyum bromür modifiye hibrit monolitik sütun	RPLC/AEX		Alkilbenzenler, PAH'lar, nükleositler, Halojen bileşikler	Alkilbenzenler için 72.000 tabaka / m	[80]
C ₈ / PO (OH) ₂ modifiye silika Hibrid monolitik sütun	RPLC/CEX		Alkilbenzenler, sitokinler, pirinç yapraklarında gibberellins	Toluen için 141.000 tabaka/ m	[81]

Şekil 7. Tespit edilen C₈ / PO (OH)₂-silika hibrid monolitik kolon aracılığıyla 5 mg pirinç yapraklarında saptanan endojen gibberellinlerin MRM kromatogramları.

Bu çalışmada, yeni geliştirilen karma modlu sabit fazlar sistematik olarak özetlenmiştir. Küresel silika, karma modlu sabit fazların hazırlanması için en yaygın kullanılan matristir. Organik olarak birden fazla modifikasyon ile farklı özelliklerde fonksiyonelleştirilmiş reaktifler, karma mod RPLC / HILIC, RPLC / IEC (RPLC / AEX, RPLC / CEX), HILIC / IEC (HILIC / AEX, HILIC / CEX), RPLC / HILIC / AEX, RPLC / AEX / NPLC ve RPLC / NPLC sabit fazlar hazırlandı. Geliştirilen sabit fazların kolon verimliliği 130.000 tabaka / m'ye ulaştı ve hem küçük moleküllerin hem de makromoleküllerin başarılı bir şekilde ayrılması sağlandı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Reaktifler ve Materyaller

Dolgu maddelerinin sentezinde kullanılan küresel silika jel (Lichrospher Si 60, 5 μm , 60 Å, 700 m^2g^{-1}) Merck firmasından satın alındı. HPLC’de kullanılan çözücüler “HPLC grade” olup Merck firmasından satın alındı. Boş HPLC kolonları paslanmaz çelik olup Kalite Sistem Merieux Nutrisciences (İstanbul, Turkey) firmasından ücretsiz temin edilmiştir. Sentezde kullanılan tüm reaktifler “reagent grade” olup başka herhangi bir saflaştırma tekniğine tabi tutulmamıştır. IR spektrumları Mattson 1000 FTIR spektrometre cihazı ile kaydedilmiştir. Elemental analizi Thermo Scientific FLASH 2000 cihazı ile ölçülmüştür. Saf su Millipore Milli-Q water system ile elde edilmiştir. SEM görüntüleri LEO EVO 40 model instrument (İnönü University, SEM Laboratory) ile alınmıştır. Katı faz ^{13}C NMR spektrumları Bruker Superconducting FT.NMR Spectrometer Avance TM 300 MHz WB cihazı (Middle East Technical University, Central laboratory, Solid state NMR laboratory) ile kayıt edilmiştir. ^1H (400 MHz) ve ^{13}C (100 MHz) NMR spektrumları Bruker DPX-400 High Performance Digital FT-NMR Spectrometer (Dicle University, Faculty of Science, NMR Laboratory) ile kayıt edilmiştir. Yüzel karakteristiği nitrojen adsorbsiyon metodu ile 67 K sıcaklığında, Micromeritics, ASAP 2020 cihazı ile ölçülmüştür. The BET yüzey alanları (S_{BET}), total pore volume (V_T) ve pore-size dağılımı Quantachrome software kullanılarak hesaplandı. Kromatografi çalışmaları için Agilent 1260 HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) sistemi kullanıldı. .

3.2. Kolonların Paketlenmesi

Boş HPLC kolonu (250 x 4.6 mm, paslanmaz çelik) İle-PBA-Mix and İle-AA-Mix sabit fazları ile bulamaç paketleme yöntemi ile 500 bar basınç altında dolduruldu. Paketleme işlemi için her sabit fazdan yaklaşık 3.5 g kolona dolduruldu. Kolon doldurma çözücüsü olarak Ethanol (EtOH) kullanıldı. Toplam 4 gr madde EtOH ile bulamaç haline getildikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda sonike edildi. Daha sonra da bu bulamaç boş kolona 500 bar basınç altında dolduruldu. Son olarak, hazırlanan kolonlar EtOH ile bezlayn çizgisi tamamen düzelinceye kadar şartlandı. Şartlanma işlemine 3 saat su, 1 saat su: ACN (50:50) ve 1 saat ACN ile 0.5 mL/dk sabit akış hızında devam edildi. Hazırlanan kolonların çeşitli özellikleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. the Ile-PBA-Mix ve Ile-AA-Mix kolonlarının çeşitli özellikleri

Özellik	Ile-PBA-Mix	Ile-AA-Mix
En yüksek çalışılabilir basınç	500 bar	500 bar
¹ Max. Akış hızı: 100% EtOH	2,3 ml/dk	1,8 ml/dk
¹ Max. Akış hızı: EtOH/Su:50/50	1,3 ml/dk	1,2 ml/dk
¹ Max. Akış hızı: 100% Su	3,7 ml/dk	2,5 ml/dk
¹ Max. Akış hızı: Su/ACN:50/50	5 ml/dk (450 bar)	3,1 ml/dk
¹ Max. Akış hızı: 100% ACN	5 ml/dk (300 bar)	5 ml/dk (320 bar)
² Bağlı karbon oranı	% 4,59	% 13,74
L x I.D.	250 cm x 4.6 mm	250 cm x 4.6 mm
Yüzey bağlanma miktarı	0,17 mmol/gr	0,50 mmol/gr
Aktif fonksiyonel gruplar	Amid, fenil, alkil	Amid, fenil, alkil
³ Partikül boyutu	5 µm	5 µm
³ Gözenek büyüklüğü	60 °A	60 °A
⁴ Yüzey alanı	626 m ² g ⁻¹	659 m ² g ⁻¹
⁴ Toplam gözenek hacmi	0,64 cm ³ g ⁻¹	0,66 cm ³ g ⁻¹
Çalışılabilir pH aralığı	2,5-8.5	2,5-9.00
Kromatografi modu	Karma mod:RPLC/HILIC	HILIC

¹: Max. Akış hızı 500 bar ve 20 °C'deki akış hızıdır.

²: Element analizi ile ölçüldü

³: Modifiye olmamış silika jel firmasının verdiği bilgilere dayanmaktadır.

⁴: BET analizi sonuçlarına dayanmaktadır.

3.3. Sentez

3.3.1. N-boc-Ile-PBA'nın sentezi

Disikloheksilkarbodiimide (DCC, 3.03 g, 14.7 mmol) CH₂Cl₂ (10 mL)'da çözüldü ve N-Boc-izolözin (3.05 g, 13.4 mmol), 4-fenilbütilamin (2 g, 13.4 mmol) ve HOBT (2.18 g, 16.1 mmol)'in CH₂Cl₂ (200 mL) ve 0 °C'deki çözeltisine eklendi. Oda şartlarında 24 saat karıştırıldıktan sonra, karışım sırasıyla CH₂Cl₂ (30 mL x 2), 0.1 N HCl (10 mL) ve su (20 mL x 2) ile ekstrakte edildi. Organik faz Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu, süzüldü ve evapore edildi. Residü kolon kromatografi ile silika jel üzerinde saflaştırıldı. (H : EtOAc = 7 : 1, R_f: 0.45). Beyaz katılar elde edildi. Ürün: 4.01 g, 88 %.

En: 90-92 °C. IR ν (cm⁻¹); 3336 (NH, karbamat), 3306 (NH, amid), 3082 (Ar-H), 3027 (Ar-H), 1680 (C=O, karbamat), 1655 (C=O, amid), 1246 (C-O-C), 1174 (C-N-C). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 0.89-0.95 (m, 6H), 1.05-1.21 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.45-1.90 (m, 6H), 2.64 (t, 2H), 3.20-3.45 (m, 2H), 3.87-3.91 (dd, 1H), 5.08 (bs, 1H), 6.08 (bs, 1H), 7.18-7.31 (m, 5H, AB sistem). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 11.39, 15.60, 24.77, 28.31, 28.63, 29.14, 35.45, 37.09, 39.22, 59.46, 79.85, 125.81, 128.34, 128.38, 155.87, 171.56.

3.3.2. İle-PBA'nın sentezi : boc grubunun uzaklaştırılması

TFA / AcOH (1:1) (14 mL), N-boc-ile-PBA (3.0 g, 8.3 mmol)'in CH₂Cl₂ (30 mL) at 0 °C'deki çözeltisine eklenir. 24 saat oda şartlarında karıştırıldıktan sonra, çözücü uçurulur ve pH 9-10 civarı olana kadar 1 N KOH çözeltisi eklenir. Daha sonra sulu karışım CH₂Cl₂ (30 mL x 3) ile ekstrakte edildi. Organik faz 0.1 N HCl (10 mL) saf su (30 mL x 2) ile yıkandı, Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu, süzüldü ve evapore edildi. Saf **ile-PBA** viskoz yağ şeklinde elde edildi (ürün TLC ile takip edildi). H : EtOAc = 7 : 1 çözücü karışımı ile R_f = 0, EtOAc / TEA = 1 : 2 : 0.2 çözücü karışımı ile R_f = 0.25 H olarak hesaplandı. Verim: 1.96 gr, %95.

3.3.3. İle-PBA-DMO'nun sentezi

İle-PBA (8.5 mmol, 2.24 g)'nın MeOH(20 mL)'daki çözeltisine dimetilokzalot (18.24 mmol, 2.06 g)'ın MeOH (15 mL)'daki çözeltisi ilave edildi. Argon atmosferinde 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra çözücü evapore edildi ve madde silika üzerinde(PE:EtOAc =2 : 1) kolon kromatografisiyle saflaştırıldı ve beyaz katı maddeler elde edildi. 2.51 g madde elde edilmiş olup verim %84'tür. E.N: 94-95. IR ν (cm⁻¹); 3296 (sb, H-N iki amid), 3086 (Ar-H), 3028 (Ar-H), 1759 (C=O, ester), 1675 (NH, amid), 1644 (NH, amid), 1261 (C-O-C, ester), 1211 (C-N-C, amid), 1175 (C-N-C, amide). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 0.91-0.97 (m, 6H), 1.1-1.22 (m, 1H), 1.52-2.00 (m, 6H), 2.64 (dd, 2H), 3.20-3.40 (m, 2H), 4.19 (s, 3H), 4.21 (dd, 1H), 5.91 (t, 1H), 7.16-7.32 (m, 5H, AB sistem), 7.62 (d, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 11.13, 15.38, 24.97, 28.62, 28.98, 35.40, 37.29, 39.47, 53.70, 58.71, 125.87, 128.38, 141.94, 156.17, 160.42, 169.67.

3.3.4. Dolgu Maddesinin Hazırlanması (Ile-PBA-Mix)

Ile-PBA-DMO (0.8 g, 2.4 mmol) ve 3-aminopropyltrimethoxysilane (0.54 mL, 3.12 mmol) karışımının MeOH (30 mL)'deki çözeltisi 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım + 4 °C'ye soğutuldu ve çöken beyaz katılar soğuk MeOH ile yıkandı, süzüldü ve evapore edildi. 0.82 gr Pre-Ile-PBA-mix. elde edilmiş olup verim % 67. EN: 220-250 °C aralığında bozunmaktadır. Daha sonra, 0.2 gr Pre-Ile-PBA-Mix 130 °C'de toluene (20 mL) ve DMSO (3 mL) karışımında çözöldü ve Spherical silica jel (2 gr) bu karışıma ilave edildi. 130 °C de 48 saat karıştırıldıktan sonra, karışım süzöldü ve yeni dolgu maddesi sırasıyla toluen (10 mL), CHCl₃ (20 mL), ETOH (20 mL), EtOH : EtOAc (1:1, 20 mL) ve aseton (30 mL) ile yıkandı. Elde edilen beyaz dolgu maddesi 90 °C'de vakum altında evaporatörde toplam 20 saat boyunca kurutuldu ve yeni dolgu maddesi Ile-PBA-Mix elde edildi. Elementel analiz: C 4.58, H 0.71, N 0.67 (0.17 mmol of loaded ligand / g SP. Yeni fazın karakterizasyonu sonraki bölömlerde verilmiştir.

