

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI POLARİTELERE SAHİP AMİD-SİLİKA KOLON DOLGU
MATERYALLERİNİN SENTEZİ VE HPLC İLE ÇEŞİTLİ POLAR
BİLEŞİKLERİN AYRILMASINDA KULLANILMASI**

Hayriye ARAL

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**DIYARBAKIR
ŞUBAT 2013**

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Hayriye ARAL tarafından yapılan “Farklı Polaritelere Sahip Amid-Silika Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi ve HPLC ile Çeşitli Polar Bileşiklerin Ayrılmasında Kullanılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof.Dr. M.Reşat APAK

Üye : Prof.Dr. Recep ZİYADANOĞULLARI

Üye : Prof.Dr. Tahsin KILIÇOĞLU

Üye : Prof.Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI

Üye : Prof.Dr. Ömer YAVUZ

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25 / 02 / 2013

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ /2013

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI danışmanlığında yapılmıştır. Bugünlere gelmemde en çok emeği geçenlerden biri olan sayın hocama, vermiş oldukları her türlü destekten, bilgi ve tecrübelerini paylaştıklarından ve bu çalışmayı yaparken her daim bana olan sonsuz güvenlerinden dolayı kendilerine şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Recep ZİYADANOĞULLARI'na ömür boyu bir vefa borcum olacağını belirtir sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın gerek ligandların sentezi ve gerekse HPLC uygulamaları aşamasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve beni her daim olumlu yönlendirmeleriyle hayata bağlayan Batman Üniversitesi öğretim üyesi sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Tarık Aral'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca her zaman güler yüzünü ve manevi desteğini gördüğüm çok değerli Sayın Hocam Doç. Dr. Işıl AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam esnasında her zaman manevi desteğini hissettiğim sevgili arkadaşım Uzm. Dr. Elif Varhan Oral'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın tamamlanabilmesi için gerekli olan alt yapıyı sundukları için Fen Fakültesi Dekanlığı'na, Kimya Bölüm Başkanlığı'na ve emeği geçen herkese teşekkür ederim. Ayrıca DÜBAP-10-FF-29 no'lu doktora projesi ile katkı sağlayan DÜBAP'a, çalışmanın büyük bir kısmını yapmamda Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarları imkânlarını sunan Batman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde maddi ve manevi büyük katkıları olan ve hayatını bana adayan çok kıymetli aileme saygı ve teşekkürlerimi sunmaktan onur duyarım. İyi ki varsınız...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ	XI
KISALTMA VE SİMGELER	XII
1. GİRİŞ	1
1.1 HPLC Türleri	2
1.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC)	2
1.1.2. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC) ..	2
1.1.3. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC)	2
1.1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC)	3
1.1.5. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC)	5
1.1.6. HPLC Kullanım Alanları	8
1.1.6.1. Bileşen Ayırma	8
1.1.6.2. Saflaştırma	8
1.1.6.3. Tanımlama	8
1.1.6.4. Derişim Tayini	9
1.1.6.5. İzokratik Elüsyon	9
1.1.6.6. Gradient Elüsyonu	9
1.1.7. HPLC Sistemleri	9
1.1.7.1. Hareketli Faz	10
1.1.7.2. Sabit Faz	10
1.1.7.3. Pompa	10
1.1.7.4. Kolon	11
1.1.7.5. Dedektör	11

2.	KAYNAK ÖZETLERİ	13
2.1.	HPLC’de Kullanılan Dolgu Maddeleri	13
2.1.1.	Silika Jel	15
2.1.1.1.	Silanoller	16
2.1.1.2.	Silanol Aktivitesini Azaltma Metodları	19
2.1.2.	Polar Dolgu Maddeleri	20
2.1.2.1.	Polar Gömülü (Embedded) Ters-Faz Dolgu Maddeleri	20
2.1.2.2.	Polar HILIC Dolgu Maddeleri	26
3.	MATERYAL VE METOD	47
3.1.	Materyal	47
3.2.	Sentez	47
3.3.	Metot	49
3.3.1.	N-Boc-N’-Sikloheksilfenilalanamid’in Sentezi (1)	49
3.3.2.	N’-Sikloheksilfenilalanamid’in Sentezi (2)	50
3.3.3.	3-Kloropropilsilika jel (3)	51
3.3.4.	SP1 Dolgu Maddesinin Sentezi	51
3.3.5.	N-Boc-N’-Fenilglutamid’in Sentezi (4)	52
3.3.6.	N’-Fenilglutamid’in Sentezi (5)	52
3.3.7.	SP2 Dolgu Maddesinin Sentezi	53
3.4.	HPLC Koşulları	53
3.5.1.	Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	56
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1.	Dolgu Maddelerinin Karakterizasyonu	59
4.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması	61
4.2.1.	Ayırma Üzerine pH’nın Etkisi	64
4.2.2.	Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi: Tampon Değişimi ve ACN oranı	66
4.2.3.	Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi	69
4.2.4.	Ayırma Üzerine Akış Hızı Etkisi	70

4.3.	Nükleotit ve Nükleozitlerin Ayrılması	71
4.3.1.	Ayırma Üzerine pH'nın Etkisi	76
4.3.2.	Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi: Tampon Derişimi ve Oranı	76
4.3.3.	Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi	78
4.4.	Fenolik Bileşiklerin Ayrılması	79
4.4.1.	Ayırma Üzerine pH'nın Etkisi	81
4.4.2.	Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi	82
4.4.3.	Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi	83
4.5.	Süstitüe Anilinlerin Ayrılması	84
4.6.	Sudan Boyalarının Ayrılması	87
4.7.	Herbisitlerin Ayrılması	90
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	91
6.	KAYNAKLAR	97
	EKLER	113
	ÖZGEÇMİŞ	151

ÖZET

FARKLI POLARİTELERE SAHİP AMİD-SİLİKA KOLON DOLGU MATERYALLERİNİN SENTEZİ VE HPLC İLE ÇEŞİTLİ POLAR BİLEŞİKLERİN AYRILMASINDA KULLANILMASI

DOKTORA TEZİ

Hayriye Aral

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2013

Son zamanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında polar gruplar içeren dolgu maddeleriyle yapılan çalışmaların, bu dolgu maddelerinin yaygın olarak kullanılan geleneksel fazlar olan C8 ve C18 fazlarına göre bazik analitlere karşı çok daha iyi ayırma sağladığını göstermiştir. Polar gruplar, özellikle amidler, bazik analitlerle güçlü etkileşim yapabilmelerinden dolayı tercih edilir. Ayrıca amid grubu içeren dolgu fazları, düşük molekül ağırlıklı asitlere karşı da üstün bir seçicilik gösterir (Ascah ve ark. 1996).

Bu çalışmada iki adet silika tabanlı amid türevi yeni dolgu maddesi elde edildi. Bu amidlerden birisi N-Boc-Fenilalanin, sikloheksil amin ve küresel silika jel (4µm, 60 Å); diğeri ise N-Boc-Glutamin, anilin ve küresel silika jel (4µm, 60 Å) kullanılarak elde edildi. Her iki sentezin ilk basamağı (amid sentezi) DCC ortamında gerçekleştirildi. Daha sonra her iki amid bileşiğinin boc grubu TFA/CH₃COOH ortamında kaldırıldı. Bunlardan N-Boc-Fenilalanin ve sikloheksilaminden elde edilen boc grubu kaldırılmış bileşik 3-kloropropiltrimetoksisilan (CPTMS) ile uyarlanmış küresel silika jel ile etkileştirilerek **SP1** kodlu dolgu fazı hazırlandı. Öte yandan N-Boc-Glutamin ve anilinden elde edilen boc koruyucu grubu kaldırılmış bileşik 3-glisidiloksipropiltrimetoksisilan (GPTMS) ile etkileştirildi ve daha sonra küresel silika jel ile reaksiyona sokularak **SP2** kodlu dolgu fazı hazırlandı. Her iki dolgu maddesinin yapısı element analizi, SEM ve IR ile tayin edildi. Bu dolgu fazları geleneksel bulamaç paketleme metodu ile yüksek basınç altında HPLC boş kolonuna dolduruldu. Kolonlar on üç bitki büyüme düzenleyicisi, on bir fenolik bileşik, on sübstitüe anilin, çeşitli nükleotid ve nükleozitler ve sudan boyalarının ayrılmasında kullanıldı. Dolgu maddelerinin özelliklerini ve ayırma gücünü incelemek için mobil faz içeriği, pH, tampon derişimi, akış hızı, sıcaklık gibi şartlara karşı ayrıntılı optimizasyon çalışmaları yapıldı. SP1'in özellikle bitki büyüme düzenleyicilerine karşı SP2'nin de nükleotid ve nükleozidlere karşı piyasadaki mevcut ticari kolonlarla yarışacak ölçüde performans gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Polar dolgu fazı, Amid dolgu fazı, HILIC, Polar analitler.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF AMID-SILICA STATIONARY PHASES HAVING DIFFERENT POLARITIES AND USING IN SEPERATION OF A VARIETY OF POLAR COMPOUNDS BY HPLC

Ph.D. THESIS

Hayriye Aral

UNIVERSITY OF DICLE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2013

Recent investigations describing stationary phases containing embedded polar groups have shown the superior performance of these new phases over conventional C₈ and C₁₈ phases for alkaline analytes. The polar groups, particularly amide, were originally chosen for their ability to interact with alkaline analytes. In addition, the amide phases have shown enhanced polar groups show different selectivities and are less retentive, requiring a mobile phase with a lower concentration of organic solvent (Ascah and at all. 1996).

In this study new stationary phases that were made of two silica-based amide derivative were synthesized starting from either N-Boc-phenylalanine and N-Boc-Glutamine aminoacids, cyclohexylamine or aniline and spherical silica gel (4µm, 60 Å). Two new amide compounds were obtained by interacting N-Boc-phenylalanine with cyclohexylamine and N-Boc-Glutamine with aniline in the presence of DCC. Then the boc group was removed using TFA/CH₃COOH. Resulted amides were reacted either using with spherical silica gel modified with 3-chloropropyltrimethoxysilane or 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane yielded **SP1** and **SP2**. The resulting amide bonded stationary phases were characterized by SEM, IR and elemental analysis. Two stationary phases were given HPLC columns with conventional slurry packing method. Optimization studies towards mobile phase content, pH, mobile phase concentration, flow rate and temperature were made to observe properties of stationary phases and their separation efficiency. It was determined that SP1 towards especially plant growth regulators and SP2 towards especially nucleosides and nucleotides showed enhanced performance rate percentage with supply commercial columns.