3.3.5. N-boc-Ile-AA'nın Sentezi

Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 3.03 g, 14.7 mmol)'in CH₂Cl₂ (10 mL)'deki çözeltisi 0 °C'de CH₂Cl₂ (200 mL)'de karışmakta olan N-Boc-isoleucine (3.05 g, 13.4 mmol), 4-phenylbutylamine (2.10 g, 13.4 mmol) ve HOBt (2.18 g, 16.1 mmol) çözeltisine ilave edildi. 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra, karışım süzöldü ve sırasıyla 1 N HCl (100 X2 mL), %5 NaHCO₃ (10 mL) ve su (10 mL)ile ekstrakte edildi. Ekstrakt Na₂SO₄ ile kurutuldu, süzöldü, evapore edildi ve 4.70 g saf beyaz katı N-boc-ile-AA elde edildi (H:EtOAc = 3:1 ile TLC: R_f = 0.32). Verim: %99. EN: 158-159 °C. IR ν (cm⁻¹); 3335 and 3309 (Amide N-H), 3201 (karbamat N-H), 3063 (Ar-H), 1679 (karbamat C=O), 1665 (amid C=O), 1612 (amid C=O), 1310 (karbamat C-O-C), 1240 (karbamat C-N-C), 1170 (amid C-N-C). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 0.89 (t, 3H), 0.98 (d, 3H), 1.10-1.30 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.50-1.70 (m, 1H), 1.80-2.00 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 4.17 (s, 1H), 5.52 (d, 1H), 7.11-7.19 (m, 2H), 7.34 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.91 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 11.12, 15.57, 24.38, 24.89, 28.35, 37.20, 60.12, 80.27, 11.87, 115.88, 116.30, 129.19, 138.03, 138.43, 156.44, 169.06, 171.09.

3.3.6. Ile-AA'nın Sentezi: Boc- grubunun uzaklaştırılması

TFA/AcOH (1:1) (14 mL) **1** (3.0 g, 8.3 mmol)'in CH₂Cl₂ (30 mL)'deki çözeltisine 0 °C'de ilave edildi. 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra çözücü evapore edildi ve ortama 1 N KOH ilave edilerek ortamın pH'ı 9-10 'a ayarlandı. Karışım CH₂Cl₂ (30 mLx3), 0.1 N HCl (10 mL) ve su (30 mLx2) ile ekstrakte edildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu, süzüldü ve evapore edilerek 2.05 g saf viskoz yağimsı bir madde olan **2** elde edildi (TLC ile takip edilerek). H:EtOAc = 3:1 ile R_f = 0, H:EtOAc/TEA = 1:2:0.2 ile R_f = 0.25. Verim: % 99.

3.3.7. Ile-AA-DMO'nun Sentezi

Dimethyloxalate (18.24 mmol, 2.06 g)'ın MeOH (15 mL)'deki çözeltisine Ile-AA (8.5 mmol, 2.13 g)'nın MeOH (20 mL)'deki çözeltisi ilave edildi. Argon atmosferi altında oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldıktan sonra, çözücü evapore edildi ve oluşan madde silika jel üzerinde kolon kromatografisiyle (PE:EtOAc = 2:1)saflaştırıldı, 2.29 g beyaz katı **3** elde edildi. Verim : %80. EN: 168-169. IR ν (cm⁻¹); 3275 (sb, H-N iki amid), 3074 (Ar-H), 3042 (Ar-H), 1754 (C=O, ester), 1656 (NH, amid), 1619 (NH, amid), 1209 (C-O-C, ester), 1175 (C-N-C, amid), 1175 (C-N-C, amid). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 0.83-1.00 (m, 6H), 1.10-1.27 (m, 1H), 1.45-1.68 (m, 1H), 1.90-2.11 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.59 (d, 1H), 7.14-7.40 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 8.03 (d, 1H), 8.27 (s, 1H), 9.27 (s, 1H) ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 11.08, 15.38, 24.37, 24.79, 37.81, 53.76, 59.30, 112.19, 116.30, 116.50, 129.31, 137.97, 138.46, 156.61, 160.61, 169.14, 169.46.

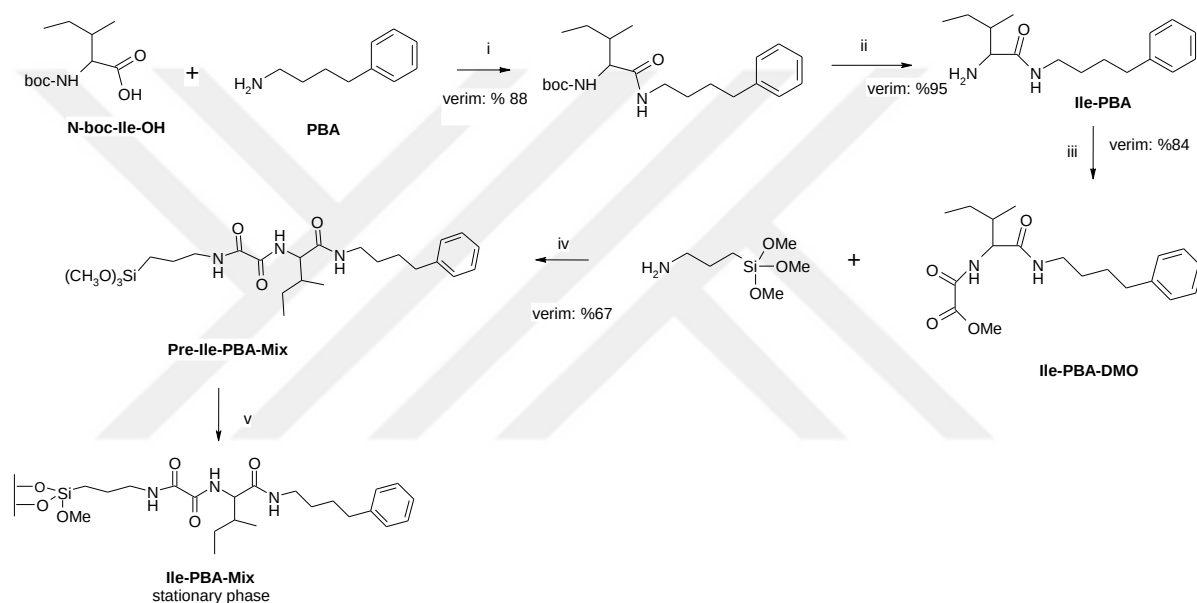
3.3.8. Dolgu Maddesinin Hazırlanması (Ile-AA-Mix)

3 (1 g, 3 mmol) ve 3- aminopropyltrimethoxysilane (0.5 g, 2.8 mmol) karışımının MeOH (30 mL)'deki çözeltisi 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım + 4 °C'ye soğutuldu ve çöken beyaz katılar soğuk MeOH ile yıkandı, süzüldü ve evapore edildi. 1.2 gr **5** elde edilmiş olup verim % 80. EN: 230-250 °C aralığında bozunmaktadır.(IR spektrumu şekil 10'da verilmiştir). Daha sonra, 0.4 gr **5** 130 °C'de toluene (30 mL) ve DMSO (10 mL) karışımında çözüldü ve Spherical silica gel (2 gr) bu karışıma ilave edildi. 130 °C'de 48 saat karıştırıldıktan sonra, karışım süzüldü ve yeni dolgu maddesi sırasıyla toluene (10 mL), CHCl₃ (20 mL), ETOH (20 mL), EtOH : EtOAc (1:1, 20 mL) ve aseton (30 mL) ile yıkandı. Elde edilen beyaz dolgu maddesi 90 °C'de vakum altında evaporatörde toplam 20 saat boyunca kurutuldu ve yeni dolgu maddesi Ile-AA-Mix elde edildi. Elemental analiz: C 13.74, H 2.29, N 2.05 (0.50 ligand / g SP.)

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Yeni Bileşiklerin ve Dolgu Maddelerinin Sentezi

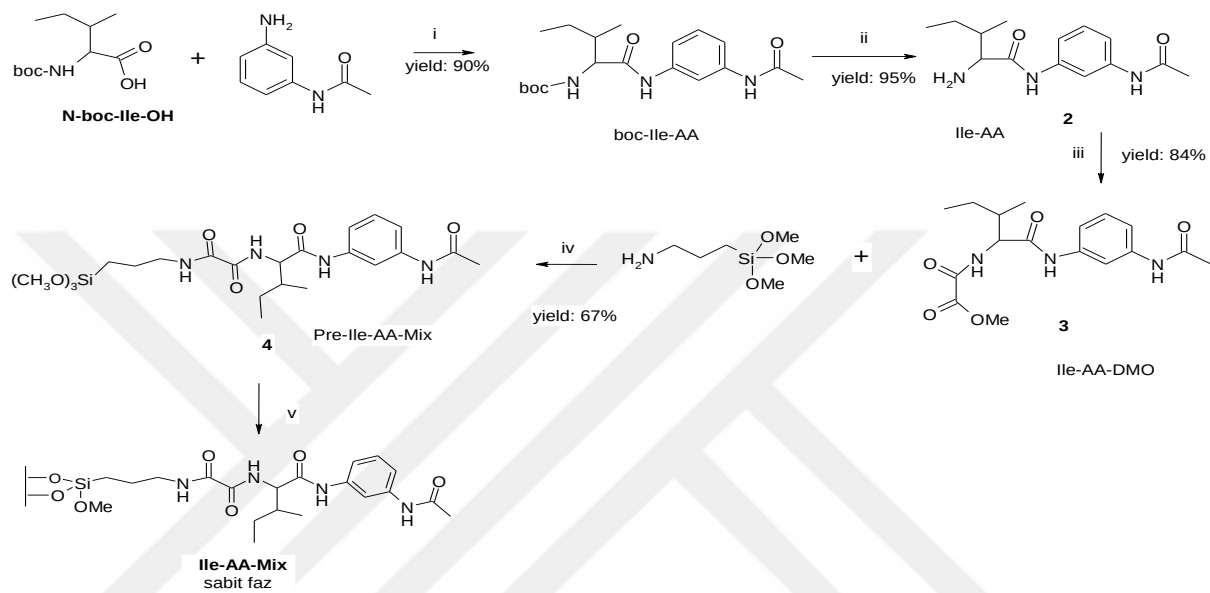
Silica jel tabanlı amid türevi yeni multifonksiyonlu dolgu maddesinin sentezi Şekil 8 ve 9’da verilmektedir. Bu dolgu maddesi polar grup olarak üç ya da dört amid grubu, apolar grup olarak alifatik ve aromatik gruplar içermektedir. Bu yüzden, bu dolgu maddesinin polar, orta polarlıkta, zayıf polar ve apolar bileşiklerle iyi etkileşebilmesi beklenmektedir.



Şekil 8. Şartlar; i, DCC, HOBT, dry CH₂Cl₂, 0 °C-then r.t., 24h; ii, TFA/ dry CH₂Cl₂, 0 °C-then r.t., 24h; iii, Dimethyloxalate/MeOH, r.t, 24 h.; iv, MeOH, r.t., 24 h; v, Spherical silica gel, toluene-DMSO(7:1), 130 °C, 48 h

Ile-PBA-Mix dolgu maddesi 5 basamakta sentezlendi. İlk basamakta, N-Boc-ile-PBA N-boc-isoleucine’nin 4-phenylbutylamine ile reaksiyonu ile elde edildi. N-boc-ile-PBA’nın boc grubunun uzaklaştırılmasıyla % 95 verim ile saf ile-PBA elde edildi. Primer amin grubu çok hızlı bozunduğu için spektroskopik veri alınmadan bir sonraki basamakta hemen kullanıldı. Ile-PBA’nın dimethyloxalate’ın iki

katı ile reaksiyonu sonucu % 84 verim ile Ile-PBA-DMO elde edildi. Ile-PBA-DMO'nun 3-aminopropyltrimethoxysilane ile reaksiyonundan % 67 verim ile Pre-Ile-PBA-Mix elde edildi. Bu son ligand HPLC kalitesindeki spherical silica gel ile etkileştirilerek yeni bir dolgu maddesi olan Ile-PBA-Mix elde edildi. Böylece, L-isoleucine amino asidinden yola çıkılarak beş tane yeni amid bileşiği ve yeni bir silika tabanlı dolgu maddesi başarılı bir şekilde sentezlendi.



Şekil 9. Koşullar; i, DCC, HOBT, dry CH₂Cl₂, 0 ⁰C-then r.t., 24h; ii, TFA/ dry CH₂Cl₂, 0 ⁰C-then r.t., 24h; iii, Dimethyloxalate/MeOH, r.t, 24 h.; iv, MeOH, r.t., 24 h; v, Spherical silica gel, toluene-DMSO(7:1), 130 ⁰C, 48 h

Yeni dolgu mddesi **Ile-AA-Mix** beş basamakta sentezlendi (Şekil 9) İlk basamakta **boc-Ile-AA** bileşiği N-boc-isoleucine'nin 3-aminoacetanilid ile reaksiyonu ile herhangi diğer saflaştırma tekniklerine gerek kalmaksızın % 92 verimle elde edildi. Bu bileşiğin koruyucu grubu boc'un uzaklaştırılmasını takiben sadece work-up işlemi uygulanarak % 99 verim ile saf **Ile-AA** elde edildi. **Ile-AA**'nin dimethyloxalate'ın iki katı ile reaksiyonu sonucu % 80 verimle **Ile-AA-DMO** elde edildi. Bunun 3-aminopropyltrimethoxysilane ile etkileşmesiyle % 67 verim ile **Pre-Ile-AA-Mix** elde edildi. Bu son ligand HPLC kalitesindeki spherical silica gel ile etkileştirilerek yeni bir dolgu maddesi olan **ile-AA-Mix** elde edildi.

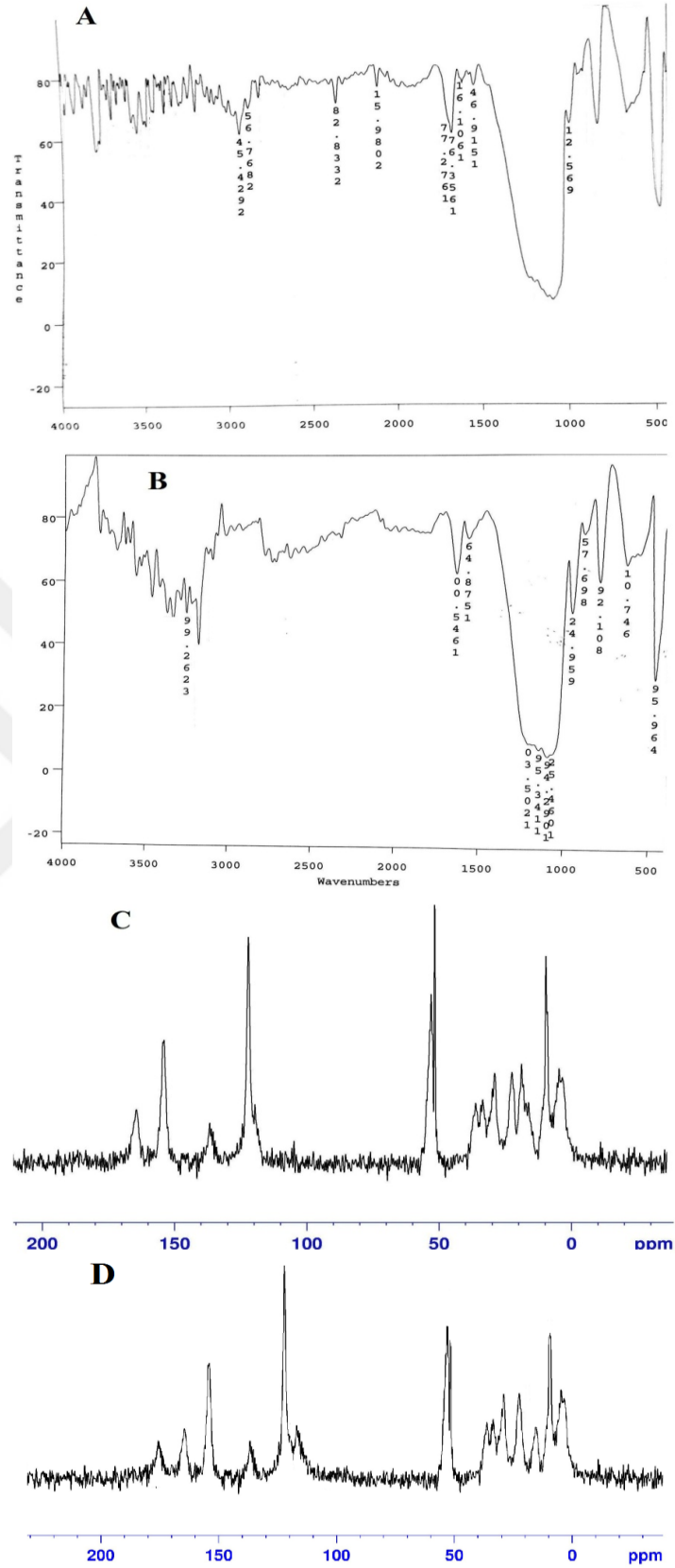
4.2. Dolgu Maddelerinin Karakterizasyonu

Elementel bileşimini ölçmek ve sentez prosesinin tekrar edilebilirliğini değerlendirmek için her iki dolgu maddesi de aynı miktarda materyaller kullanarak aynı şartlar altında üç ayrı bölümde eş zamanlı olarak sentezlendi. Bunlar parça 1, parça 2 ve parça 3 olarak adlandırıldı. Üç parça için elementel analiz hesaplandı. Tablo 7 'de görüldüğü gibi **Ile-PBA-Mix** ve **Ile-AA-Mix**'in her üç parçasının azot içeriği arasında önemli bir farklılık yoktur. Ortalama azot içeriğinden hesaplanan Ile-PBA-Mix dolgu maddesinin yüzey konsantrasyonu 0.17 mmol g^{-1} , **Ile-AA-Mix**'in de 0.5 mmol g^{-1} olarak hesaplandı. Her iki sabit fazın sentez prosesinin tekrar edilebilirliğinin doyurucu olduğunu açıkça gösterdi.

Tablo 7. Serbest silica ve Ile-PBA-Mix ve Ile-AA-Mix'in üç parçasının elementel analiz sonuçları

Elementel Analiz Sonuçları(%)	C	H	N
Serbest Silica	0	0.04.	0
Ile-PBA-Mix parça-1	4.69	0.77	0.72
Ile-PBA-Mix parça-2	4.58	0.71	0.67
Ile-PBA-Mix parça-3	4.52	0.73	0.66
Ortalama	4.59	0.74	0.68
Ile-AA-Mix Parça-1	13.84	2.38	2.10
Ile-AA-Mix Parça-2	13.77	2.22	2.04
Ile-AA-Mix Parça-3	13.65	2.27	2.01
Ortalama	13.74	2.29	2.05

Şekil 10 sırasıyla Ile-PBA-Mix (A) ve serbest silika (B)'nin IR spektrumunu Ile-PBA-Mix (C)'in katı faz ^{13}C NMR spektrumunu göstermektedir. B spektrumundaki $3600\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki bant silanol grubu O-H titreşimine aittir. Bu bant A spektrumunda görüldüğü gibi silikanın modifikasyonundan sonra kaybolmaktadır. İlaveten B spektrumunda yaklaşık 959 cm^{-1} 'deki bant serbest silanol gruplarını göstermektedir. A spektrumunda bu bant çok daha küçülmüştür. Bu silokanın modifiye olduğunu ve silanol kalıntılarının çok büyük oranda azaldığını kanıtlamaktadır. 2924 cm^{-1} ve 2867 cm^{-1} 'de çıkan pikler C-H (CH_2 , CH) gerilimine aittir. Ayrıca A spektrumunda 2338 , 2089 , 1672 ve 1519 cm^{-1} 'de birçok yeni pikler görülmektedir.



Şekil 10. Ile-PBA-Mix (A) ve serbest silika (B)'nin IR spektrumu, Ile-PBA-Mix (C) ve Ile-AA-Mix (D)'in katı faz ¹³C NMR spektrumu

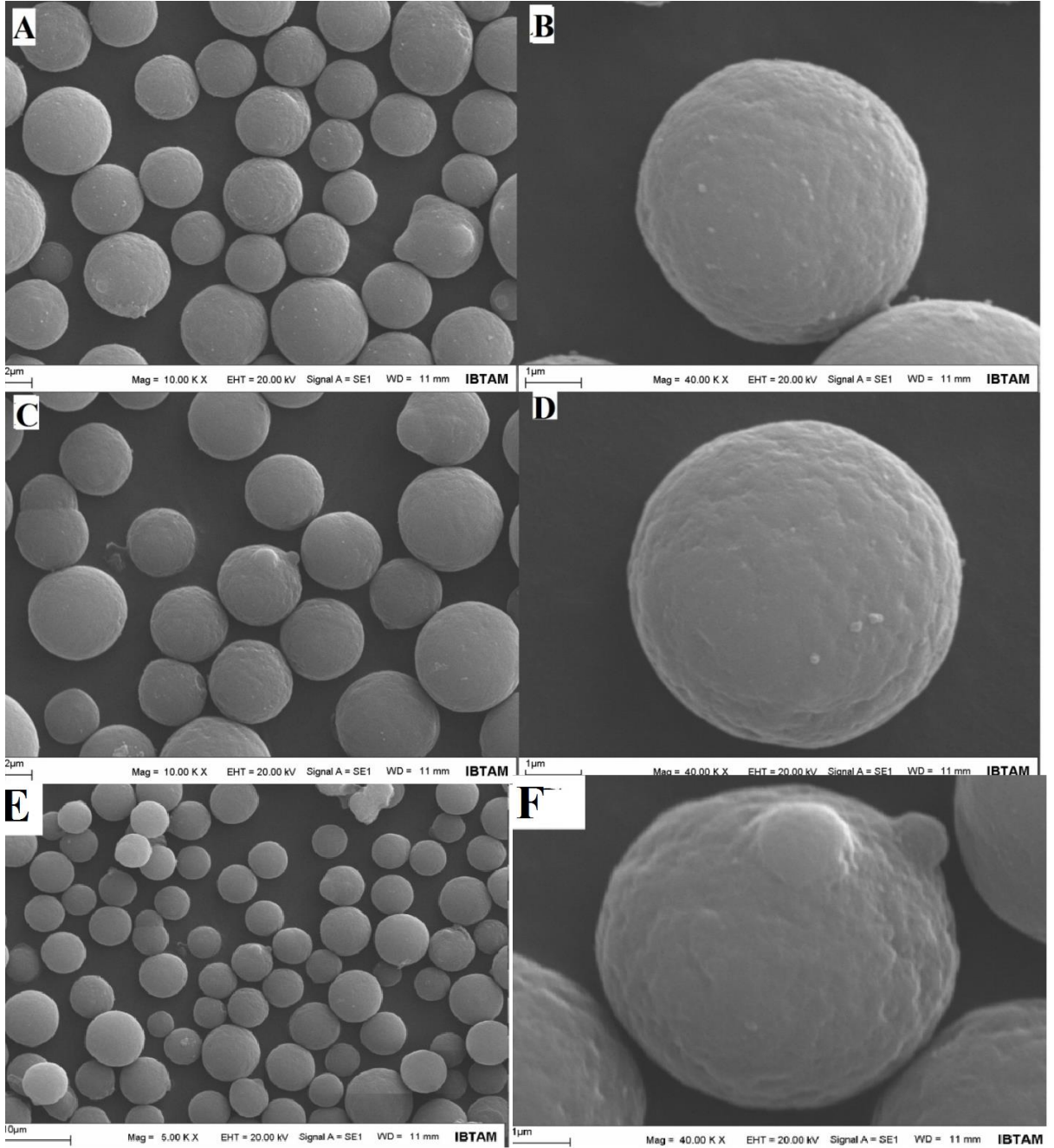
Blank Silica		İle-PBA-Mix		İle-AA-Mix	
Surface Area		Surface Area		Surface Area	
Single point surface area at $p/p^* = 0,3000000000$: 727,1484 m^2/g		Single point surface area at $p/p^* = 0,3000000000$: 619,1061 m^2/g		Single point surface area at $p/p^* = 0,3000000000$: 630,9935 m^2/g	
BET Surface Area: 737,6779 m^2/g		BET Surface Area: 626,5959 m^2/g		BET Surface Area: 659,2038 m^2/g	
Langmuir Surface Area: 2,853,8936 m^2/g		Langmuir Surface Area: 2,520,2901 m^2/g		Langmuir Surface Area: 2,205,9223 m^2/g	
t-Plot External Surface Area: 786,2042 m^2/g		t-Plot External Surface Area: 715,1400 m^2/g		t-Plot External Surface Area: 725,1554 m^2/g	
BJH Adsorption cumulative surface area of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 720,498 m^2/g		BJH Adsorption cumulative surface area of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 649,194 m^2/g		BJH Adsorption cumulative surface area of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 674,297 m^2/g	
BJH Desorption cumulative surface area of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 805,2668 m^2/g		BJH Desorption cumulative surface area of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 744,3453 m^2/g		BJH Desorption cumulative surface area of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 688,9702 m^2/g	
Pore Volume		Pore Volume		Pore Volume	
Single point adsorption total pore volume of pores less than 40,3122 nm width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,755752 cm^3/g		Single point adsorption total pore volume of pores less than 40,3122 nm width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,655666 cm^3/g		Single point adsorption total pore volume of pores less than 403,122 Å width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,664999 cm^3/g	
Single point desorption total pore volume of pores less than 40,3122 nm width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,756553 cm^3/g		Single point desorption total pore volume of pores less than 40,3122 nm width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,656210 cm^3/g		Single point desorption total pore volume of pores less than 403,122 Å width at $p/p^* = 0,9500000000$: 0,665498 cm^3/g	
t-Plot micropore volume: -0,025734 cm^3/g		t-Plot micropore volume: -0,044374 cm^3/g		t-Plot micropore volume: -0,043801 cm^3/g	
BJH Adsorption cumulative volume of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 0,725277 cm^3/g		BJH Adsorption cumulative volume of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 0,646343 cm^3/g		BJH Adsorption cumulative volume of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 0,661406 cm^3/g	
BJH Desorption cumulative volume of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 0,752703 cm^3/g		BJH Desorption cumulative volume of pores between 1,7000 nm and 300,0000 nm width: 0,699600 cm^3/g		BJH Desorption cumulative volume of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 0,658324 cm^3/g	
Pore Size		Pore Size		Pore Size	
Adsorption average pore diameter (4V/A by BET): 4,09801 nm		Adsorption average pore diameter (4V/A by BET): 4,18557 nm		BJH Adsorption cumulative volume of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 0,661406 cm^3/g	
Desorption average pore diameter (4V/A by BET): 4,10235 nm		Desorption average pore diameter (4V/A by BET): 4,16995 nm		BJH Desorption cumulative volume of pores between 17,000 Å and 3,000,000 Å width: 0,658324 cm^3/g	
BJH Adsorption average pore width (4V/A): 4,0265 nm		BJH Adsorption average pore width (4V/A): 3,9824 nm			
BJH Desorption average pore width (4V/A): 3,7389 nm		BJH Desorption average pore width (4V/A): 3,7595 nm			

Şekil 11. BET analiz sonuçları

Ile-PBA-Mix ayrıca katı faz ^{13}C NMR (şekil 10) ile karakterize edildi. 150-170 ppm'deki pik karbonil karbonuna, 120-140 ppm'deki pik silika yüzeyine bağlanmış ligandın aromatik karbonlarına aittir. 0-40 ppm arasındaki pikler alifatik metil(CH_3) ve metilen (CH_2) gruplarına aittir. 50 ppm civarındaki pikler de metin(CH) karbonlarına aittir. IR ve NMR sonuçları yeni ligandın silika yüzeyine kesinlikle bağlandığını açıkça göstermektedir.