Key Words: HPLC, polar stationary phase, Amide stationary phase, HILIC, Polar analytes

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Kolon: Hypersil-C18 (5 µm, 150x4.6 mm); Hareketli faz: Metanol/Su 60/40, Akış Hızı: 1 ml/dak., Analit: Alkilbenzen karışımı	3
Şekil 1.2.	RPC’de yaygın olarak kullanılan hareketli faz tür ve özellikleri	4
Şekil 2.1.	Bağlanma Reaksiyonunun Şeması	13
Şekil 2.2.	Monomerik ve Polimerik Dolgu Fazları	14
Şekil 2.3.	Silika Yüzeyindeki Silanollerin Bulunma Şekli	17
Şekil 2.4.	Tipik bir polar gömülü (embedded) dolgu fazının hazırlanış şekli	21
Şekil 2.5.	Aminopropilsilikaya humik asidin bağlanmasını gösteren sentetik şema	24
Şekil 2.6.	İzokratik ve gradient elüsyon kullanarak EC-HA-APS dolgu fazı ile RPLC koşullarında nükleozit (a) ve nükleotitlerin (b) ayrılmasını gösteren kromatogram	24
Şekil 2.7.	a. Geleneksel C ₁₈ dolgu fazı, b. Polar gömülü (embedded) grup içeren dolgu fazı	26
Şekil 2.8.	Silika yüzeyine kimyasal olarak bağlı bazı polar dolgu fazlarının yapısı	28
Şekil 2.9.	Amid Türevi yeni Dolgu Fazlarının Yapısı ve Siklodekstrin Türevlerinin Ayrılmasındaki Etkinliği, Hareketli Faz: metanol/su:30/70 (v/v), akış hızı: 0.7mL/dk, dedektör: RI	30
Şekil 2.10.	Pneumocandin B ₀	31
Şekil 2.11.	Amino-silika türevi dolgu maddelerinin farklı yollardan sentezinin şematik gösterimi	31
Şekil 2.12.	Aminoasit türevi dolgu maddelerinin sentezi	32
Şekil 2.13.	HILIC ayırmalarında kullanılan polisüksinimit silika türevi dolgu fazları	32
Şekil 2.14.	Siklodekstrin ve şeker türevi bazı dolgu fazlarının yapısı	35
Şekil 2.15.	Silika tabanlı bazı birleşik modlu (mixed mod) HILIC/ iyon-değişim dolgu fazlarının yapısı	37
Şekil 2.16.	Bazı Zwitteriyonik HILIC dolgu fazlarının yapısı	39
Şekil 2.17.	Organik çözücü bakımından zengin bir çevrede polar dolgu maddesinin yüzeyinde adsorbe olan sulu tabakanın şematik gösterimi	41
Şekil 2.18.	MEDSA-EDMA kolon ile fenolik asitlerin alıkonmasında sıcaklığın etkisi	44
Şekil 2.19.	MEDSA-EDMA kolonda RP ve HILIC modda alıkonmaya hareketli fazda asetonyitril yüzdesinin ve analit polaritesinin etkisi	45
Şekil 3.1.	SP1’in sentez şeması. Reaktifler ve Koşullar; <i>i</i> : DCC, 0°C-oş, 24 saat; <i>ii</i> : TFA/AcOH (1:1, v:v), DCM; <i>iii</i> : toluen, riflaks, 4 gün	48
Şekil 3.2.	SP2’nin sentez şeması. Reaktifler ve Koşullar; <i>i</i> ; DCC, oda şartları, 24 saat <i>ii</i> ; TFA /AcOH (1:1, v:v), DCM, <i>iii</i> ; EtOH, riflaks, 2 gün, <i>iV</i> ; Küresel silika jel, Toluene, riflaks, 4 gün	49
Şekil 3.3.	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	54
Şekil 3.4.	Süstitüe Anilinler	54
Şekil 3.5.	Fenolik Asitler ve Flavanoidler	55
Şekil 3.6.	Nükleotit ve Nükleozitler	55
Şekil 3.7.	Sudan Boyaları	56

- Şekil 4.1.** Dolgu maddelerinin IR spektrumları. A: Serbest silica, B: CP-Si, C:SP1, D:SP2 60
- Şekil 4.2.** SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması. Gradient Elüsyon: % ACN / Fosfat Tamponu (pH: 6.85, 20 mM), 0-20 dk; % 10-25, 20-30 dk; % 25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230-270 nm. 63
- Şekil 4.3.** SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması. Gradient Elüsyon: % ACN / Fosfat Tamponu (pH: 2.5, 10 mM), 0-30 dk; %10-30. Akış hızı: 1mL/dk. Sıcaklık: 20 °C. Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230-278 nm. 63
- Şekil 4.4.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına pH'nın etkisi. Gradient elüsyon: % ACN/ Fosfat Tamponu (pH=6.41-7.03, 20 mM), 0-20 dk; %10-25, 20-30 dk; %25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13:BAP, dalga boyu: 230 nm. 65
- Şekil 4.5.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. A; gradient elüsyon: (pH= 4.6 amonyum asetat tamponu, 10 mM), 0-20 dk; % 10-25, B; gradient elüsyon: (pH= 3.25 fosfat tamponu, 10 mM), 0-20 dk; % 20-70. Akış hızı:1 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13:BAP, dalga boyu: 230 nm. 66
- Şekil 4.6.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Tampon Derişiminin Etkisi. Optimum şartlar (Şekil 4.2). Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230 nm. 67
- Şekil 4.7.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Asetonitril Derişiminin Etkisi. Gradient elüsyon: ACN/Fosfat Tamponu (pH: 6.85, 20 mM): 0-20 dk; % X-25, 20-30 dk; %25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 275 nm. 68
- Şekil 4.8.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Sıcaklığın Etkisi. A: 15⁰C, B: 20⁰C, C: 22⁰C, D: 25⁰C, Optimum şartlar (Şekil 4.2), dalga boyu: 230 nm. 69
- Şekil 4.9.** SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Akış Hızı Etkisi. Akış hızı: 0-13 dk; 1.2 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk- A: 0.7, B: 0.9, C: 1 mL/min. Optimum şartlar (Şekil 4.2), dalga boyu: 230 nm. 70

- Şekil 4.10.** Çeşitli HILIC Kolonlar ile Nükleotit ve Nükleozitlerin Ayrılması: (A) YMC-Pack NH₂, (B) TSKgel Amide-80, (C) ZIC-HILIC ve (D) HILIC silika kolon. Hareketli Faz: ACN/Tampon (10 mM Amonyum asetat) (85/15), sıcaklık: 30 °C, Akış hızı: 1.5 mL/dk, dalga boyu: 248 nm. (1) urasil, (2) adenozin, (3) üridin, (4) sitozin, (5) sitidin, (6) guanozin (Guo ve Gaiki 2005). 72
- Şekil 4.11.** SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleotitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 8.04, 10 mM fosfat tamponu): 80/20, akış hızı: 0.5 mL/dk, sıcaklık: 15 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 275 nm. 73
- Şekil 4.12.** SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleozitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 8.8, 10 mM borat tamponu): 92/8, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 20 °C, 5 µL, dalga boyu: 275 nm. 74
- Şekil 4.13.** SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleotitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 265 nm. 74
- Şekil 4.14.** SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleozitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. 75
- Şekil 4.15.** SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. İzokratik elüsyon: ACN/tampon (pH 3.25-4.03, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şarttaki gibidir. 75
- Şekil 4.16.** SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına Çözücü Oranı Etkisi. İzokratik elüsyon: % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM): 83/17, 80/20, 75/25, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şart ile aynıdır. 76
- Şekil 4.17.** SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına Tampon Derişiminin Etkisi. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM, 20 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şart ile aynıdır. 77
- Şekil 4.18.** SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına Sıcaklığın Etkisi. İzokratik elüsyon: % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: A: 10°C, B: 20°C, C: 30°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. 78
- Şekil 4.19.** SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Fenolik Bileşiklerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25, 10 mM): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm. 79
- Şekil 4.20.** SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Fenolik Bileşiklerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH 2.5, 10mM): 0-7 dk; %3, akış hızı: 0.7 mL/dk, 8-20 dk; %3-30, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 3µL, dalga boyu: 230 nm 80
- Şekil 4.21.** SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25 ve 4.61, 10 mM fosfat tamponu): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm. 81
- Şekil 4.22.** SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına Çözücü Türü Etkisi. % Organik çözücü/Tampon (pH 4.02, 10 mM asetat tamponu): Gradient elüsyon: 0-40 dk: % 10/ 90-% 40/ 60, Akış Hızı: 0.8 mL/ dk, 20 °C, Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, dalga Boyu: 280 nm 82

Şekil 4.23.	SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına Sıcaklık Etkisi. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25 fosfat tamponu): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: A: 40 °C, B: 30 °C, C: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm.	83
Şekil 4.24.	SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Süstitüe Anilinlerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM fosfat tamponu): 0-7 dk; % 30, 7-10 dk; % 30-45, 10-20 dk; % 45, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 10 °C, enjeksiyon hacmi: 10 µL, dalga boyu: 275 nm.	85
Şekil 4.25.	SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Süstitüe Anilinlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 4.6, 10mM): 5/95, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 10°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 275 nm.	86
Şekil 4.26.	SP1 Dolgu Maddesi ile Anilinlerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM fosfat tamponu): 0-7 dk; % 30, 7-10 dk; % 30-45, 10-20 dk; % 45, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 10 °C, enjeksiyon hacmi: 10 µL, dalga boyu: 275 nm.	86
Şekil 4.27.	SP1 Dolgu Maddesi ile 5'li Sudan Boyaları Karışımının Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 59/41, akış hızı: 0.9mL/dk, sıcaklık: 25°C, enjeksiyon hacmi: 3µL, dalga boyu: 230 nm.	87
Şekil 4.28.	SP1 Dolgu Maddesi ile 4'lü Sudan Boyaları Karışımının Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 62/38, Akış hızı:1 mL/min, Sıcaklık : 30 °C, Enjeksiyon hacmi : 5 µL, dalga boyu: 230 nm	89
Şekil 4.29.	SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Herbisitlerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH 5.63, 10 mM amonyum asetat tamponu): 0-10 dk; % 17, 10-15 dk; % 17-40, akış hızı: 1.2 mL/dk, sıcaklık: 30 °C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 230 nm.	90
Şekil 5.1.	SP1 Dolgu maddesinin yapısı	92
Şekil 5.2.	SP2 Dolgu maddesinin yapısı	92

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1.	Dolgu maddelerinin element analizi sonuçları	60
Tablo 4.2.	Sudan I-IV'ün HPLC ayırımı için literatüre genel bir bakış	88

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)
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskopisi)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
FTIR	: Fourier transform Infrared Spectroscopy (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
RI	: Refraktif İndis
DCC	: Dicyclohexylcarbodiimide (Disikloheksilkarbodiimid)
DCM	: Dichloromethane (Diklorometan)
TFA	: Trifluoroacetic acide (Trifloroasetik asit)
THF	: Tetrahidrofur
AcOH	: Acetic acide (Asetik asit)
CPTMS	: 3-Chloropropyltrimethoxysilane (3 Kloropropiltrimetoksilsilan)
GPTMS	: 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane
Boc	: tert-Butoxycarbonyl (<i>Tert</i> -Bütoksikarbonil)
SP	: Stationary phase (Dolgu Fazı)
IAA	: indolasetik asit
IPA	: indolpropiyonik asit
IBA	: İndolbutirik asit
NAA	: 1-naftalenasetik asit
BAP	: N-benzilaminopurin
Z	: Zeatin
K	: Kinetin
4-PA	: 4-klorofenoksiasetik asit
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	: 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit
2,4-DP	: 2,4-diklorofenoksi propionik asit
2,4-DB	: 2,4-diklorofenoksibutirikasit
ABA	: Absisik asit
GA	: Gallik Asit
PA	: Protokatesuik asit
Cat	: Katesin
CA	: Kaffeik asit
VA	: Vanilik asit
SA	: Syringik asit
m-CouA	: m-kumarik asit
p-CouA	: p-kumarik asit
o-CouA	: o-kumarik asit
RA	: Rosmarinik asit
Qua	: Quvarsetin
MeOH	: Metanol
EtOH	: Etanol
CAN	: Asetonitril
H	: Heksan

1. GİRİŞ

1970’li yıllarda ortaya çıkan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) etkili, hızlı ve yaygın olarak kullanılan bir teknik olup çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. HPLC kimya, gıda, ilaç analizi ve birçok benzer alanlarda en çok kullanılan analitik araçlardan biridir (Ye ve ark. 2009), (Zhang ve ark. 2010). HPLC ters faz, normal faz, iyon kromatografisi ve kiral kromatografi gibi birçok ayırma modlarına sahiptir. Dolgu fazları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)’nin gelişiminin ve uygulamasının temelidir. Bundan dolayı HPLC dolgu fazları üzerine araştırmalar kromatografik araştırmaların en aktif ve yaratıcı parçası olmuştur.