Modifikasyonun bir sonucu olarak Spherical silica jel'in tanecik şekli ve boyutunda değişiklikler meydana gelebilir. Bu yüzden, dolgu maddesinin SEM analizi yapıldı. Serbest silikanın SEM spektrumu ile kıyaslandığında **Ile-PBA-Mix** ve **Ile-AA-Mix**'in SEM spektrumu tanecik boyutu dağılımının ve geometrisinin silika ile benzer olduğunu ve değişime uğramadığını göstermektedir (Şekil 12).

Sonuç olarak, element analizi, FT-IR, ^{13}C NMR, BET ve SEM ölçümleri Ile-PBA-Mix ve Ile-AA-Mix dolgu fazlarının başarılı bir şekilde sentezlendiklerini doğruladı.



Şekil 12. Serbest silika (A, B) ve Ile-PBA-Mix (C,D), Ile-AA-Mix'in SEM spektrumu

4.3. Kolon Stabilite Testleri

4.3.1. Ile-PBA-Mix için Stabilite Testi

Ile-PBA-Mix kolonu stabilite testleri için pH 2.50-8.50 aralığı kullanılarak iki yeni hazırlanmış ve daha önceden kullanılmamış 50x4.6 mm kolonlar Ile-PBA-Mix sabit fazı ile doldurulmuştur. Testlerin kromatografik şartları aşağıdaki gibidir: Düşük pH değerleri için mobil faz : 100%, 40 mM, pH = 2.50 ve 3.00 susuz amonyum format,

yüksek pH için: 100%, 40 mM, pH = 8.50 susuz amonyum klorür tampon; akış hızı, 1 ml/dk; sıcaklık, 60 °C; dalgaboyu, 280 nm; probe, urasil ve aniline.

Kolon aralıksız olarak pH 3.0 mobil fazı ile purge edilip Uracil ve aniline alıkonma zamanları periyodik olarak test edilip kaydedilmiştir. Yaklaşık 5000 kolon hacmi kadar pH 3.0 mobil fazı kolondan geçirildikten sonra uracil ve aniline alıkonma zamanları arasında bir değişiklik olmamıştır (%2'nin altında). 2000 kolon hacmi pH 2.5 olan mobil faz kolondan geçirildiğinde, uracil ve aniline alıkonma zamanları yaklaşık %10, 5000 kolon hacmi mobil fazda ise % 20-22 değişim görünmüştür. Bu nedenle, kolonu pH = 3.00'te oldukça kararlı, pH 3.00-2.50 aralığında kısmen kararlı ve pH 2.5 altında ise kararsız olduğu anlaşılmıştır. Aynı deneyler diğer bir kullanılmamış 50-4.6 mm kolonu Ile-PBA-Mix sabit fazı ile doldurarak pH = 8.50 şartları için tekrarlanmıştır. Yaklaşık 1000 kolon hacminde pH 8.50 mobil fazı akışı kolondan geçtikten sonra alıkonma zamanlarındaki değişimler %2'nin altındadır. Lakin, urasil ve anilinin alıkonma zamanlarında 1500 hacimden sonra, sadece yaklaşık %3-5 değişim ve 5000 hacimden sonra yaklaşık %15-18 değişim gözlenmiştir. Bundan dolayı, kolon pH 8.50 de kararlı olmasına karşı, pH 8.0 ın üstünde çalışırken dikkatli olmak önemlidir. Sonuç olarak, bu kolon pH 3 ve 8 değerleri arasında çok kararlı ve pH 2.5 ile 8.5 aralığında ise kısmen kararlıdır.

4.3.2. Ile-AA-Mix için Stabilite Testleri

Ile-AA-Mix kolonu stabilite testleri için pH 2.50-9.00 aralığı kullanılarak iki yeni hazırlanmış ve daha önceden kullanılmamış 50x4.6 mm kolonlar Ile-AA-Mix durgun fazı ile doldurulmuştur. Testlerin kromatografik şartları aşağıdaki gibidir: Düşük pH değerleri için mobil faz: 100%, 40 mM, pH = 2.50 susuz amonyum format, yüksek pH için: 100%, 40 mM, pH = 9.00 susuz amonyum klorür tampon; akış hızı, 1 ml/dk; sıcaklık, 60 °C; dalgaboyu, 280 nm; probe, uracil ve aniline.

Kolon aralıksız olarak pH 2.50 mobil fazı ile purge edilip Uracil ve aniline alıkonma zamanları periyodik olarak test edilip kaydedilmiştir. Yaklaşık hacimce 4000 kolon pH 3.0 mobil fazı kolondan geçirildikten sonra urasil ve Aniline alıkonma zamanları arasında bir değişiklik olmamıştır (%2nin altında). 2000 kolon hacmi kadar mobil faz pH 2.5 kolondan geçirildiğinde, urasil ve aniline alıkonma zamanları önemli bir değişim gözlenmezken, hacimce 4000 kolon mobil fazda ise %5-10 değişim görünmüştür. Bu nedenle, kolonu pH = 2.50de oldukça kararlı olduğunu anlaşılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğal bir aminoasit olan N-boc-L-izolözin'den yola çıkılarak, iki farklı amin kullanılarak, toplamda 6 farklı amid bileşiği sentezlenerek ^1H NMR, ^{13}C NMR, FTIR ve element analizi ile yapıları karakterize edildi. Nihai olarak da iki farklı kolon dolgu materyali kullanıldı.

Dolgu materyallerinin sentezi için kullanılan yöntem biraz uzun olsa da (beş basamak) her basamakta sentez verimle yüksek olup tekrarlanabilirlik açısından yöntemin güvenilirliği yüksektir. Kimya literatüründe genellikle ilk basamakta silika gele kloropropil-, aminopropil- vb trimetoksisilan bileşikler bağlanarak, orijinal ligand bu modifiye silika jele bağlanır. Böylece Silika yüzeyinde en az iki basamak sentez yapılmış olur. Silika yüzeyindeki sentez basamak sayısının artması reaksiyonun kontrol edilmesini güçleştirdiği için yöntem tekrarlanabilirliği, dolayısıyla güvenilirliği azalır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, bu bahsedilen yöntem daha basit olmasında rağmen tercih edilmemiştir. Bunun yerine, orijinal ligand (Şekil 8, bileşik 3 ve Şekil 9, bileşik 3) direkt aminopropiltrimetoksisilan bileşiğine bağlandıktan sonra edel edilen 4 no'lu silan bileşiği silika jele bağlandı. Böylece silika yüzeyinde sadece bir basamak reaksiyon yapıldı. Böylece dolgu materyallerinin sentez yöntemi daha güvenilir, yani tekrarlanabilirliklerinin daha yüksek olması sağlandı.

Dolgu maddelerinin tekrarlanabilirliklerini görmek için her materyal 3 ayrı reaksiyonla eş zamanlı olarak sentezlendi. Üç ayrı reaksiyon sonuçları da değerlendirilerek sonuçlar Tablo 2'de verildi. Bu tablodan tekrarlanabilirliğin çok yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Hazırlanan iki kolon için ayrı ayrı kolon dayanıklılık testleri yapıldı. Kolonların yüksek ve düşük pH dayanıklılıkları test edildi ve kolonların pH 2.5-8.5 aralığında yüksek dayanıklılığa sahip oldukları tesbit edildi. Ayrıca kolonların çeşitli çözücülere karşı davranışları detaylı olarak tesbit edilip Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 ve 2'den elde edilen sonuçlara göre kolonların başarılı bir şekilde hazırlandıkları, yüksek akış hızı şartlarında çalışılabileceği, dolayısıyla gerek ters faz gerek HILIC şartlarında rahatlıkla çalışılabileceği anlaşılmıştır. Bu iki kolon da farklı polaritelere sahip çeşitli anolit gruplarının ayrılmasında kullanılmak için uygundur. Bundan sonraki amaç, bu kolonların çeşitli analit gruplarının ayrılmasında ters faz ve HILIC uygulamaları yapılarak kolon etkinliklerinin detaylı olarak incelenmesi olmalıdır.

6. REFERANSLAR

Aral T., H. Aral, B. Ziyadanoğulları, R. Ziyadanoğulları, Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications, *Talanta* 131 (2015) 64–73.

Aydoğan C., A new anion-exchange/hydrophobic monolith as stationary phase for nano liquid chromatography of small organic molecules and inorganic anions, *J. Chromatogr. A* 1392 (2015) 63–68.

Bassanese D.N., A. Soliven, P.G. Stevenson, G.R. Dennis, N.W. Barnett, R.A. Shalliker, et al., Investigating retention characteristics of a mixed-mode stationary phase and the enhancement of monolith selectivity for highperformance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1937–1943.

Benhaim D., E. Grushka, Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 111–119.

Cai X., Z. Guo, X. Xue, J. Xu, X. Zhang, X. Liang, Two-dimensional liquid chromatography separation of peptides using reversed-phase/weak cationexchange mixed-mode column in first dimension, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 242–249.

Cheng X.D., 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.

Dabre R., N. Azad, A. Schwammle, M. Lammerhofer, W. Lindner, Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion exchange material by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 761–772.

Finessi E., R.T. Lidster, F. Whiting, T. Elliott, M.R. Alfara, G.B. McFiggans, et al., Improving the quantification of secondary organic aerosol using a microflow reactor coupled to HPLC-MS and NMR to manufacture ad hoc calibration standards, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11238–11245.

Gargano A.F., T. Leek, W. Lindner, M. Lammerhofer, Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction, *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 12–21.

Gennari O., D. Montesano, A. Salzano, S. Albrizio, L. Grumetto, Determination of dimethyl fumarate in desiccant and antimould sachets by reversed-phase liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 1315–1318.

Guo X., X. Zhang, Z. Guo, Y. Liu, A. Shen, G. Jin, et al., Hydrophilic interaction chromatography for selective separation of isomeric saponins, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 121–128.

Hinterwirth H., M. Lammerhofer, B. Preinerstorfer, A. Gargano, R. Reischl, W. Bicker, et al., Selectivity issues in targeted metabolomics: separation of phosphorylated carbohydrate isomers by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3273–3282.

Hou D., Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Curr. Mol. Med.* 3 (2003) 149–159.

Hu K., Y. Zhang, J. Liu, K. Chen, W. Zhao, W. Zhu, et al., Development and application of a new 25,27-bis(L-phenylalaninemethylester-N-carboxymethoxy)-26,28-dihydroxy-para-tert-butylcalix[4]arene stationary phase, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 445–453.

Hu K., S. Feng, M. Wu, S. Wang, W. Zhao, Q. Jiang, et al., Development of a V-shape bis(tetraoxacalix[2]arene[2]triazine) stationary phase for high performance liquid chromatography, *Talanta* 130 (2014) 63–70.

Hu K., Z. Deng, B. Wang, Y. Cui, M. Miao, W. Liu, et al., Development of a decaaza-cyclophane stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 60–66.

Huang H., Z. Lin, Y. Lin, X. Sun, Y. Xie, L. Zhang, et al., Preparation and evaluation of poly(4-vinylphenylboronic acid-co-pentaerythritol triacrylate) monolithic column for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 82–90.