HPLC’de dolgu fazları üçe ayrılabilir. Bunlar polimerik, inorganik ve hibrid materyallerdir. Günümüzde, silika, hidroksiapatit, grafit ve metal oksit içeren inorganik materyaller araştırma ve uygulamalarda geniş çapta kullanılmaktadır. Bu materyaller arasında, silika oldukça ideal bir destek maddesidir. Şöyle ki, silika mekanik dayanıklılık, yüksek kimyasal ve termal kararlılık, yüzeyindeki silanol gruplarının, por yapısının ve yüzey alanının kontrol edilebilmesi bakımından oldukça avantajlıdır. Bundan dolayı silika en yaygın olarak kullanılan HPLC dolgu materyali olarak gelişmektedir (Qiu ve ark. 2011).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); en çok kullanılan analitik yöntemlerden biri olup, kromatografinin bir çeşididir. Kromatografik işlemler, sabit faz ve hareketli faz arasındaki kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. HPLC, bir karışımdaki bileşenleri ayırmak için hareketli sıvı fazdan yararlanır. Bu bileşenler (veya analitler) ilk önce bir çözücü içerisinde çözünür ve yüksek basınç altında kromatografik kolona doğru akışı sağlanır. Kolon içerisinde karışım bileşenlerine ayrılır. Kolon içerisindeki çözünme miktarı önemlidir ve çözünen madde ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki dolgu maddesi olarak tanımlanabilir. Çözünen madde ile sabit ve hareketli faz arasındaki etkileşim farklı sabit faz ve çözelti kullanılarak ayarlanabilir. HPLC birçok kimyasal karışımın kolay bir şekilde ayrılmasını sağlar. Sıvı bir hareketli fazın kullanıldığı kromatografik yöntemlerin (Sıvı kromatografisi) tarihçesi Rus botanikçi M. S. Twsett’in 1906 yılında yaptığı ve yayınladığı çalışmalarına kadar uzanır. Önceleri düz yüzlemsel yapıda sabit fazlar kullanılmış ve bu teknikler daha sonra kâğıt kromatografisi ve ince

tabaka kromatografisi olarak isimlendirilmiştir. Modern sıvı kolon kromatografisi ise 1969 yılında HPLC'nin kullanıma girmeye başlamasıyla gelişme göstermiştir.

1.1. HPLC Türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma işlemine göre yapılırsa, HPLC'yi 5 farklı türde inceleyebiliriz.

1.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC)

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), hareketli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklere oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

1.1.2. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC)

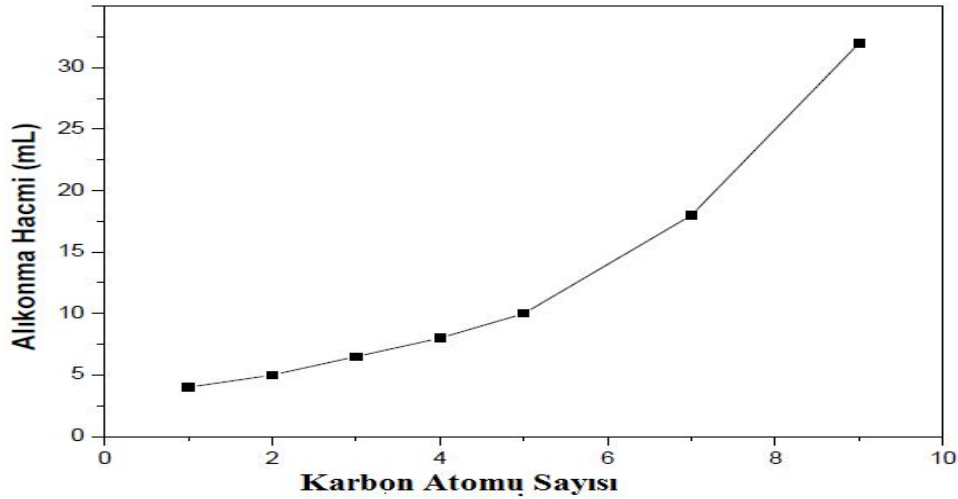
Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen tanecikler ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler molekül büyüklüklerine göre kolondan süzülür. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller taneciklerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntemde jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

1.1.3. İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC)

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şeklinde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Hareketli faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik kuvvet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır.

1.1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC)

Apolar sabit faz yüzeyinin ve metanol, su-asetonitril karışımı gibi polar hareketli faz türlerinin kullanıldığı sıvı kromatografik tekniği “Ters Faz Sıvı Kromatografisi” olarak adlandırılır. 1974’de RPLC kolonlarının ticari olarak piyasaya çıkması ile birlikte RPLC kolonları hızlı bir şekilde birçok analitin analizinde kullanılmış ve RPLC en yaygın kullanıma sahip HPLC türü olmuştur. RPLC modunda yapılan analizlerin tüm HPLC modlarında yapılan analizlerin dörtte üçünü oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bu başarı özellikle birçok organik maddenin ve bunlarla ilgili bileşenlerinin RPLC ile ayrılabilmesi ile açıklanabilmektedir. RPLC’de analitlerin alıkonma süresini sabit fazın türü, sabit fazın yüzey kimyası, sabit fazın analit ile etkileşim kuvveti, hareketli faz türü ve hareketli faz-analit arasındaki etkileşim kuvveti belirler. RPLC’de en polar olan analit sabit faz ile en az etkileşime girerek RPLC kolonunu en hızlı şekilde terk eder. Daha apolar olanlar ise sabit faz ile arasındaki etkileşim kuvvetine göre kolonu daha geç terk ederler. Şekil 1.1’de verilen örnekte birbirinin homoloğu olan alkilbenzen karışımındaki artan karbon atom sayısı ile alıkonma hacminin artışı belirgin şekilde görülebilir (Ünsal, E. 2006).



Şekil 1.1. Kolon: Hypersil-C18 (5 µm, 150x4.6 mm); Hareketli faz: Metanol/Su 60/40, Akış Hızı: 1 ml/dak., Analit: Alkilbenzen karışımı.

RPC’de yaygın olarak kullanılan hareketli faz türleri ve özellikleri şekil 1.2’de verilmiştir. RPC uygulamalarında kullanılacak hareketli faz türünün belirlenmesi sabit

1.GİRİŞ

faz türünün seçilmesi kadar önemlidir. Seçilen hareketli fazın analizi yapılacak örneği dedektörün tespit edebileceği derişime kadar çözebilmesi gerekmektedir. Gradient elüsyon gerektiğinde bu elüsyon türüne uygunluk diğer bir parametredir. RPLC’de farklı hareketli faz türlerinin farklı oranlarda karıştırılarak kullanılabilmesi uygulamalarda esneklik sağlamaktadır. RPLC uygulamalarında hareketli faz polaritesinin artması analitin alıkonma süresini arttırır.

Hareketli Faz	Molekül ağırlığı	Kaynama Noktası(⁰ C)	RI	UV(nm)	Viskozite
Asetonitril	41	82	1.341	195	0.358
Dioksan	88	101	1.421	215	1.26
Etanol	46	78	1.359	205	1.19
Metanol	32	65	1.326	205	0.584
İzopropanol	60	82	1.375	205	2.39
Tetrahidrofuran	72	66	1.404	215	2.20
Su	18	100	1.333	185	1.00

Şekil 1.2. RPC’de yaygın olarak kullanılan hareketli faz tür ve özellikleri.

Sabit faz olarak RPLC’de genellikle polimerik hidrokarbon yapıları ve yüzeyi kimyasal olarak uyarlanmış silika yapısı kullanılmaktadır. RPLC’de yaygın olarak kullanılan sabit faz türü C₁₈ olarak adlandırılan ve oktadesil türevleri ile uyarlanmış silika kolonlardır. Son yıllarda özellikle polimer teknolojisindeki gelişmeler RPLC sabit faz türünü oldukça arttırmıştır. Çeşitli monomer türleri ile istenilen koşullara uygun polimer matriksler üretilebilmektedir. C₁₈’in dışında C₈, C₄, C₁, -CN ve -NH₂ gruplarını taşıyacak silika tabanlı sabit faz türleri de yaygın kullanım alanları bulmaktadır. Sabit faz türlerinin gözenekliliği, gözenek boyutu, yüzey alanı ve tanecik yapısı ile boyutu oldukça önem taşımaktadır. Modern HPLC uygulamalarının tümünde rijit ve küçük tanecikler kromatografik performansı artırmaktadır. Bu bağlamda tanecik çapının 3 ile 10 µm boyutları arasında olması gerekmektedir. Ayrıca diğer önemli bir husus da yüzey alanıdır. RPLC’de kullanılan sabit fazlar 50 den 400 m²/g değerlerine çıkan yüzey alanlarına sahip olmalıdırlar. Gözeneklerin boyutu sabit faz türüne göre 70 - 300 Å

arasında değişebilir. RPLC’de sabit fazın polaritesinin azalması alıkonma süresinin artmasına neden olur. Yüzeyinde kimyasal uyarılma yapılan sabit faz türlerinde taşıdıkları ligandların bağlanma yoğunlukları ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) ve polariteleri alıkonma süresini etkileyen diğer önemli bir parametredir.

1.1.5. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC)

Hidrofilik etkileşim kromatografisi polar analitlerin tayinine yönelik olarak özellikle son on yılda geliştirilmiş yeni bir, yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemidir (Liu ve ark. 2008). Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemlerinden biri olan ters faz sıvı kromatografisi peptidlerin ayrılmasında kullanılan vazgeçilmez bir yöntemdir. Ters faz sıvı kromatografisinin bir avantajı, güçlü çözünürlük kapasitesinin yanında uçucu hareketli faz kullanılabilmesidir. Bu uçucu hareketli faz ile saf peptid kolayca vakum altında kurutma ile elde edilebilir. Fakat ters faz sıvı kromatografisinde ayırma yeteneği çok güçlü olsa da, polar moleküller için yeterli alıkonma sağlanamaz. Bu durumda polar analitlerin ayırımı için silika, alumina gibi sabit faz ve hekzan, kloroform gibi susuz hareketli faz içeren normal faz sıvı kromatografisi kullanılabilir. Normal faz sıvı kromatografisinde, peptid gibi hidrofilik bileşiklerin apolar çözeltiler içerisinde çözülmesi zordur ve bu yüzden normal faz sıvı kromatografisi biyolojik örneklerin uygulamasında az kullanılır. 1975 yılından beri polar sabit faz olarak, modifiye edilmemiş silika ve sulu hareketli faz, normal faz sıvı kromatografisinde karbonhidratlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu koşullarda hareketli faz çok az oranda su bileşeni içermekte ve bu da biyolojik örneklerin çözünürlüğü için avantaj sağlamaktadır. Bu kullanılan yöntem hidrofilik etkileşim kromatografisi denir.

HILIC yöntemi, ilk kez Dr. Andrew Alpert tarafından 1990 yılında (Alpert 1990) yayınında önerilmiş olup, hidrofilik maddelerin ayırımında kullanılan, normal faz sıvı kromatografisinin bir çeşididir (Arabacı, T. 2008). Hidrofilik etkileşim kromatografisinde, sabit faz, silika veya silikanın siyano, amino ve diol gibi gruplarla modifiye olduğu polar bir maddedir. Hareketli faz ise az miktarda su veya polar çözelti içeren yüksek organiklikte ve sabit faza göre daha az polaritededir (Ikegami ve ark. 2008). Az miktarda su veya polar çözelti içeren asetonitril, HILIC için kullanılan klasik bir hareketli fazdır. Aynı zamanda THF ve dioksan gibi su ile karışan çözücüler de

kullanılabilir. HILIC'ta yüksek oranda organik çözücü içeren hareketli faz kullanıldığı için kolon geri basıncı düşüktür ve bu da kolonun yüksek akış hızlarında çalışmasını kolaylaştırarak analiz süresini kısaltır.

HILIC'ta sabit fazın ve analitlerin polaritesinin artması, hareketli fazın polaritesinin azalması, analitlerin alıkonmasını arttırmaktadır. HILIC'ta önemli bazı parametreler vardır. Bunlar, hareketli faz kuvveti, hareketli faz pH'ı, sabit faz türü, akış hızı gibi parametrelerdir. HILIC için hareketli faz içerisindeki su oranı hacimce % 5-40 arasında olmalıdır yani sıklıkla kullanılan asetonitril oranı hacimce % 95-60'dır. Yöntemde, hareketli fazda bulunan polar analitlerin yine polar bir katı destek yüzeyi ile farklı derecede etkileşimi, analitlerin kolonu farklı sürelerde terk etmesine neden olmakta ve bu davranış kromatografik ayırımı sağlamaktadır. Hareketli faz, polar sabit faz yüzeyi üzerinde su bakımından zengin tabaka oluşturur. Analitler hareketli faz ile bu ıslak sabit faz yüzeyi arasında ayrılırlar. Daha polar bileşikler sabit sulu tabaka ile daha güçlü etkileşim gösterir. HILIC ayırımlarında mekanizma karışıktır. Mekanizmanın karışık olmasının yanında yöntem pratikte basittir. Aşağıda HILIC için bazı avantajlar özetlenmiştir:

1. Ters faz kromatografisi ile yeterince alıkonamayan yüksek polaritedeki analitleri alıkoyar.

2. Çözücülerin elüsyon sırası ters faz ayırmada olduğunun tam tersidir ve bu alternatif seçicilik kazandırır.