Ibrahim M.E., C.A. Lucy, Mixed mode HILIC/anion exchange separations on latex coated silica monoliths, *Talanta* 100 (2012) 313–319.

Iverson C.D., C.A. Lucy, Aniline-modified porous graphitic carbon for hydrophilic interaction and attenuated reverse phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1373 (2014) 17–24.

Janas P., S. Bocian, P. Jandera, T. Kowalkowski, B. Buszewski, Separation of flavonoids on different phenyl-bonded stationary phases-the influence of polar groups in stationary phase structure, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 198–206.

Jandera P., Z. Kucˇerova, J. Urban, Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8874–8889.

Jiang P., D. Wu, C.A. Lucy, Determination of void volume in normal phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 63–70.

Jin H., Y. Liu, Z. Guo, F. Yang, J. Wang, X. Li, et al., High-performance liquid chromatography separation of cis-trans anthocyanin isomers from *wiruthenicum* Murr. employing a mixed-mode reversed-phase/strong anionexchange stationary phase, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 500–508.

Kumar A.P., V.R. Ganesh, D.V. Rao, C. Anil, B.V. Rao, V.S. Hariharakrishnan, et al., A validated reversed phase HPLC method for the determination of process-related impurities in almotriptan malate API, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 792–798.

Lammerhofer M., M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2572–2588.

Lammerhofer M., R. Nogueira, W. Lindner, Multi-modal applicability of a reversed-phase/weak-anion exchange material in reversed-phase, anion-exchange, ion-exclusion, hydrophilic interaction and hydrophobic interaction chromatography modes, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2517–2530.

Li Y., Z. Xu, Y. Feng, X. Liu, T. Chen, H. Zhang, Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Chromatographia* 74 (2011) 523–530.

Li Y., J. Yang, J. Jin, X. Sun, L. Wang, J. Chen, New reversed-phase/anion-exchange/hydrophilic interaction mixed-mode stationary phase based on dendritic polymer-modified porous silica, *J. Chromatogr. A* 1337 (2014) 133–139.

Li Y., Y. Feng, T. Chen, H. Zhang, Imidazoline type stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5987–5994.

Liang C., H.-Z. Lian, Recent advances in lipophilicity measurement by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 28–36.

Liang T., Q. Fu, A. Shen, H. Wang, Y. Jin, H. Xin, et al., Preparation and chromatographic evaluation of newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1388 (2015) 110–118.

Lin Z., X. Tan, R. Yu, J. Lin, X. Yin, L. Zhang, et al., One-pot preparation of glutathione-silica hybrid monolith for mixed-mode capillary liquid chromatography based on “thiol-ene” click chemistry, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 228–237.

Liu S., H. Xu, J. Yu, D. Li, M. Li, X. Qiao, et al., Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8989–8997.

Liu X., C. Pohl, New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 83–89.

Liu X., C.A. Pohl, HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange

trimode column, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 779–786.

Liu X., C.A. Pohl, Comparison of reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimodal stationary phases and their use in active pharmaceutical ingredient and counterion determinations, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 190–195.

Liu X., C. Pohl, A. Woodruff, J. Chen, Chromatographic evaluation of reversedphase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases prepared by electrostatically driven self-assembly process, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011)

Liu Y., Z. Guo, Y. Jin, X. Xue, Q. Xu, F. Zhang, et al., “Click oligo(ethylene glycol)”: an excellent orthogonal stationary phase to C18 for two-dimensional reversedphase/reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008)153–159.

Liu Y., Q. Du, B. Yang, F. Zhang, C. Chu, X. Liang, Silica based click amino stationary phase for ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography, *Analyst* 137 (2012) 1624–1628.

Lu J., W. Zhang, Y. Zhang, W. Zhao, K. Hu, A. Yu, et al., A new stationary phase for high performance liquid chromatography: calix[4]arene derivatized chitosan bonded silica gel, *J. Chromatogr. A* 1350 (2014) 61–67.

Nogueira R., M. Lammerhofer, W. Lindner, Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 158–169.

Ohyama K., Y. Inoue, N. Kishikawa, N. Kuroda, Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 257–260.

Ohyama K., S. Takasago, N. Kishikawa, N. Kuroda, Poly(L-lactic acid)-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 720–723.

Qiao L., S. Wang, H. Li, Y. Shan, A. Dou, X. Shi, et al., A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014)240–247.

Qiao L., X. Shi, X. Lu, G. Xu, Preparation and evaluation of surface-bonded tricationic ionic liquid silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1396 (2015) 62–71

Qiao X., L. Zhang, N. Zhang, X. Wang, X. Qin, H. Yan, et al., Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/ hydrophilic interaction mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1400(2015) 107–116.

Qiao X., D. Tao, Y. Qu, L. Sun, L. Gao, X. Zhang, et al., Large-scale N-glycoproteome map of rat brain tissue: simultaneous characterization of insoluble and soluble protein fractions, *Proteomics* 11 (2011) 4274–4278.

Qiu H., A.K. Mallik, M. Takafuji, S. Jiang, H. Ihara, New poly (ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography, *Analyst* 137 (2012) 2553–2555.

Qiu H., M. Zhang, T. Gu, M. Takafuji, H. Ihara, A Sulfonic-azobenzene-grafted silica amphiphilic material: a versatile stationary phase for mixed-mode chromatography, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 18004–18010.

Rajwade R.P., R. Pande, Evaluation of lipophilicity of N-arylhydroxamic acids by reversed phase-high performance liquid chromatographic method and self-organizing molecular field analysis, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 205–210.

Ray S., M. Takafuji, H. Ihara, Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: mixed mode behavior, *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 43–52.

Shan Y., L. Qiao, X. Shi, G. Xu, Preparation and evaluation of a novel hybrid monolithic column based on pentafluorobenzyl imidazolium bromide ionic liquid, *J. Chromatogr. A* 1375 (2015) 101–109.

Shen A., X. Li, X. Dong, J. Wei, Z. Guo, X. Liang, Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 63–69.

Shen G., F. Zhang, B. Yang, C. Chu, X. Liang, A novel amide stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography and ion chromatography, *Talanta* 115 (2013) 129–132.

Shi X., L. Qiao, G. Xu, Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1420 (2015) 1–15.

Sun M., J. Feng, C. Luo, X. Liu, S. Jiang, Benzimidazole modified silica as a novel reversed-phase and anion-exchange mixed-mode stationary phase for HPLC, *Talanta* 105 (2013) 135–141.

Sun M., J. Feng, X. Wang, H. Duan, L. Li, C. Luo, Dicationic imidazolium ionic liquid modified silica as a novel reversed-phase/anion-exchange mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2153–2159.

Sun M., J. Feng, S. Liu, C. Xiong, X. Liu, S. Jiang, Dipyrindine modified silica – a novel multi-interaction stationary phase for high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3743–3749.

Sun M., J. Feng, C. Luo, X. Liu, S. Jiang, Quinolinium ionic liquid-modified silica as a novel stationary phase for high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2651–2658.

Sun M., H. Qiu, L. Wang, X. Liu, S. Jiang, Poly(1-allylimidazole)-grafted silica, a new specific stationary phase for reversed-phase and anion-exchange liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3904–3909.

Sun S., X. Zhang, Q. Han, W. Wan, M. Ding, Preparation and retention mechanism exploration of mesostructured cellular foam silica as stationary phase for high performance liquid chromatography, *Talanta* 149 (2016) 187–193.

Wang Q., 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.

Yang F., Q. Bai, K. Zhao, D. Gao, L. Tian, Preparation of a novel weak cation exchange/hydrophobic interaction chromatography dual-function polymerbased stationary phase for protein separation using “thiol-ene click chemistry”, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1721–1734.

Yang J., Y. Li, Y. Wang, J. Ruan, J. Zhang, C. Sun, Recent advances in analysis of phthalate esters in foods, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 10–26.

Yang Y., X. Geng, Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8813–8825.

Zhang M., X. Liang, S. Jiang, H. Qiu, Preparation and applications of surfaceconfined ionic-liquid stationary phases for liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 53 (2014) 60–72.

Zhang M., A.K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara, H. Qiu, Versatile ligands for high-performance liquid chromatography: an overview of ionic liquidfunctionalized stationary phases, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 1–16.

Zhang P., J. Chen, L. Jia, N-methylimidazolium-functionalized monolithic silica column for mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3459–3465.

Zhang Z., Y.H. Hao, J. Ding, S.N. Xu, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, One-pot preparation of a mixed-mode organic-silica hybrid monolithic capillary column and its application in determination of endogenous

Zhang Z.B., W.G. Zhang, W.J. Luo, J. Fan, Preparation and enantioseparation characteristics of a novel chiral stationary phase based on mono (6(A)-azido-6(A)-deoxy)-per(p-chlorophenylcarbamoylated) beta-cyclodextrin, *J. Chromatogr. A* 1213 (2008) 162–168

Zhao K., F. Yang, H. Xia, F. Wang, Q. Song, Q. Bai, Preparation stationary phase for protein separation using click chemistry, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 703–710.

Zhao Q., F. Fang, Y. Liang, H. Yuan, K. Yang, Q. Wu, et al., 1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride-assisted sample preparation method for efficient integral membrane proteome analysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7544–7550.

Zhao W., W. Wang, H. Chang, S. Cui, K. Hu, L. He, et al., Tetraazacalix[2] arene[2] triazine modified silica gel: a novel multi-interaction stationary phase for mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 74–81.

Zhao Y., H.C. Law, Z. Zhang, H.C. Lam, Q. Quan, G. Li, et al., Online coupling of hydrophilic interaction/strong cation exchange/reversed-phase liquid chromatography with porous graphitic carbon liquid chromatography for simultaneous proteomics and N-glycomics analysis, *J. Chromatogr. A* 1415(2015) 57–66.

Zhu B.Y., C.T. Mant, R.S. Hodges, Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns, *J. Chromatogr.* 548 (1991) 13–24.

Zhu G., L. Sun, R.B. Keithley, N.J. Dovichi, Capillary isoelectric focusing-tandem mass spectrometry and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitative proteomic analysis of differentiating PC12 cells by eight-plex isobaric tags for relative and absolute quantification, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7221–7229.

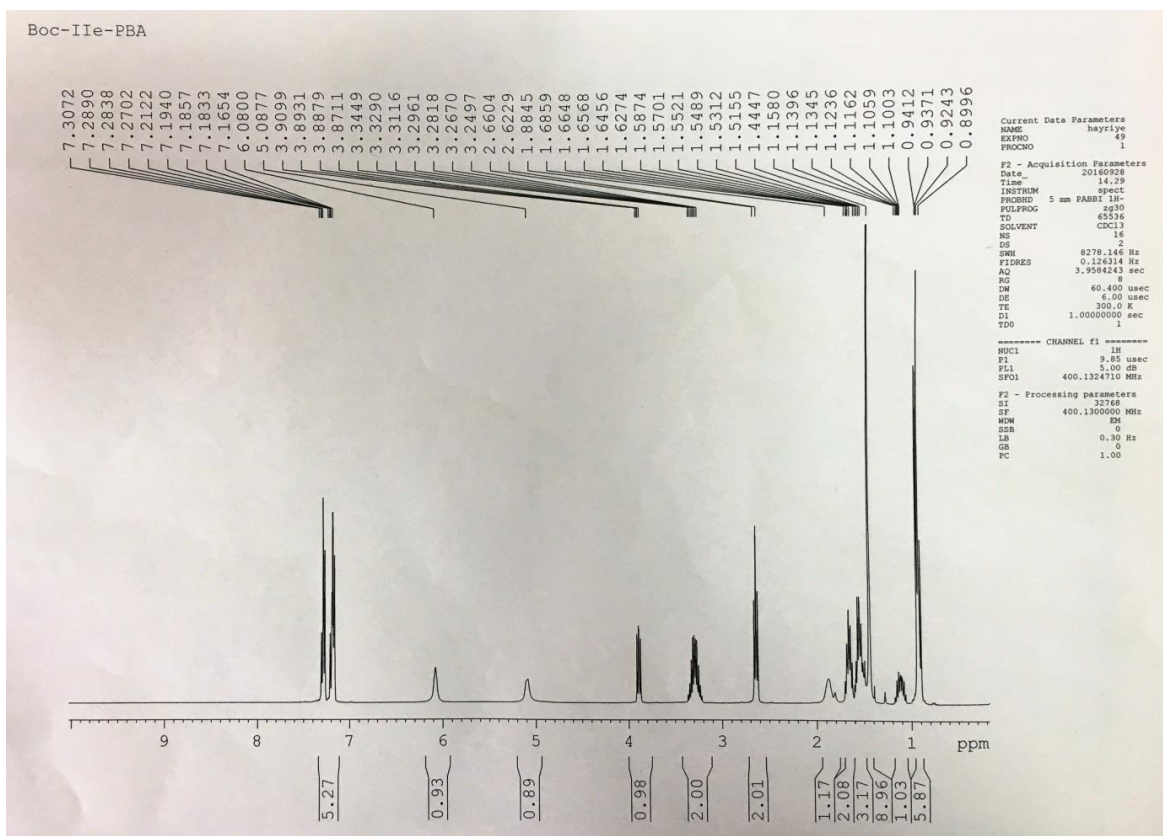
Zhou Q., P. Yang, X. Xiao, L. Jia, Polydopamine-functionalized monolithic silica column for mixed-mode chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1516–1523.

Zimmermann A., J. Horak, O.L. Sanchez-Munoz, M. Lammerhofer, Surface charge fine tuning of reversed-phase/weak anion-exchange type mixed-mode stationary phases for milder elution conditions, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 189–200.

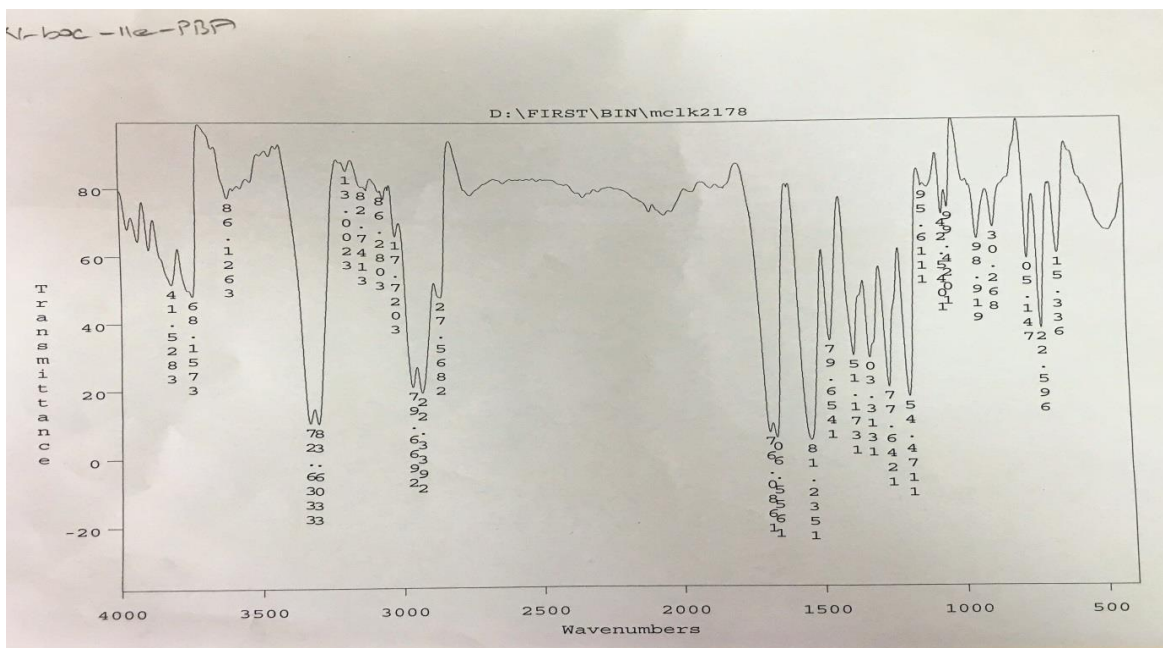
Zimmermann A., R. Greco, I. Walker, J. Horak, A. Cavazzini, M. Lammerhofer, Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1354 (2014) 43–55.