3. Yüksek organik bileşenli hareketli fazlardan dolayı yüksek akış hızları mümkündür. Yani HILIC, ters faz sıvı kromatografisine göre daha iyi alıkonmaya ve seçiciliğe sahiptir. Aynı zamanda normal faz sıvı kromatografisinde çözünemeyen polar analitlerin ayırımı için de kullanılmaktadır. (Mccalley 2007).

4. Bazik analitler için iyi pik keskinliği elde edilebilir (Mccalley 2010)

Bununla beraber, HILIC RP ile kıyaslandığında bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Ayırma mekanizması RPLC ile kıyaslandığında henüz daha az anlaşılmıştır. Bundan dolayı koşulların değişiminin ayırmaya etkisini tahmin etmek zordur.

2. Teknik RPLC modda olduğu gibi geniş uygulanabilirliğe sahip değildir. Nötral ve polar olmayan analitler genellikle çok az alıkonma gösterir. Ayrıca, iyonik haldeki asidik analitler (negatif yüklü iyonlar) silika tabanlı dolgu maddeleri üzerindeki negatif yüklü serbest silanol gruplarının itmesinden dolayı düşük alıkonma gösterir.
3. RPLC moduna göre daha yüksek oranda organik çözücü gerektiren hareketli faz kullanımını gerektirdiğinden daha az çevre dostudur.
4. Kolonların hareketli faz ile dengeye gelmesi uzun zaman alır ki bazan bu süre bir saat olabilir. Oysa RPLC modda kolonun dengeye gelmesi on beş dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşir (McCalley 2010).

HILIC yüksek polaritedeki maddelerin yani;

- Biyolojik aktif bileşikler
- Nükleotitler
- Suda çözünen vitaminler
- İlaç metabolitleri
- Nörotransmitterler
- Aminoasitler
- Peptidler
- Oligosakkaritler
- Ters faz sıvı kromatografisinde istenilen alıkonma sağlanamayan veya alıkonamayan bileşikler gibi bileşiklerin ayrılmasında kullanılır.

Literatürde bugüne değin yapılan çalışmalarda özellikle silika tabanlı kolon materyalleri tercih edilmiştir. Bu silika; amino, diol, sülfobetain türü gruplarla uyarlanmış olup polar gruplu sabit faz olarak kullanılabilir. Son yıllarda bu tür sabit fazların ayırma verimleri ayrıntılı olarak incelenmektedir. Yapılan bir çalışmada HILIC modunda, fosforilkolin tipi monomerin silika yüzeyine kovalent bağlanmasıyla elde edilen zwitteriyonik yapıdaki sabit faz, HILIC modunda peptid ayırımı için kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada peptidlerin alıkonmalarının pH 3-6 arasında arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu tip kolonun sadece silika kolonuna göre daha iyi alıkonmaya sahip olduğu görülmüştür (Ünsal, E. 2006).

1.1.6. HPLC Kullanım Alanları

Günümüzde HPLC, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

1.1.6.1. Bileşen Ayırma

HPLC’de bileşen ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve hareketli faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve hareketli faz seçimine bağlıdır.

1.1.6.2. Saflaştırma

Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir. Bu ise ancak doğru bir hareketli faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresi herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.

1.1.6.3. Tanımlama

Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin HPLC ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullar da ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri hareketli faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir. Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metod kullanılmalıdır.

1.1.6.4. Derişim Tayini

HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik derişimlerde HPLC’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen derişimler bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur. HPLC’de kullanılan hareketli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

1.1.6.5. İzokratik Elüsyon

Kolona sabit bileşimdeki hareketli faz pompalanır. Hareketli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin moleköl büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.

1.1.6.6. Gradient Elüsyonu

Hareketli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin tanecik yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır.

1.1.7. HPLC Sistemleri

Standart HPLC donanımı temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimleri bileşenlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Örnek hareketli faz ile kolona pompalanır ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Ayrılan bileşenlerin sinyallerini dedektör kaydeder. Kromatografik analiz sonucunda elde edilen ve bilgisayara aktarılan sinyallere kromatogram adı verilir.

1.1.7.1. Hareketli Faz

Örnek bileşenlerini, kolon boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. HPLC sisteminde kullanılacak sürekli fazın seçiminde,

- Yüksek derecede saflık
- Dedektör ile uyumluluk
- Düşük viskozite
- Örneği çözebilme
- Kimyasal açıdan inert olması
- Uygun fiyat

gibi özelliklere dikkat edilmelidir.

1.1.7.2. Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki taneciklerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır (Chromatography, 1995; SGE Chromatography Products, 2001):

- 3-10 µm tanecik boyutu
- Olabildiğince eş boyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek tanecik boy

dağılımı

- 70-300 Å gözenek boyutu
- 50-250 m²/g yüzey alanı
- Yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C₈, C₁₈, fenil) hatta anyon (NH₄⁺) ya da kation (-COO⁻) değiştirici ve zwitteriyonik yapıda olabilir.

1.1.7.3. Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen taneciklerin kolona doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve hareketli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan taneciğin boyutu küçüldükçe yüksek basınçlı pompalar gerekse de; küçük tanecikler yüksek örnek yükleme kapasitesi, hızlı analiz ve yüksek çözünürlüğe sahiptir. Pompa seçiminde akış hızında

kararlılık önemlidir. Modern HPLC donanım pompaları bilgi işlemci kontrollü olup, çok çeşitli firmalar tarafından değişik modellerde üretilmektedir.

Modern pompalar aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- 0.01-10 mL/dak. arasında akış hızı.
- % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı
- 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değeri

1.1.7.4. Kolon

Modern HPLC donanımının temel yapı taşlarından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu parçadır. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Tipik HPLC kolonları; mikron boyutlu tanecik içerirler (1-10 μm) ve yüksek basınca (400 atm) dayanıklı çelik kolonlardır. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-10 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 2-30 cm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla hareketli faz harcanmaktadır.

1.1.7.5. Dedektör

Günümüzde kromatografik yöntemlerde optik dedektörler sıklıkla kullanılmaktadır. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorbans, floresans emisyon ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorbans dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190-600 nm aralığında analiz mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometresi (massspectrometric, MS) dedektörleri bulunmaktadır. RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI'ya göre daha hassas ancak daha seçici dedektörlerdir. MS

dedektörleri ise çok duyarlı, ancak pahalı sistemlerdir. İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır (Arabacı, T. 2008):

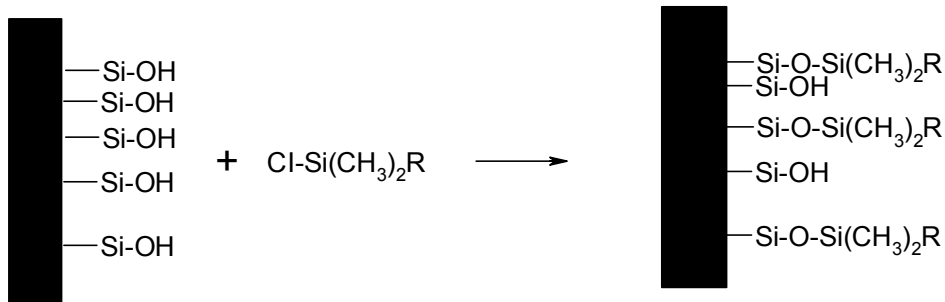
- Yüksek duyarlılık
- Hızlı tepki
- Düşük sinyal gürültüsü
- Minimum pik yayılması
- Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı
- Çalışma kolaylığı ve genişliği

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. HPLC’de Kullanılan Dolgu Maddeleri

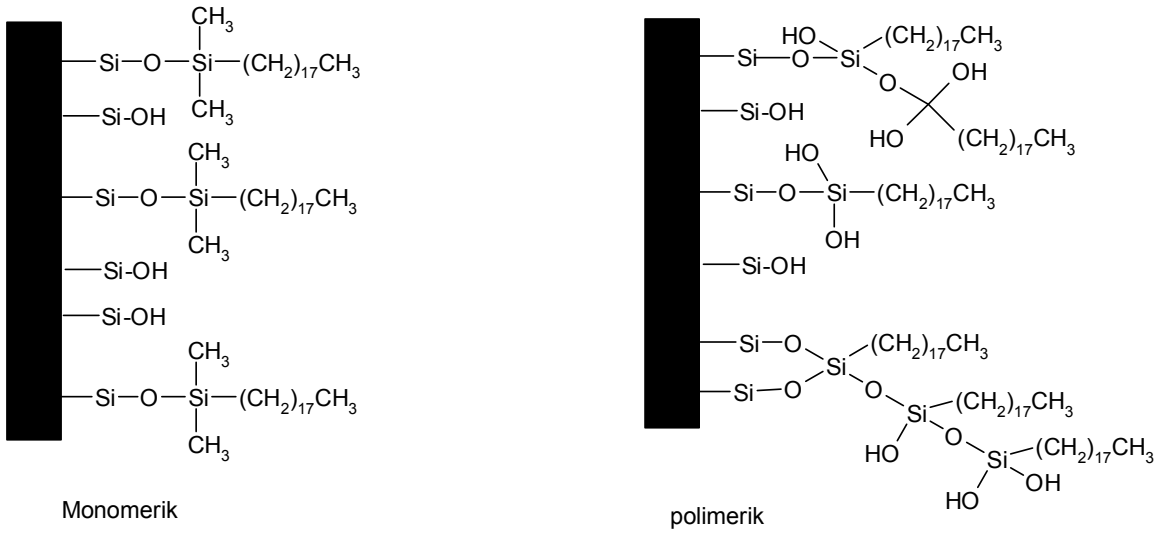
Ters-Faz sıvı kromatografisinde, ayırma işleminde dolgu maddesi önemli bir rol oynar. HPLC ilk geliştirildiğinde, dolgu maddesi viskoz bir sıvı ile kaplı inert desteklerden oluşmaktaydı (Dorsey ve ark. 1994). Ancak böyle bir dolgu maddesi üzerinden sürekli geçen bir hareketli faz varlığında dolgu maddesinin kaplı olduğu viskoz sıvıyı korumanın olanaksız olması dolgu maddelerinin yetersiz ve sınırlı olduğunun kanıtıydı. Bir ligandın silil eter (-Si-O-Si-) bağları üzerinden katı bir desteğe kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilen dolgu maddelerinin gelişmesi bu problemi gidermiş ve modern sıvı kromatografisinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Çeşitli fonksiyonel gruplara sahip dolgu maddeleri ticari olarak mevcuttur. Bununla beraber, katı desteğin ligand ile bağlanma şekli kromatografik ayırma işlemini etkileyebildiğinden kolon geliştiren birçok firma kendi silikasını geliştirmektedir (Dorsey ve ark. 1994).

Sentez reaksiyonu üreticiler arasında değişse de, genel reaksiyon uygun bir ligandın silika destek maddesi üzerindeki silanol (Si-OH) ya da siloksanlara (Si-O-Si) kimyasal olarak bağlanmasını içerir. Genel olarak siloksanların düşük aktiviteye sahip oldukları kabul edilir bundan dolayı, bağlanma işleminde sonuç göstermezler. Silanoller böylece bağlanma fazı için birincil bağlantı noktası olarak görev yapar. Şekil 2.1. tipik bir bağlanma işleminin şemasını göstermektedir (Sander ve Wise 1987). Silika yüzeyinde ligandın bağlandığı noktalar reaktif silanollerle sınırlıdır. Bununla beraber, reaksiyonun tamamlanmaması ve sterik engel reaksiyona girebilecek mevcut bölgenin yarısından daha azının bağlanmasına neden olur (Sandoval 1999).