EKLER SPEKTRUMLAR

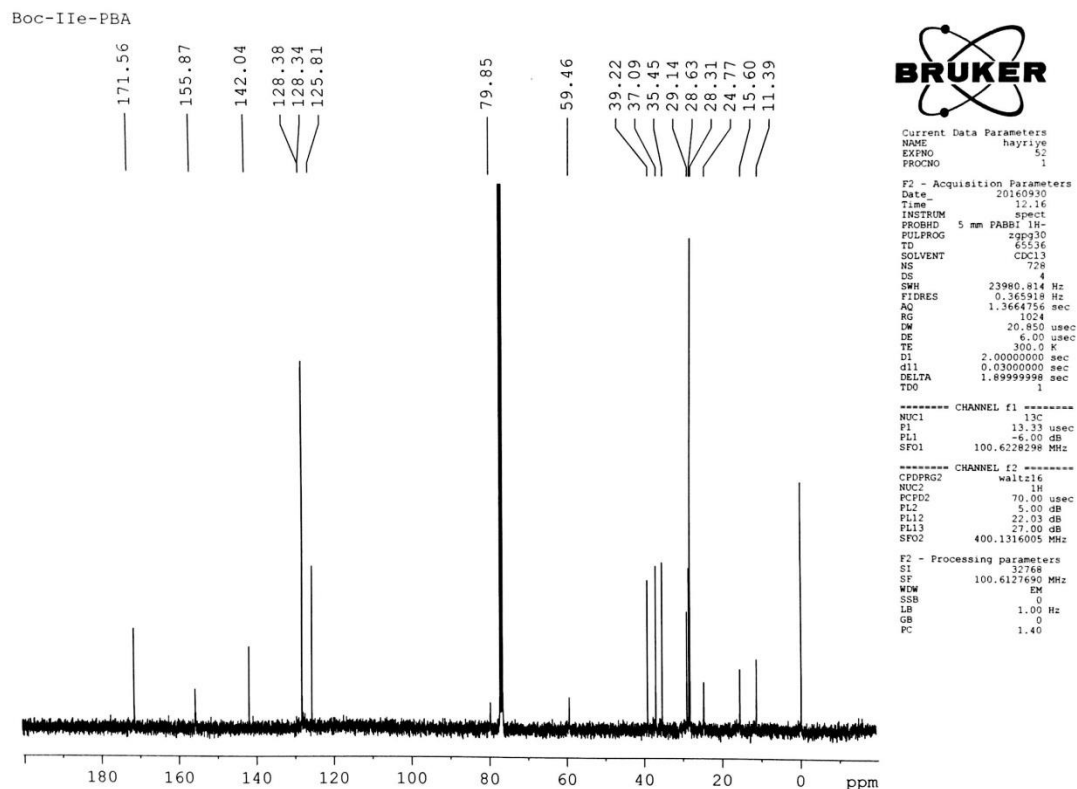
N-Boc-Ile-PBA ^1H NMR



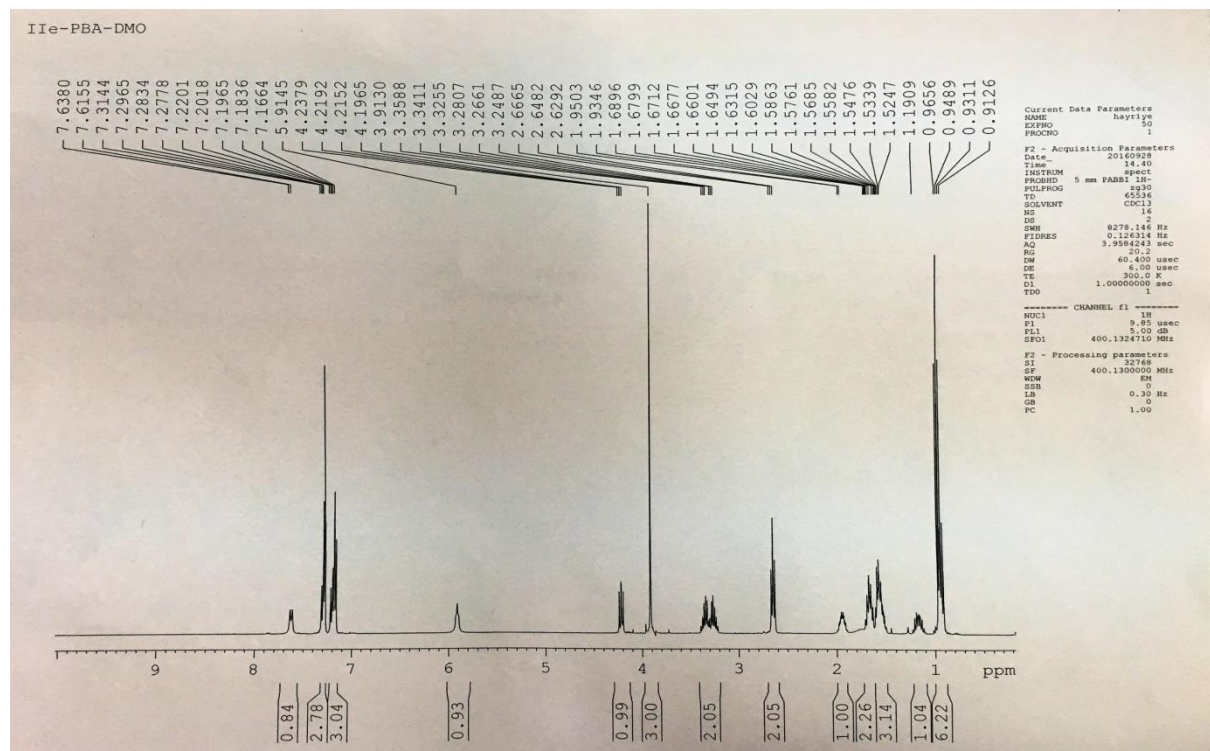
N-Boc-Ile-PBA'nın FTIR spektrumu



N-Boc-Ile-PBA'nın ^{13}C NMR spektrumu

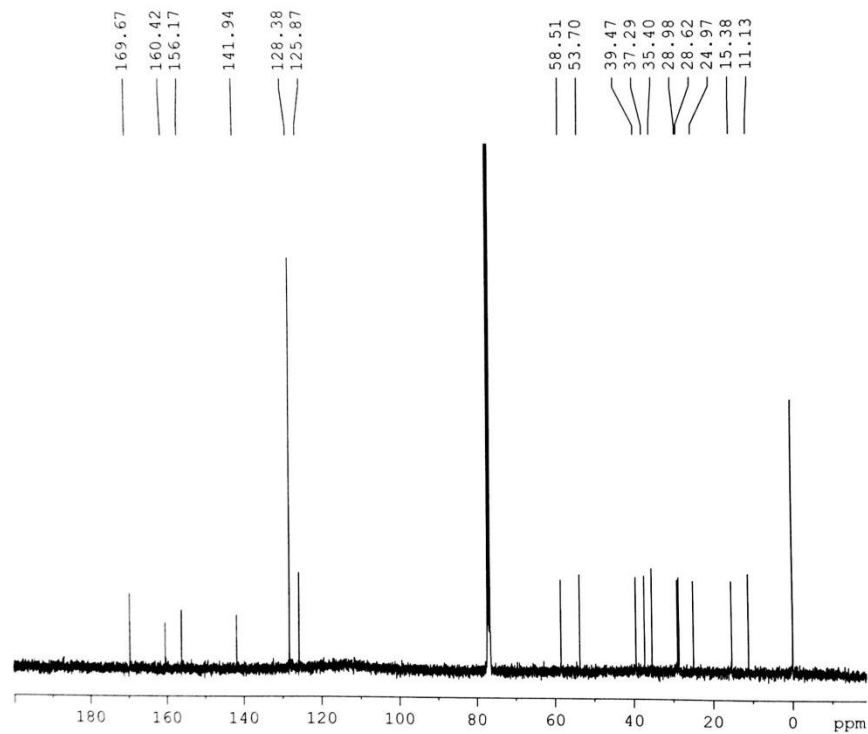


Ile-PBA-DMO'nun ^1H NMR spektrumu



Ile-PBA-DMO'nun ^{13}C NMR spektrumu

Ile-PBA-DMO



Current Data Parameters
NAME hayriye
EXPNO 51
PROCNO 1

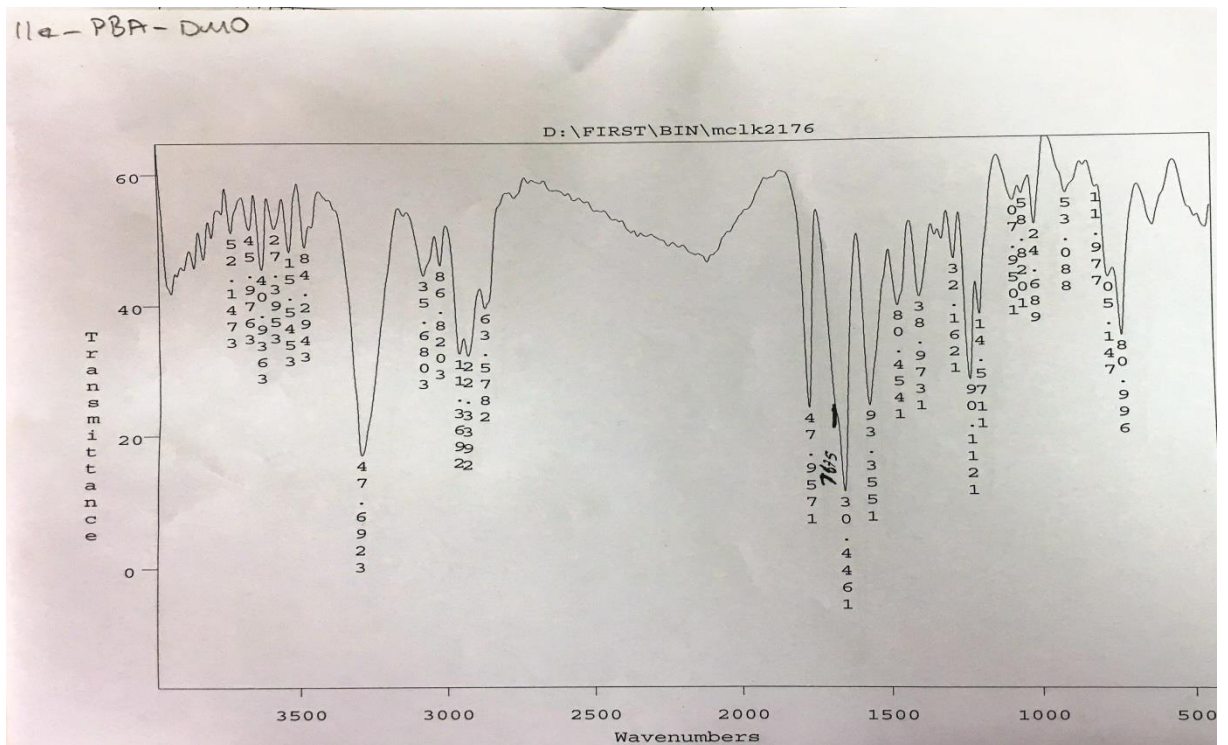
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160930
Time_ 16.50
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBI 1H-
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 2901
DS 4
SWH 23980.814 Hz
FIDRES 0.365918 Hz
AQ 1.3664756 sec
RG 574.7
DW 20.850 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
DELTA 1.89999998 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 ^{13}C
P1 13.33 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6228298 MHz

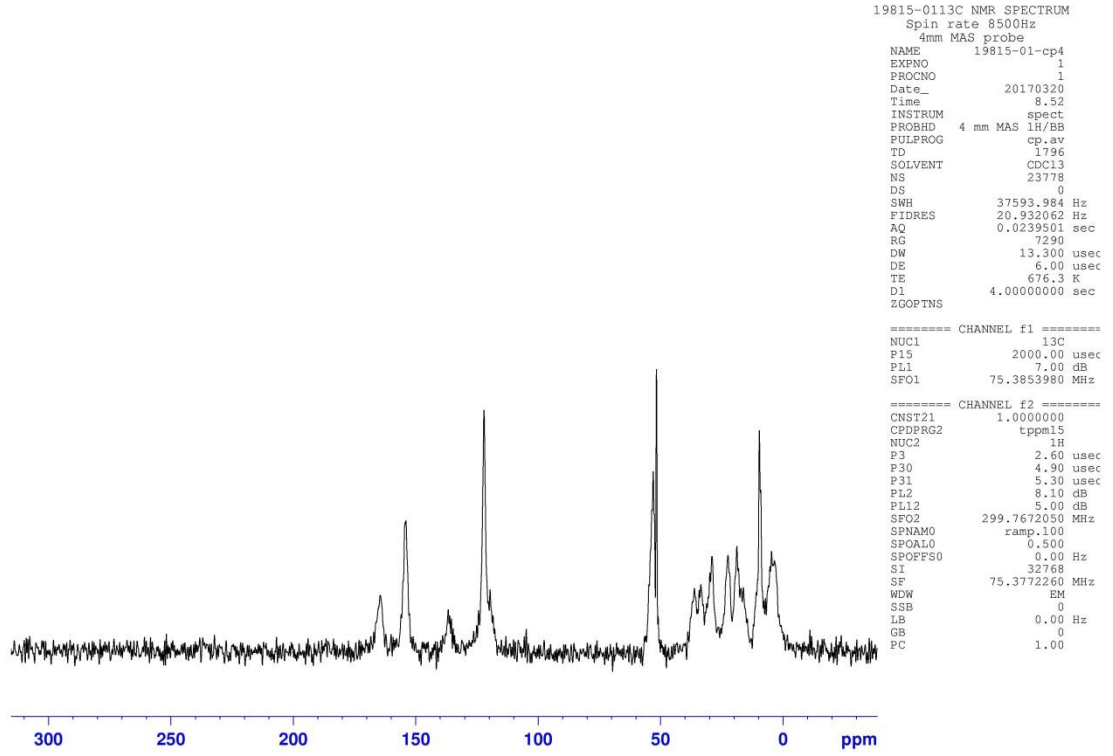
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2 waltz16
NUC2 ^1H
PCPD2 70.00 usec
PL2 5.00 dB
PL12 22.03 dB
PL13 27.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6127690 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