Şekil 2.1. Bağlanma Reaksiyonunun Şeması

En yaygın olarak kullanılan dolgu fazı hazırlama yöntemi bir monofonksiyonel organosilan reaktifi ile silanol grubunun reaksiyonunu içerir. Bu organosilan reaktifi tipik olarak ayrılan grup olarak ya bir kloro ya da alkoksi fonksiyonel grubunu içerir. Monofonksiyonel organosilanlar kullanılarak yapılan dolgu fazları organosilan reaktifi ile silika arasındaki tek noktalı bağlantıdan dolayı monomerik dolgu fazları olarak adlandırılırlar (Rimmer ve ark. 2003). Eğer iki ya da üç fonksiyonel organosilan reaktifi kullanılırsa daha karmaşık bir bağlanma fazı oluşur. Silan monomerik dolgu fazına benzer şekilde tek bir tabakada bağlanabilir. Daha yaygın düşünce, organosilan hidrolizi ile ekstradan fonksiyonel bölge oluşmakta ve bu da daha fazla ligandın bu bölgeye atak yapmasını sağlamaktadır. Böylece silika yüzeyinden dışarı uzayabilen polimerik bir yapıya neden olmaktadır. Bu polimerik yapı silika ile reaksiyona girmeden yapılabileceği gibi silika yüzeyinde de yapılabilir (Rimmer ve ark. 2003), (Kirkland 2004) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Monomerik ve Polimerik Dolgu Fazları

Monomerik dolgu fazı reaksiyonu daha iyi kontrol edilebildiğinden silika üzerinde tek bir yerde reaksiyon gerçekleşir. Bu da dolgu fazının tekrar sentezlenebilir olmasına olanak sağlar (Cooke ve Olsen 1980), (Sander ve Wise 1987). Bununla beraber, monomerik dolgu fazlarında maksimum yüzey alanı 4-4.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ iken polimerik dolgu fazlarında 6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 'dir (Rimmer ve ark. 2003). Ancak bu yüksek yüzey alanı silika yüzeyi ile örnek analitin etkileşimine neden olur. Ayrıca, farklı pH değerlerinde silikayı hidrolizden korur. Çalışmalar polimerik dolgu fazlarının

monomerik dolgu fazları ile kıyaslandığında düşük ve yüksek pH değerlerinde daha kararlı olduğunu göstermiştir. Ancak, polimerizasyon işleminin kontrol edilebilme zorluğundan dolayı polimerik dolgu fazının sık sık yeniden sentezlenmesi zordur (Kirkland 2004).

İdeal olarak, dolgu fazı çeşitli karakteristik özelliklere sahip olmalıdır. Birincisi, destek materyali homojen bir yüzeye sahip olmasının yanı sıra kimyasal modifikasyonlara karşı cevap verebilmelidir. Ayrıca kimyasal ve termal olarak kararlı olmalı ve pH değişimine karşı uzun süre kararlılık göstermelidir. Bunlara ek olarak HPLC’de yüksek basınç değerine direnmek için yüksek mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Ticari olarak uygulanabilir olması için, üretim prosedürü son derece yinelenebilir olmalıdır. En önemlisi de, dolgu fazları ayırma için gerekli selektiviteyi, tutunmayı ve geniş bir analit sınıfına uygulanabilirliği sağlamalıdır (Nawrocki ve ark. 2004).

2.1.1. Silika Jel

Ticari olarak mevcut kolonların büyük bir kısmı silika jel tabanlıdır. Silikayı diğer dolgu fazlarından üstün kılan bazı avantajları vardır. Birincisi, Silikanın kimyası iyi bilinmektedir ve fabrikasyon koşulları kolaylıkla kontrol altına alınabildiğinden istenilen ürünü elde etmek mümkündür. Silika jeller dar gözenek çapı dağılımlı, çok gözenekli ve yüzey alanlı ve düşük miktarda metal içeriği barındırabilirler. Silika ayrıca HPLC koşulları altında görülen basınçtan kaynaklı mekanik etki için ihtiyaç duyulan dayanıklılığa sahiptir. İlaveten, bu gözenekli parçalar çok büyük yüzey alanlarına sahiptir ki bu sayede örnek analitlerin alıkonması çok iyidir (Kirkland ve ark. 2002).

Mevcut silika jel tabanlı dolgu fazları geleneksel olarak düz bir alkil zinciri içeren ligand ile modifiye olmuştur. Birçok sıvı kromatografisi analizleri oktadesilsiloksan (ODS) olarak bilinen C₁₈ dolgu fazlı kolon ile yapılır. Bunun yanı sıra karbon sayısı birden otuza kadar değişen dolgu fazları da mevcuttur. Son zamanlarda, alkil zincirinin iç kısmında polar bir grup içeren dolgu fazları popüler olmuştur. Bu tür dolgu fazları polar gömülü (embedded) dolgu fazları olarak adlandırılırlar. Temel polar gömülü gruplar amidler, karbamatlar ya da eterlerdir. Bu polar gruplar silika yüzeyine yakın bir noktada bulunurlar. Devamında ise dolgu fazının hidrofobik doğası için gerekli karbon sayısı sekizden on sekize kadar değişen alkil grupları vardır.

Ligandın birinci bağlanma reaksiyonuna ilaveten trimetilklorosilan gibi kısa zincirli alkil silanlar kullanılarak geriye kalan silanollerin bloke edilmesi işlemine **end-capping** denir. Bu şekilde hem dolgu fazının kararlılığı hem de pik keskinliği artar (Kirkland ve ark. 1997), (Kirkland ve ark. 1998), (Pesek ve ark. 2002). Benzer şekilde, dolgu fazının kararlılığını artırmak için sterik engelli hacimli bağlanma fazları kullanılabilir. Bu dolgu fazları dolgu fazını hidrolizden koruyan hacimli yan gruplara sahip monofonksiyonel alkilsilan içerir.

Çift dişli dolgu fazları özellikle daha yüksek pH değerlerinde üstün kararlılığa sahiptir. Bunlar monomerik dolgu fazlarına benzer, fakat bu dolgu fazları ek bir ara linke sahiptir ve bu ara link genellikle propilen grubudur (Kirkland ve ark. 1989,1998). Polimer içeren dolgu fazları ideal olarak kimyasal kararlılığı artırır. Kobayashi ve çalışma arkadaşları (1998) bu kolonların yüksek oranda karbon içerdiğini ve bunun da pik keskinliğini ve bazik hareketli fazlarda kararlılığı artırdığını bulmuştur.

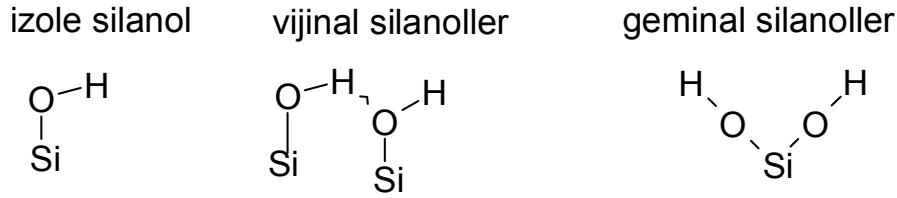
Son zamanlarda özel amaçlı dolgu fazları popüler olmakta ve spesifik uygulamalar için kullanılmaktadır. Örneğin, kiral dolgu fazları enantiyomerik ayırmalarda önemlidir. Tipik kiral dolgu fazları polisakkarit, protein, taç eter ve siklodekstrin içerir (Zhou ve ark. 2009). Fenil halkası içeren dolgu fazları de polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAHs) karşı aromatik selektivite göstermeye meyillidir (Kayillo ve ark. 2006), (Euerby ve ark. 2007). Geleneksel alkil zincirli ligandlarla kıyaslandığında, siyano grubu bağlı dolgu fazları daha az hidrofobik özelliktedir (Merchand ve ark. 2005). Flor bağlı dolgu fazlarının özellikle halojenli analitlerin ayrılmasında popülerliği artmaktadır. Bu kolonlar C₁₈ kolonlarla kıyaslandığında daha uzun alıkonma süresi ve daha yüksek bir selektivite gösterir. İlaveten, bu dolgu fazları süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), micellar elektrokinetik sıvı kromatografisi (MEKC) ve iyon kromatografisi gibi diğer ayırma modlarında da uygunluk gösterir (Zhang 2008).

2.1.1.1. Silanoller

Destek maddesi üzerinde reaksiyon yapabilmek için onun üzerinde kimyasal olarak reaktif bölgelere sahip olması gerekir. Birçok destek maddesi özellikle de silika üzerinde reaktif bölge olarak hidroksil grupları içerir. Dolgu fazının silika tabanlı olması durumunda fonksiyonel gruplar silanoller olarak adlandırılır. Silika iyi karakterize

edilebildiği için, burada silika tabanlı destek maddelerinden bahsedilecektir. Daha önce bahsedildiği gibi, silika yüzeyi siloksan bağları içerir. Bazı çalışmalar yüksek oranda sulu hareketli fazda yalın haldeki silika jel kullanılarak polar olmayan analitlerin yalın haldeki silika üzerinde alıkonduğunu göstermiştir (Bidlingmeyer ve ark. 1982), (Cox ve ark. 1987), (Cox 1993). Siloksan ile analitin etkileşmesi alıkonmanın kaynağı olabilir, ancak yüksek oranda sulu hareketli faz kullanılması alıkonmada temel etki değildir.

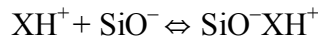
Şekil 2.3.'te gösterildiği gibi, silanoller silika yüzeyinde izole, geminal ve vicinal silanol olarak üç farklı formda bulunur (Sunseri ve ark. 2003).



Şekil 2.3. Silika Yüzeyindeki Silanollerin Bulunma Şekli

İnfrared spektroskopisi (IR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi fiziksel metodlar ile silanollerin hangi formda buldukları tartışılabilir. IR ile izole ve vicinal silanoller arasındaki fark görülebilirken NMR ile izole ve geminal silanoller ayırt edilebilir (Berthod 1991), (Nawrocki 1997).

Silika yüzeyinde reaksiyon yapıldıktan sonra geriye kalan silanollerin özellikle bazik analitlerin ayrılmasında asimetrik pike neden olduğuna inanılmaktadır. Silanollerin asidik doğası aşağıda gösterildiği gibi bazik bileşiklerle reaksiyonundan kaynaklanır.



Dolgu fazı üzerinde serbest silanol gruplarının varlığının ve etkisinin olduğunu çeşitli çalışmalar kanıtlamıştır (Wirth ve ark. 1999). Neue ve çalışma arkadaşları (2001) silanol gruplarının aktifliği ve asitliğinin bir işareti olarak hareketli faz pH'sındaki değişimle lityum iyonlarının alıkonmasındaki değişimi incelemiştir. İki farklı silanol grubu içeren kolonlardan (Resolve C₁₈ ve Symmetry kolonlar) silanol grubu içermeyen

kolonlara (Symmetry C₁₈, XTerra ve XTerra MS C₁₈) kadar çeşitli ticari kolonlar incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Asidik koşullar altındaki bir kolon ile anyon değişimi bile gözlenmiştir (Méndez ve ark. 2003). Yapılan son çalışmalar silikanın yüzey heterojenitesinin farklı bağlanma enerjisine sahip çoklu aktif bölgelerden kaynaklandığını kanıtlamıştır. Bunun ise gözlenen pik tailinginin silikanın farklı enerjiye sahip bölgeleri ile analit arasındaki etkileşiminden kaynaklandığı sanılmaktadır (Gritti ve ark. 2005).

Silanol aktivitesine ek olarak, analitin sabit faz üzerindeki yavaş hareketinin de pik kuyruklanmasına (pik tailingine) neden olduğu tartışılmaktadır. Eğer bu doğru olsaydı yeterince yüksek bir sıcaklıkta, kütle transfer hız katsayısı pik keskinliğindeki bu etkiyi minimuma indirebilecek kadar artardı (Gotmar ve ark. 1999). Bu yaklaşıma sahip bir çalışma, dikkati dolgu fazının ve analitin termal kararlılığını sağlamaya çekmelidir. Ancak, McCalley (2000) sıcaklık 20°C'den 60 °C'ye yükseltildiğinde pik simetrisinin arttığını gözlemlemiştir. Bunun yanında, bu gelişme sadece pH 7.0'de görülmüştür. pH 3.0'da pik keskinliğinde önemli değişim görülmemiştir. Daha sonraki bir çalışmada, Buckenmaier ve çalışma arkadaşları (2004) sıcaklığı arttırarak yapılan bir analizde pik keskinliğindeki gelişmelerin analitlerin hareketindeki değişikliklerden değil bazik analitlerin pKa değerinden kaynaklandığını önermiştir. Sıcaklık arttığında, analitin pKa değeri düşer. Böylece, sabit bir pH'da sıcaklığı arttırmak bazik molekülün daha düşük bir miktarının protonlanmasına neden olur. Bu da analit ile silanoller arasındaki etkileşimi azaltır.

Gritti ve Guiochon (2005) dolgu fazının heterojenitesi ve bunun pik kuyruklanmasına etkisi üzerine kapsamlı bir araştırma yapmıştır. Denge izoterm modelleri ve afinite enerji dağılım hesaplamaları pik kuyruklanmasına neden olan farklı enerji bölgelerinin varlığını kanıtlamıştır.

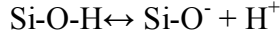
Daha sonraki çalışmalarında Gritti ve Guiochon (2005) end-capped ve end-capped amid-gömülü ters faz kolonlar ile geleneksel end-capped olmayan C₁₈ kolonların adsorpsiyon izotermi kıyaslamıştır. Bazik olmayan bileşikler için adsorpsiyon davranışında küçük farklılık görülebileceği bulunmuştur. Bununla beraber, genel olarak, end-capped olmayan kolonlar daha büyük yüzey heterojenitesi göstermiştir. İlaveten, organik modifier tercihi yüzey heterojenitesini etkiler. Asetonitril-metanol karışımı gibi güçlü bir organik modifier kullanarak koruyucu bir organik tabaka oluşturulur, böylece

analit yüksek enerjili bölgelerden korunur. End-capped bir amid-gömülü kolon ile geleneksel end-capped C₁₈ kolon kıyaslandığında her iki kolon da benzer analitler için benzer adsorpsiyon davranışları göstermiştir. Fakat diğer analitler polar-gömülü grupların olduğu kolonlara yanıt vermiş ve ek bir yüksek enerjili bölge göstermiştir (Gritti ve Guiochon 2006).

2.1.1.2. Silanol Aktivitesini Azaltma Metodları

Silanollerin ayırmadaki negatif etkisi analit ile etkileşimini minimuma indirebilecek birçok tekniğin gelişmesine neden olmuştur. Yeni dolgu fazları ve imalat tekniklerinin gelişimi bunların miktarını azaltmaya çalışmaktadır. Kromatograficilere göre hareketli faz koşulları bunların olumsuz etkilerini azaltmak için optimize edilebilir.

Silanollerin asidik doğası ayrışma reaksiyonuyla gösterilir:



20 °C’de, izole olmuş bir silanolün pKa’sı yaklaşık 6.8±0.5 ‘dir (Berthod 1991). Böylece, uygun bir hareketli faz seçilerek iyonik etkileşim azaltılabilir. Bir yaklaşım silanolün pKa değerinin ortamın pH değerinden daha büyük olduğu bir pH değerinde analiz yapmak ve böylece silanolün protonlanmış formda kalmasını sağlamaya yöneliktir. Benzer şekilde, yüksek pH’da yani bazik analitin pKa değerinin ortamın pH değerinden daha küçük olduğu pH değerinde analiz yapmak analitin iyonlaşmasını engelleyecektir (Kirkland ve ark. 1997), (Kirkland ve ark. 1998). Uç pH değerlerinde analiz yapabilmek silika destek maddesi ya da bağlanma fazının kararlılığına bağlıdır. Çalışmalar düşük pH’da bağlanma fazının silika destek maddesinden kopabileceğini ve bu kopmanın ligandın türüne, bağlanmanın yoğunluğuna ve end-capping şekline göre değişebileceğini göstermiştir (Trammell ve ark. 2004). Aksine, pH’nın dokuzun üzerinde olması durumunda, silika destek maddesinin bozulması problem teşkil eder (Kirkland ve ark. 1995). Orta pH’larda, bazik bileşiklerin sıcaklığın yükselmesiyle pik keskinliklerinin arttığı görülmüştür (Buckenmaier ve ark. 2004). İyon kuvveti artırılarak, analit derişimleri değiştirilerek hareketli fazın silanol aktivitesini azaltmadaki katkısı ayrıca çalışılmıştır. Silanol etkileşimini ortadan kaldırmak için bir hareketli faz modifierinin kullanımı ilk kez Nahum ve Horvath (1981) tarafından

önerilmiştir. Amonyum tuzları ve trietilamin (TEA) ve dimetiloktilamin (DMOA) gibi aminler en çok kullanılan modifierlerdir ve nötral ve asidik pH'da bazı analitlerle etkileşebildikleri kanıtlanmıştır (Vervoort ve ark. 1992). Tamponların kullanımı sadece pH'nın kontrolüne değil ayrıca kullanılan tamponun türü özellikle katyonun (Na^+ , K^+ gibi) iyon çifti etkileşimleri üzerinden bir silanol giderici olarak işlev görebilmesine izin verir (Papp ve Vigh 1983). Silanolle daha güçlü bir şekilde etkileşen çift yüklü katyonların kullanımı silanol aktivitesini azaltmada etkili olmuştur. Reta ve Carr (1999) baryumun modifier olarak TEA ile kıyaslanabilir ölçüde pik simetrisi ve alıkonma gösterdiğini ve modifier olarak kullanılabilirliğini kanıtlamıştır. Ayrıca, hareketli fazın iyon kuvvetinin artmasıyla pik simetrisinin arttığı görülmüştür. Bununla beraber, Gritti ve Guiochon (2004) propanololün adsorpsiyon izotermini ve analizini kullanarak silanollerin asimetric piklere neden olan adsorpsiyon bölgeleri için sadece sorumlu olmadığına karar vermiştir. İlâveten, derişimle birlikte iyon kuvvetini artırmak için kullanılan tuzların (NaCl , KCl , CaCl_2 vs) seçimi pik keskinliğinde önemli rol oynar (Gritti ve Guiochon 2004 a, b). Analit derişimi de silanollerin etkisini minimuma indirmede etkilidir.

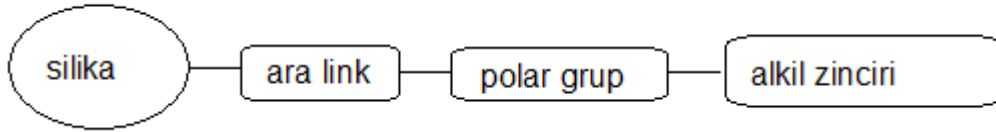
Bu yöntemlere ek olarak, pH'nın düzenli artışı ya da mevcut silanol miktarının azaltılması yoluyla peak kuyruklanmasını kendi başına azaltmaya yardım eden dolgu fazları tasarlanmaktadır. Kirkland ve çalışma arkadaşları (1997) end-capping tipi kolonların orta ve yüksek pH'larda dolgu fazının bozunmasının azaldığını kanıtlamıştır. Bir metotda silanoller ligandla reaksiyona girmeden önce metil grupları ile yer değiştirmiştir. Bu da silanol kalıntılarının yaklaşık %50'den %33'e kadar azalmasına olanak sağlamıştır (Unger ve ark. 1976). Polietilen ve polistren gibi polimerler silika yüzeyini kaplayarak daha düşük pH'larda bile silika destek maddesinin dayanıklılığını artırmak için kullanılır (Kobayashi ve ark. 1998).

2.1.2. Polar Dolgu Maddeleri

2.1.2.1. Polar Gömülü (Embedded) Ters-Faz Dolgu Maddeleri

Geleneksel C_{18} ve C_8 dolgu fazları ters-faz ayırmaları için geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bununla beraber, bu dolgu fazlarının yüksek oranda sulu hareketli fazda ıslanamama (McCalley 1999), (Layne 2002) ve bazik analitler için zayıf pik keskinliği gösterme gibi bazı dezavantajları vardır (O'Gara ve ark. 1995). Son on yılda,

araştırmacılar bu tarz zorlukların üstesinden gelebilecek bir seri polar-gömülü dolgu fazları geliştirmiştir (Engelhardt ve Mathes 1977), (Engelhardt ve Mathes 1979), (Engelhardt ve ark. 1981), (Sandi ve Szepesy 1998), (Neue ve ark.1999), (Neue ve ark. 2001). Bu fazlar silika yüzeyine yakın bir yerde bulunan hidrofilik polar bir grubun temel olarak hidrofobik bir alkil zincirine bağlanmasından meydana gelir. Tipik bir polar gömülü fazının şematik gösterimi şekil 2.4'te görülmektedir (Euerby ve Petersson 2005).



Polar grup = amid, karbamat, üre, sülfonamid, alkil ya da fenil eter
 Ara link = Propil ligand
 Alkil zinciri = Genellikle C8'den C18'e kadar

Şekil 2.4. Tipik bir polar gömülü (embedded) dolgu fazının hazırlanış şekli

Temel olarak kullanılan polar gruplar amid, üre, eter, karbamat ve sülfonamid fonksiyonel gruplarıdır. Genel olarak, geleneksel C₁₈ kolonlarla kıyaslandığında polar-gömülü fazların avantajları polar-gömülü fonksiyonel grubunun bazik analitlerin yerine silika yüzeyindeki silanollerle hidrojen bağı yapması sonucu (Engelhardt ve Mathes 1977), (Engelhardt ve Mathes 1979), (Engelhardt ve ark. 1981), (O'Gara ve ark. 1995), (McCalley 1999), (Layne 2002), bazik analitler için iyi bir pik keskinliği göstermesi (O'Gara ve ark. 1995), yüksek oranda sulu hareketli faz kullanılabilmesi (Engelhardt ve Mathes 1979), (Engelhardt ve ark. 1981), (Neue ve ark. 2001) ve bu sayede % 100 sulu hareketli faz kullanarak çok polar analitlerin ters-faz modda analizine teşvik etmesi (Euerby ve Petersson 2004), bazik, asidik ve nötral analitlere karşı (O'Gara ve ark. 1995), (Sandi ve Szepesy 1998 a, b, c), (McCalley 1999), (Neue ve ark. 1999), (Layne 2002), eşsiz bir selektivite göstermesi (Engelhardt ve ark. 1981) (bu selektivite dolgu fazı ve analitler arasındaki elektrostatik etkileşimler sonucu asit ve bazların pozitif itmelerinden kaynaklanır) (Euerby ve Petersson 2005), hidrojen bağı yapabilme kapasitelerinin olması (Wilson ve ark. 2004), içerdiği polar grup sayesinde hidrofobik

karakterinin azalması (O'Gara ve ark. 1995), (McCalley 1999), (Layne 2002), şeklinde sıralanabilir. Bununla beraber, polar-gömülü bir kolonun hidrolitik kararlılığı C₁₈ kolonlardan daha düşüktür (Sandi ve Szepesy 1998), (Wilson ve ark. 2004), (Ruderisch ve ark. 2005). Bundan dolayı, daha kısa kolon ömrü gösterirler. Başka bir deyişle, silika tabanlı diğer ters-faz kolonlar gibi polar-gömülü kolonlar da silikanın bozunmasından dolayı bazik şartlar altında aynı sınırlamadan sıkıntı çeker (Liu ve ark. 2006).