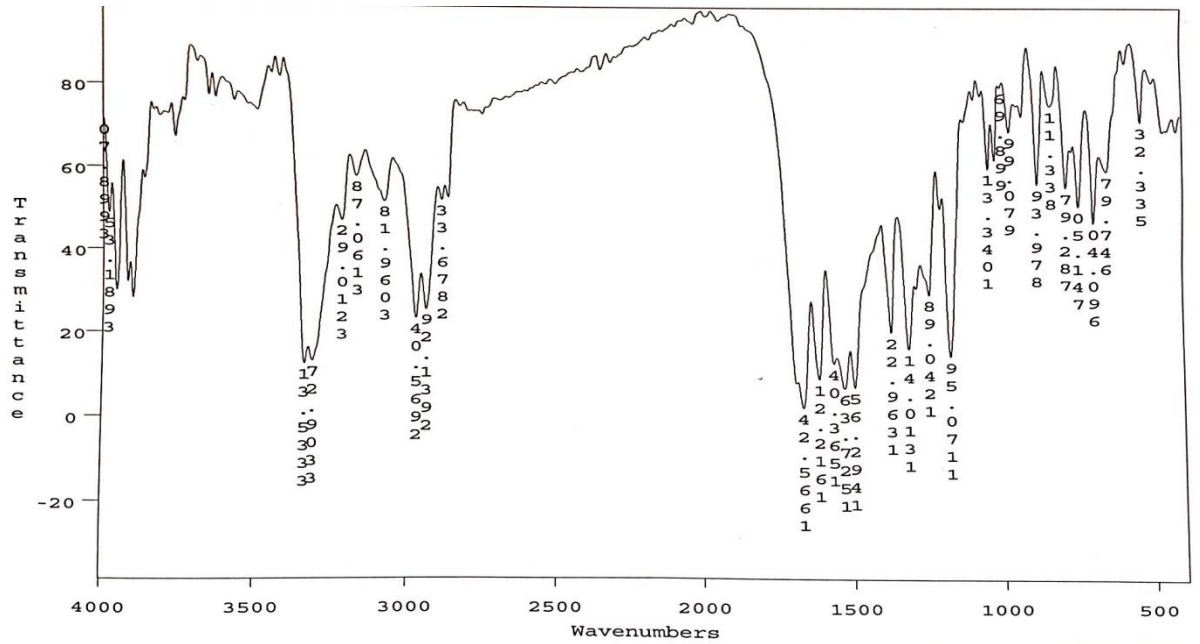
Ile-PBA-DMO'nun FTIR spektrumu



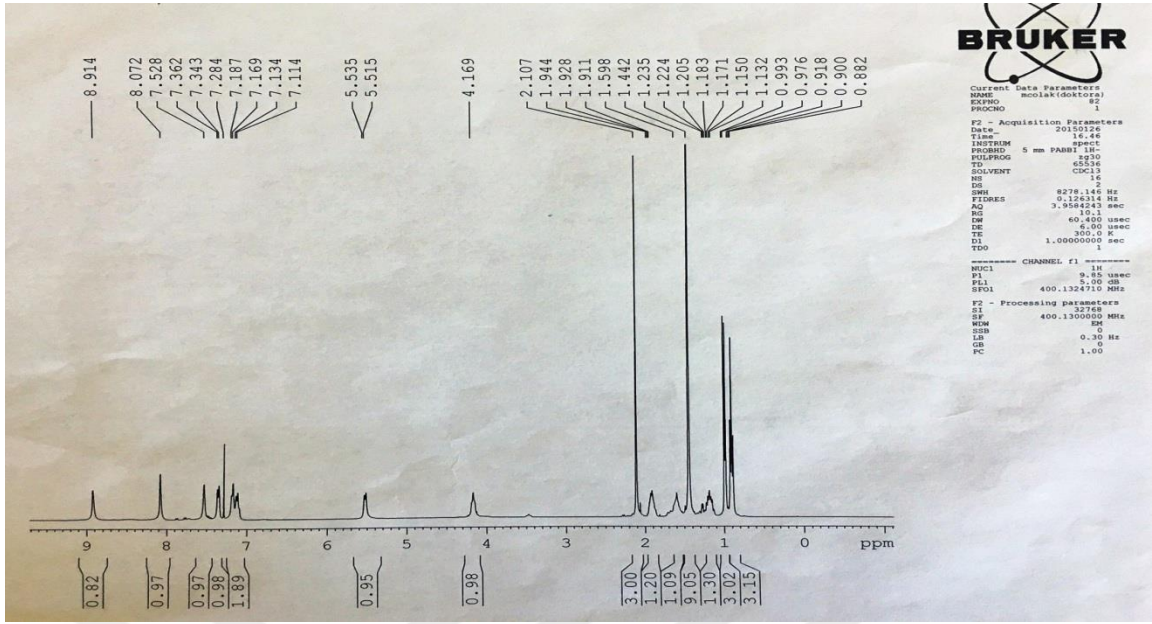
İle-PBA-Mix'in 13 C NMR spektrumu



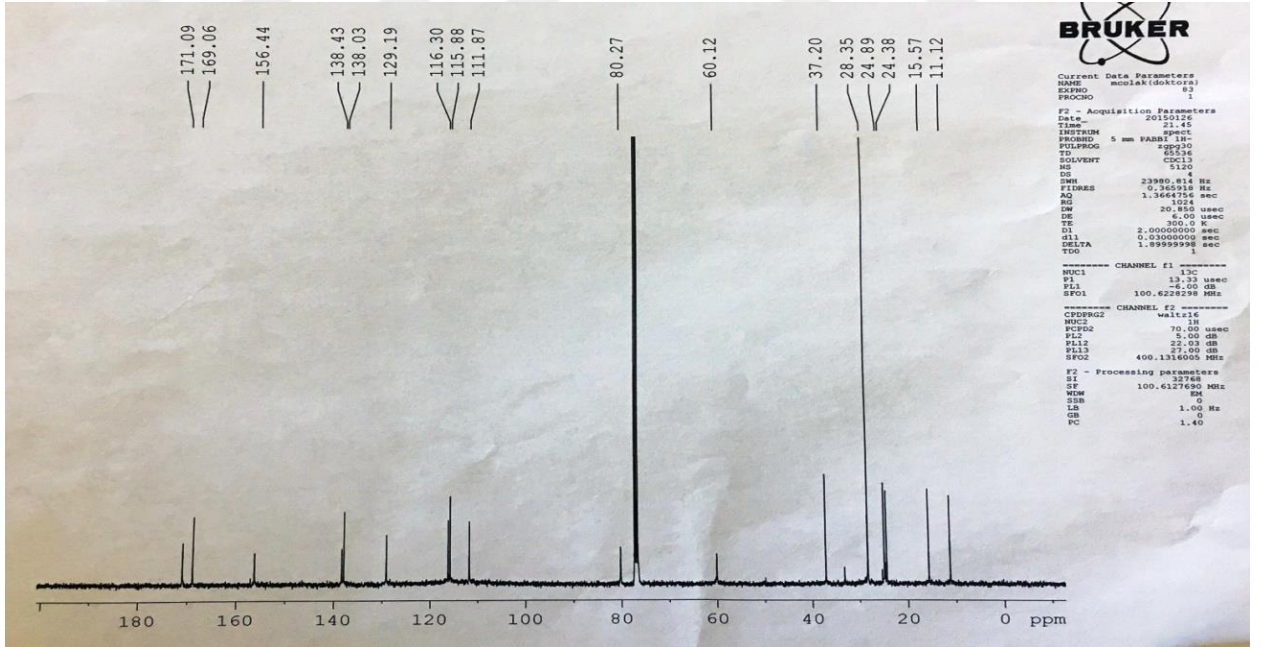
1 no'lu bileşik için FTIR spektrumu



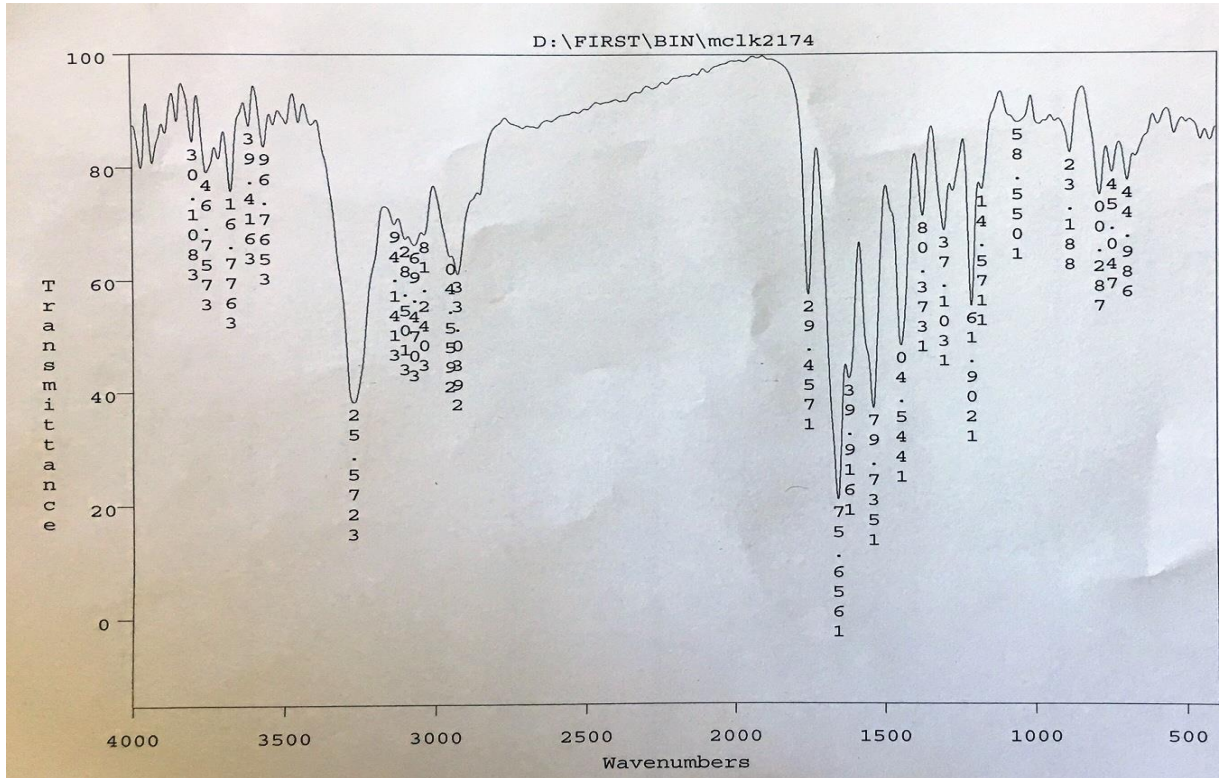
1 no'lu bileşik için ^1H NMR spektrumu



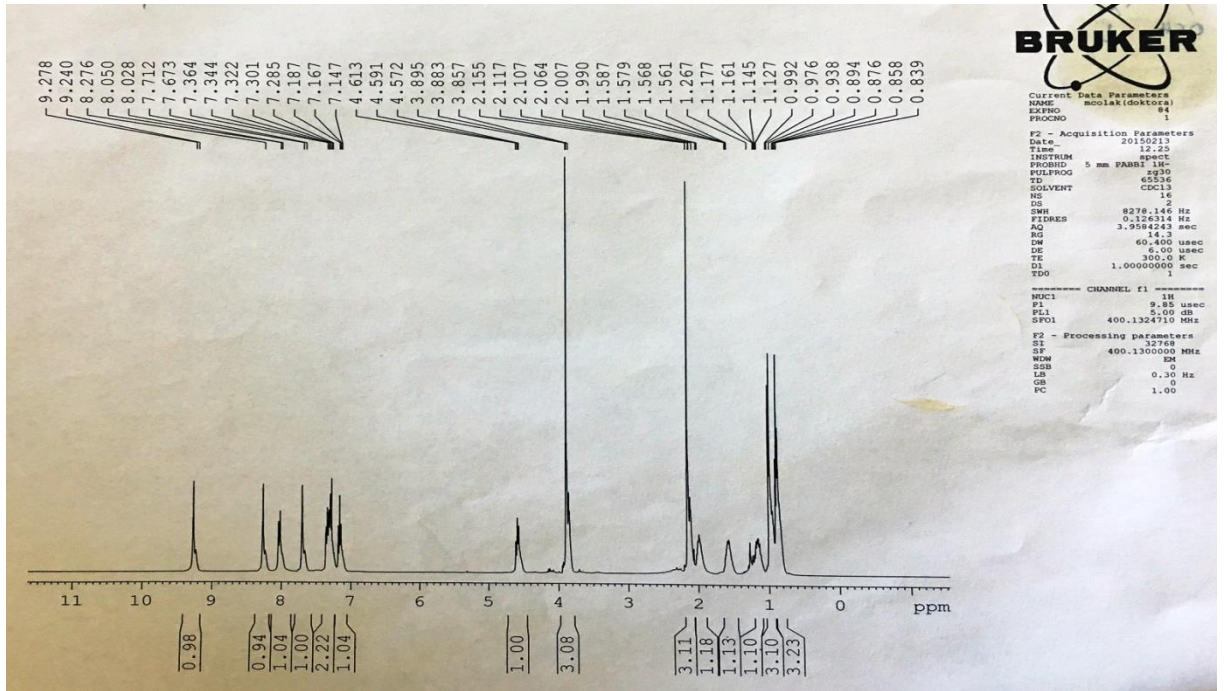
1 no'lu bileşik için ^{13}C NMR spektrumu



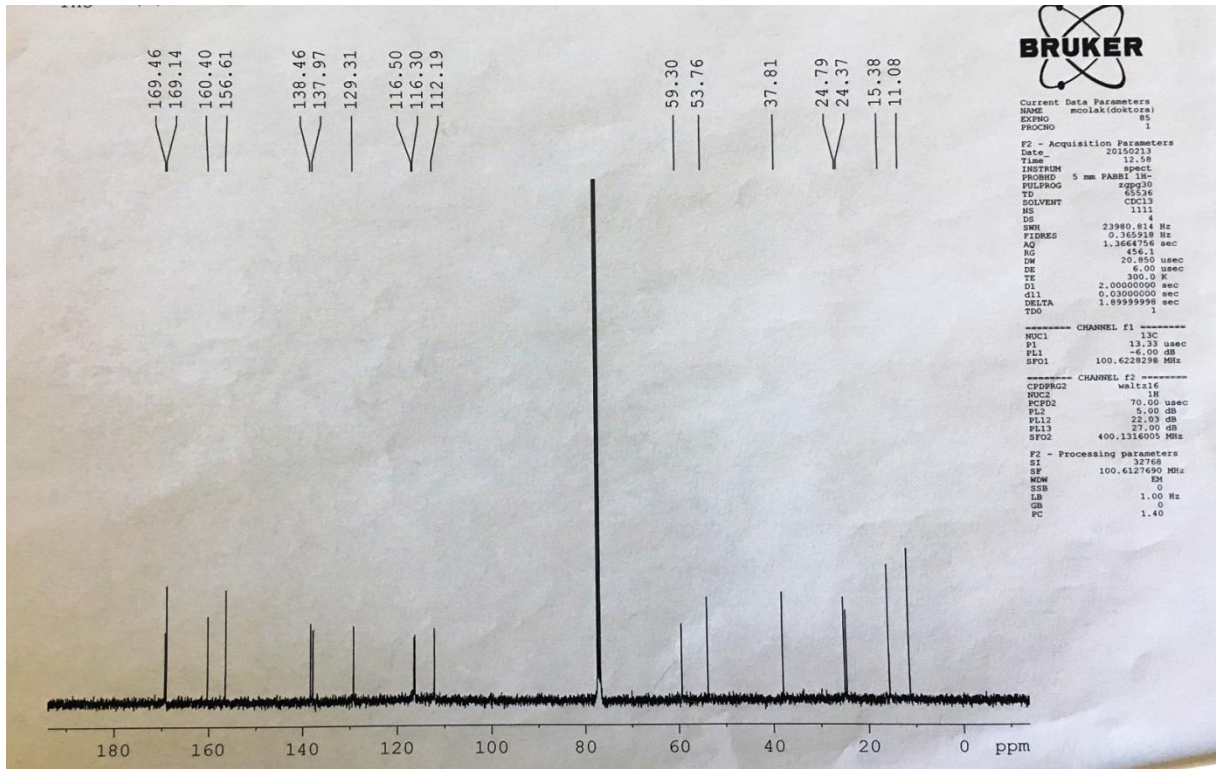
3 no'lu bileşik için FTIR spektrumu



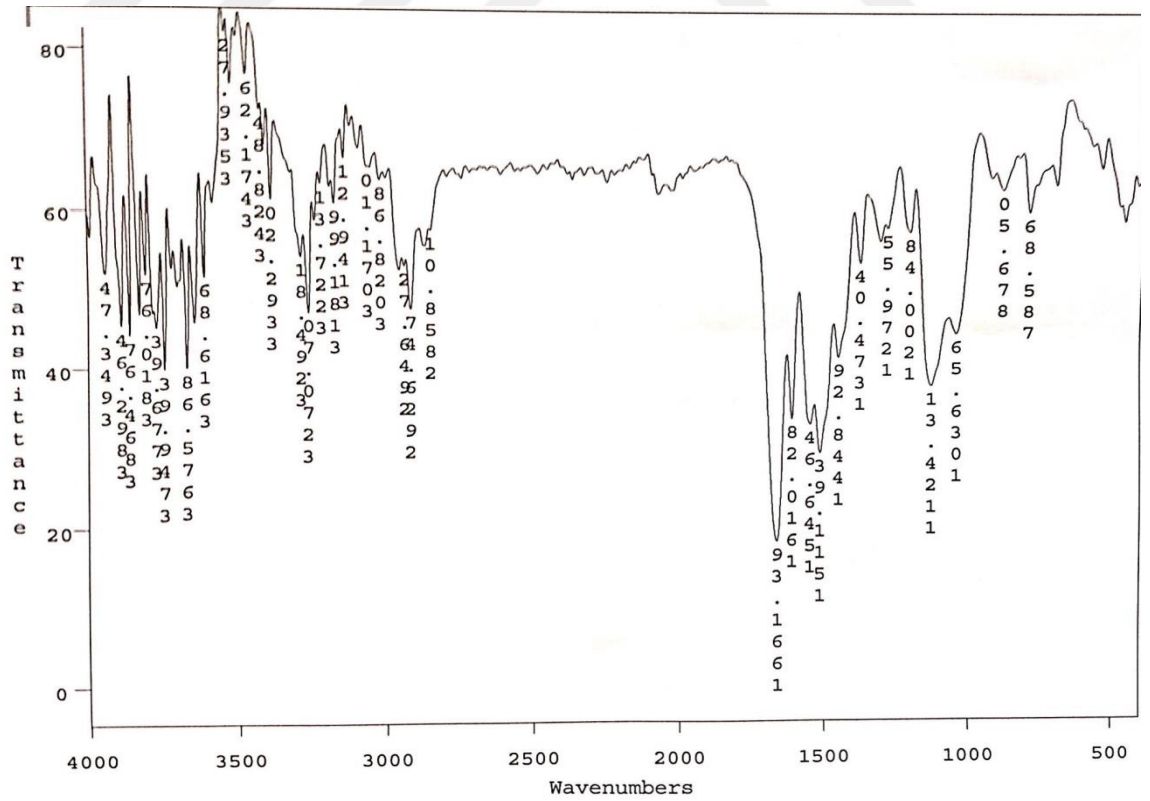
3 no'lu bileşik için ¹H NMR spektrumu



3 no'lu bileşik için ^{13}C NMR spektrumu



4 no'lu bileşik için FTIR spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Salih Erkan YENG
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Diyarbakır/01.09.1980
Telefon : 0(506)5962983
Faks : -
e-mail : ersal_x@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe	İl	Bitirme Yılı
Lise	: Fatih Lisesi /Merkez/Diyarbakır			1994-1997
Üniversite	: Dicle Üniversitesi/Merkez/Diyarbakır			1998-2004
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi			2012-
Doktora	: -			

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2005-2006	Özel Diyar Hedef Derşhanesi	Öğretmen
2006-2007	Özel Pisagor Derşhanesi	Öğretmen
2007-2008	Özel Pratik Derşhanesi	Öğretmen
2008-2010	Özel Karacadağ Derşhanesi	Öğretmen
2010-	Özel Diyarbakır Doğa Koleji	Öğretmen

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLİ: İngilizce