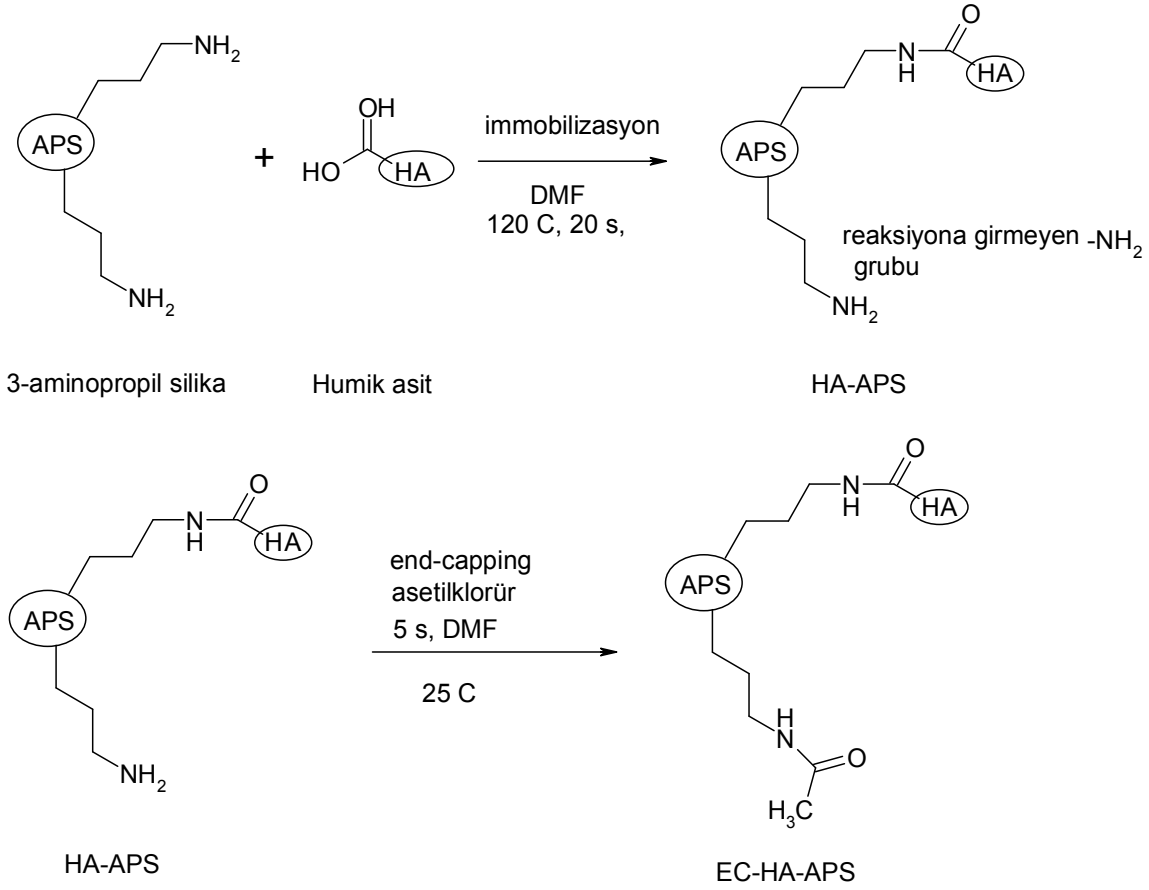
Silika tabanlı ters-faz dolgu fazları pH 2 ile 8 arasında güvenli bir şekilde kullanılabilirler de pH 8'den sonra silika hidroliz olduğundan kullanımlarında ciddi sınırlamalar vardır. Silikanın kimyasal kararlılığını artırmak için Neue ve çalışma arkadaşları (2001) çeşitli silil ligandlarla modifiye olmuş gözenekli inorganik/organik hibrit silika substratları geliştirmiştir (Wyndham ve ark. 2003). Bu dolgu fazları bazik analitler ile oldukça iyi bir pik keskinliği ve bazik koşullara karşı yüksek oranda dayanıklılık göstermiştir. Bununla beraber, düşük pH değerindeki kararlılıklarının geleneksel C₁₈, sterik engelli korunmuş C₁₈ ve bidentat C₁₈ fazlarından daha düşük olduğu bulunmuştur (Kirkland 2004). Bidentat C₁₈ dolgu fazlarının hem düşük ve hem de yüksek pH değerine sahip hareketli fazlarda iyi bir hidrolitik kararlılık sergilediği bulunmuştur (Kirkland ve ark.1998).

Literatürde silika tabanlı ters-faz kolonların kimyasal kararlılığını artırmak için geliştirilen çeşitli dolgu fazları mevcuttur. Bunların tipik örnekleri polimerik bağlı (Sangliano ve ark. 1998), bidentat (Kirkland ve ark. 1998), sterik engelli hacimli grup bağlı (Kirkland ve ark. 1989) ve hibrit inorganik-organik dolgu fazları (Wyndham ve ark. 2003) şeklinde gösterilebilir. Düşük pH'da dolgu fazının bozulması solvoliz ve siloksan bağının kopmasıyla silika yüzeyinden organik ligandın ayrılmasından kaynaklanır. Polimerik bağlı dolgu fazları düşük ve yüksek pH'larda geleneksel monofonksiyonel fazlı kolonlardan daha kararlı olsa da bunların sentezlenmesi daha zordur. Yatay polimerizasyonun hem düşük hem de yüksek pH'larda üstün hidrolitik kararlılığa sahip monomerik bir bağlanma fazı oluşturduğu belirlenmiştir (Wirth ve Fatunmbi 1993). Bununla beraber, bu kolonların hazırlanmasına yönelik literatürde herhangi bir bilgi bulunamamıştır. Kirkland ve çalışma arkadaşları (1989), (1995), (1998), geleneksel metil yan gruplarının yerine hacimli yan gruplar kullanarak sterik engelli korunmuş dolgu fazları geliştirmiştir. Meydana gelen dolgu fazları asidik koşullara karşı oldukça fazla hidrolitik kararlılık göstermiştir. Bunun yanında, aynı

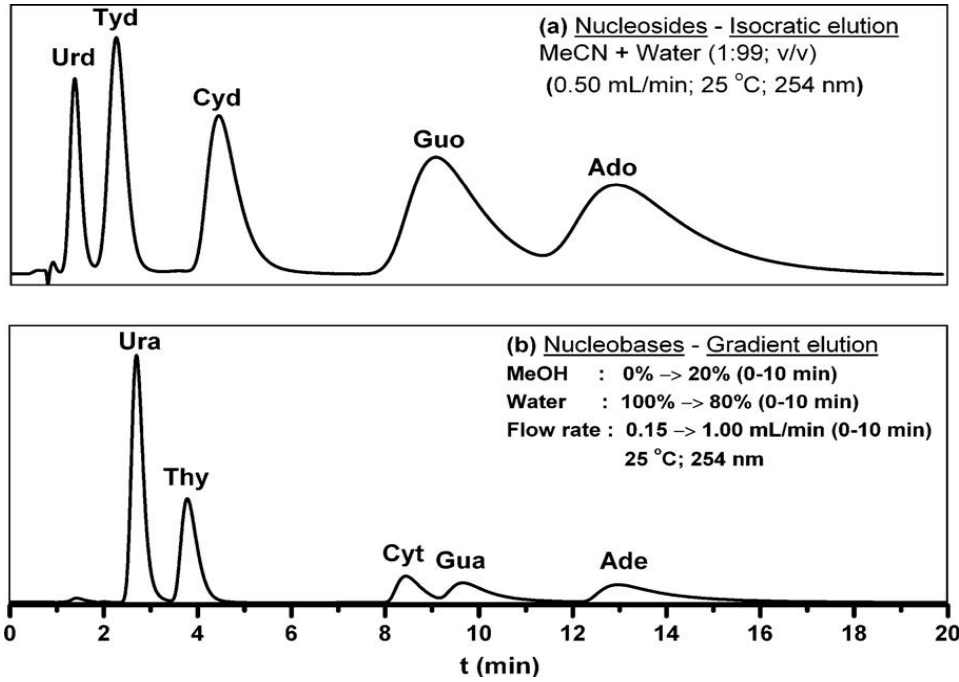
çalışma grubu düşük ve orta pH'larda oldukça yüksek kararlılık sağlayan sterik engelli diizopropil yan grupları kullanarak hidrolitik olarak oldukça kararlı amid-gömülü fazını geliştirmiştir. Bununla beraber, böyle fazların yüzey kaplaması genellikle düşüktür, bu da yüksek pH'lardaki kararlılığı düşürür.

Bazik bileşiklerin analizi düşük pik keskinliği ve etkinliklerden dolayı kromatografiler için bir problem olmuştur. Son araştırmalar asıl sebeplerin daha karmaşık olduğunu gösterse de geleneksel bakış açısı bunu silanoller üzerindeki zayıf etkileşime bağlamaktadır. Nedenlere bakmaksızın yeni dolgu fazlarının gelişimi bazik analitler söz konusu olduğunda etkileşimi artırmaya çalışmaktadır. Bu dolgu fazları geleneksel bağlanma fazından fiziksel olarak farklıdır. Çünkü bunlar alkil zincirinin içinde bir polar grup içerirler. Bu kolonlar ayırmada önemli avantajlar sağlasa da bazı dezavantajlara da sahiptir. Daha kısa alkil zincirine ve polar gruplara sahip olan gömülü(embedded) kolonlar yüksek ve düşük pH değerinde saf alkil zinciri içeren kolonlara göre daha zayıf kararlılık gösterir (Kirkland ve ark. 1989), (Kirkland ve ark. 1995), (Kirkland ve ark. 1997), (Kirkland ve ark. 1998). Bundan dolayı, daha kısa alkil zinciri ya da daha polar fonksiyonel grup içeren dolgu fazları yüksek polarlıktaki bileşiklerin ayırımında yüksek performans gösterse de daha kısa kolon ömrüne sahiptir. Mevcut araştırmalar bu kolonların eşsiz bir selektivite sergilediğini ve uygun bileşikler için kolon performansının arttığını göstermiştir. Bununla beraber, bu fazlar oldukça yeni olduklarından bu kolonların karakterizasyonu halâ devam etmektedir. Bu kolonların incelenmesi alıkonma işlemlerinin anlaşılmasına yardım edebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda polar-gömülü ve geleneksel alkil zincirli kolonların karakterleri incelenmiştir. Asid, baz ve nötral bileşiklerin karışımını kullanarak yapılan bir çalışma bu kolonların eşsizliği ve kolonlar arasındaki en önemli farklar üzerine bilgi sağlamıştır (Liu ve ark. 2006). Yine son yıllarda yapılan başka bir çalışmada aminopropilsilika'ya humik asit bağlanarak amid dolgu fazları hazırlanmış ve bu dolgu fazlarının RP ve HILIC özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada sentezlenen dolgu maddelerinin yapısı şekil 2.5'de, nükleozit ve nükleotitlerinin ayrılmasındaki etkinliğini gösteren kromatogramlar şekil 2.6'da görülmektedir (Gezici ve Kara 2011).



Şekil 2.5. Aminopropilsilikaya humik asidin bağlanmasını gösteren sentetik şema



Şekil 2.6. İzokratik ve gradient elüsyon kullanarak EC-HA-APS dolgu fazı ile RPLC koşullarında nükleozit (a) ve nükleotitlerin (b) ayrılmasını gösteren kromatogram

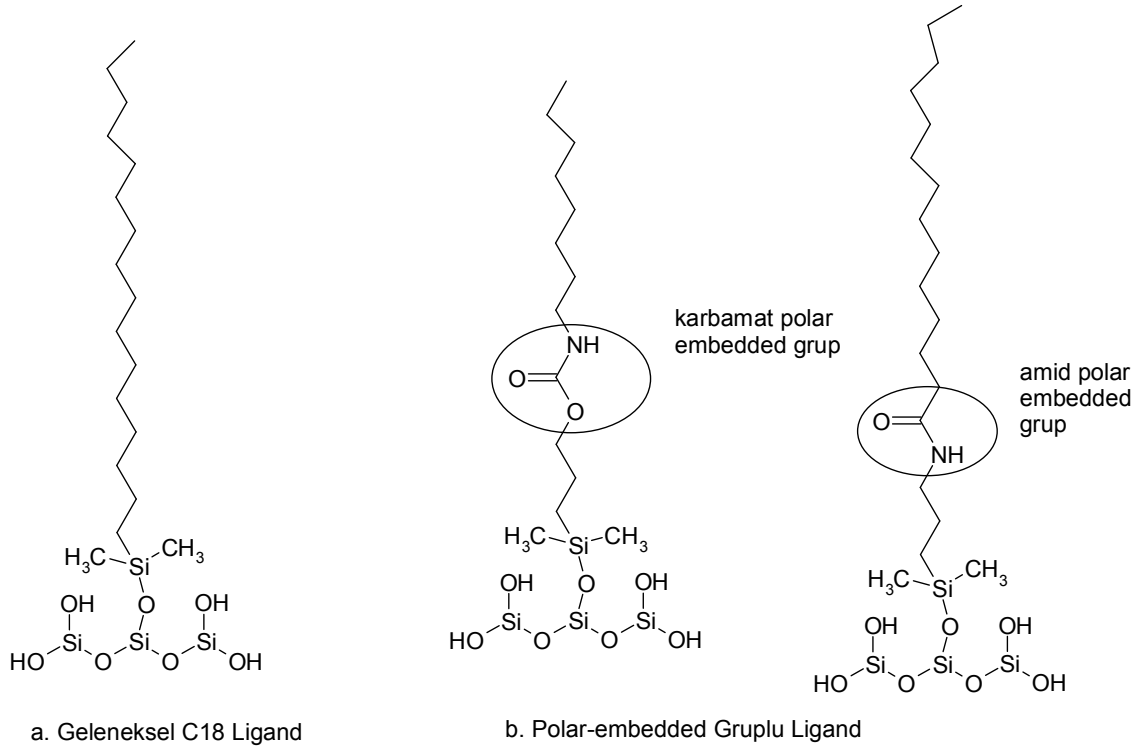
Şekil 2.7’de görüldüğü gibi polar gömülü dolgu fazları alkil zinciri içinde polar bir fonksiyonel grup içerir. Polar grubun varlığının bazik analitler için iyi bir selektivite ve pik keskinliği sağlaması gibi bazı avantajlarının olduğu kanıtlanmıştır. Bu dolgu fazları geleneksel kolonlardan farklı olduklarından eşsiz bir selektivite sağlar. Bu da karmaşık karışımların ayrılmasına olanak sağlar ki geleneksel kolonlar bunu yapamaz.

İlaveten, polar gömülü kolonların daha yüksek oranda su içeren hareketli fazın kullanımına izin verdiği tespit edilmiştir. Yüksek bağlanma yoğunluklu geleneksel kolonlarda ise su bakımından zengin hareketli faz kullanıldığında zincir kopmasının meydana geldiği saptanmıştır. Zincir kopması su bakımından zengin hareketli fazda hidrofobik alkil zincirinin toplanmasından kaynaklanır. Bu alıkonmanın geri dönüşümsüz olmasından ve azalan kromatografik etkinlikten kaynaklanabilir (Neue ve ark. 2001). Walter ve çalışma arkadaşları (2005) tarafından yapılan son çalışmalarda yüksek oranda sulu hareketli faz kullanıldığında alıkonma süresindeki azalmanın zincir kopmasından değil dolgu fazı gözeneklerinden hareketli fazın ekstrüzyonundan kaynakladığı belirtilmiştir. Alıkonmadaki düşüşün gözenek boyutuna bağlılığı, boş hacim ve akış durdurulduktan sonraki gözenek boyutundaki değişiklikler arasındaki ilişki ve alıkonmadaki düşüşün basınca bağımlılığı bu fikri doğrular. Bunun yanı sıra, hareketli faz % 100 su olduğunda karbamat gömülü grup içeren bir C₁₈ dolgu fazı alıkonma süresinde sadece % 3’lük bir düşüş gösterirken C₈ ve C₁₈ dolgu fazı alıkonma süresinde % 98’lik bir düşüş göstermiştir.

Bazik analitler için pik keskinleşmesinin artmasına neden olan bir başka faktör polar gömülü kolonların artan ıslaklıklarından kaynaklanır (McCalley 1999). Bir görüşe göre polar grup analiti silanollerden koruyan silika yüzeyindeki bir su tabakasıyla kaplanır (Neue ve ark. 2001). Diğer görüşlere göre ise polar grup serbest silanollerle etkileşmeyi tercih edebilir (O’Gara ve ark. 1995). İlaveten, eğer hareketli fazın pH’sı gömülü grubun pKa’sının altına düşerse, gömülü grup protonlanır ve pozitif yüklenir. Bu, gömülü grubu yüzeydeki silanollerden koruyarak dolgu fazı ve analitin elektrostatik itmesine neden olabilir.

Bu kolonların eşsiz olması polar gömülü dolgu fazının sentezinde kullanılan metotlardan kaynaklanır. İki basamaklı sentezin ilk basamağında propildimetilsilan gibi kısa bir alkil zincirli ara linki silika destek maddesine bağlanır. Daha sonra bu alkil silan polar gömülü alkil ligandı ile reaksiyona sokulur. Bununla beraber, geleneksel

kolonların toplam sentezinde olduğu gibi ikinci basamaktaki bağlanma reaksiyonu tamamlanmaz. Bu da silika yüzeyinde çıplak polar grupların kalmasına neden olur. Tamamlanmayan bu reaksiyon polar end-capped dolgu fazlarında olduğu gibi eşsiz bir selektivite sağlayabilir (Quach, V. 2009).



Şekil 2.7. a. Geleneksel C₁₈ dolgu fazı, b. Polar gömülü (embedded) grup içeren dolgu fazı

2.1.2.2. Polar HILIC Dolgu Maddeleri

- Amin Dolgu Fazları

Şeker, aminoasit, peptid, karboksilik asit, nükleozit ve bazı ilaçların ayrılmasında HILIC modda halâ yaygın bir şekilde kullanılan primer amin grubu içeren aminopropil grubu ile kimyasal olarak modifiye olmuş silika jel amin dolgu fazlarının en eski türüdür. (Şekil 2.6.a) Piyasada mevcut olan amin tabanlı silika kolonlar alıkonma süreleri ve seçicilikte önemli ölçüde farklılık gösterebilirler (Olsen 2001).

Amin tabanlı dolgu fazları asidik bileşiklere karşı yüksek afinite gösterirler ki bu asidik bileşiklerin alıkonmalarının partiyon ve iyon değişim mekanizmalarının bir kombinasyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır (Oyler ve ark. 1996). Bu iki etkinin

kombinasyonundan dolayı etkinlik oldukça düşük olabilir. Hareketli fazdaki uzun denge süreleri, geri dönüşümsüz adsorpsiyon sıklıkla gözlenir. Primer amin grupları oldukça reaktif olup aldehitlerle schiff bazı oluştururlar. Karbonhidratlarda aldehit grubu olduğundan dolayı amin dolgu fazları bunların ayrılmasında problem oluşturur (Ikeami ve ark. 2008).

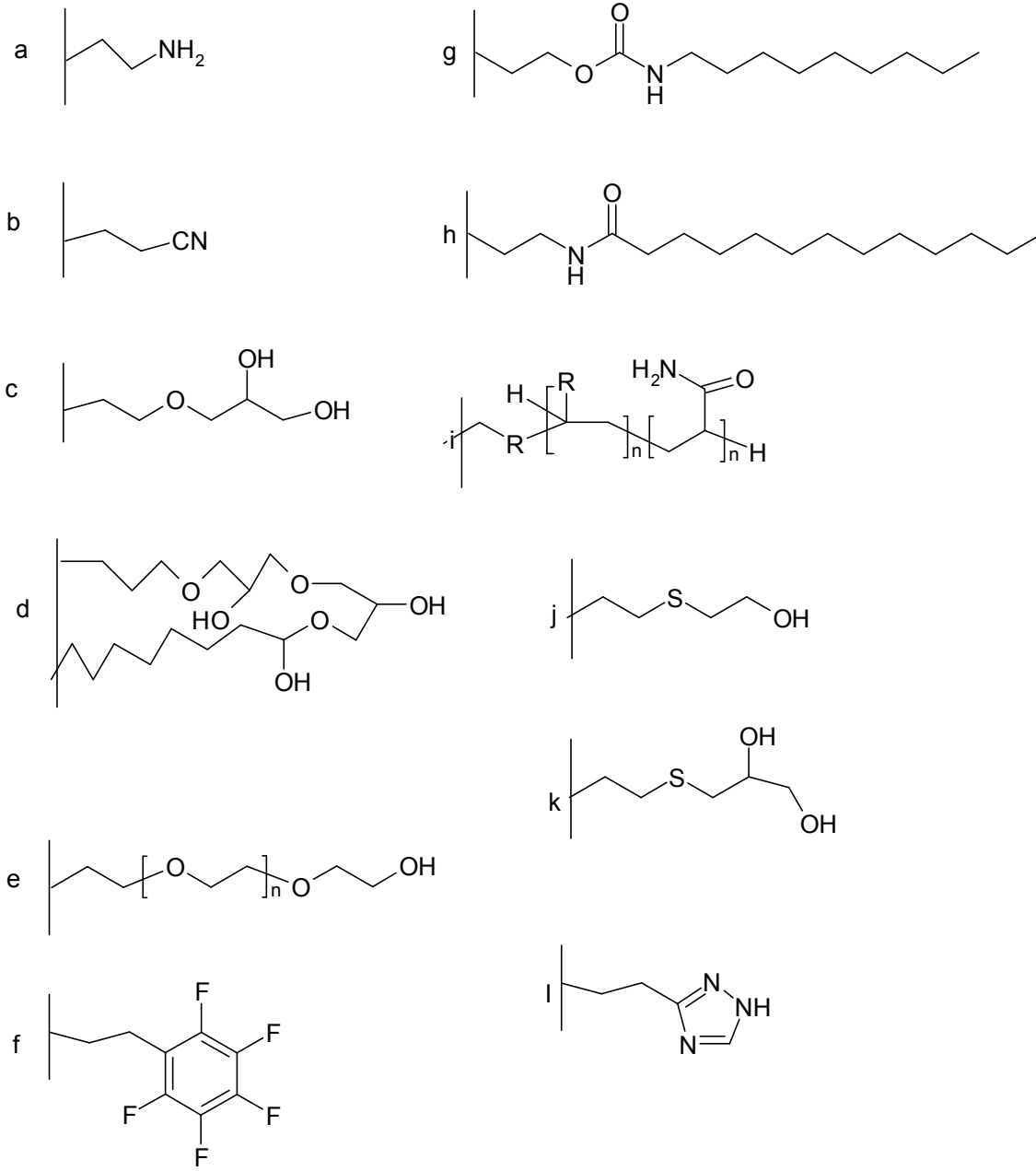
YMC Pack Polyamine II gibi sekonder ve tersiyer amin grupları içeren dolgu fazları karbonil bileşikleri ile schiff bazı oluşturmazlar. Aromatik amin içeren dolgu fazları bağıl olarak daha zayıf baz olduklarından dolayı polar amin ve asitlerin ayrılmasında daha kısa alıkonma süresi gösterir. Örneğin ticari olarak mevcut aromatik amin grubu içeren HILIC-PI bu özelliğe sahiptir.

- Amid Türevi Dolgu Fazları

Amid dolgu fazları küçük bir alkil ara linki üzerinden silika jele bağlı bir karbamoil (Şekil 2.8.g) ya da bir amid grubu (Şekil 2.8.h) içerirler. Amin tabanlı dolgu fazlarının aksine amid dolgu fazları bazik özellik göstermez. Bundan dolayı yürütücü fazda iyonlaşabilen analitler dolgu fazı ile iyonik etkileşimde bulunmazlar. Yani iyon-değiştirme durumuna pek fazla rastlanmaz. Ayrıca analitlerin geri dönüşümsüz olarak adsorplanması minimum düzeydedir. Bu özellikler Amid dolgu fazlarının yüksek kararlılığının bir göstergesidir. Yani kısacası amid dolgu fazları asidik ve bazik şartlardan minimum düzeyde etkilenir.

Amid dolgu fazlarına temel olarak peptidlerin ayrılmasında başvurulur. Hidrofilik peptidler hidrofobik peptidlere göre amid dolgu fazı üzerinde daha güçlü bir şekilde alıkonurlar. Amid dolgu fazlı HILIC kolonlar ayrıca oligosakkarit, glikoprotein ve çeşitli glikozidler gibi diğer hidrofilik ya da ampifilik polimer örneklerinin ayrılmasında da uygun bir moddur (Yoshida 1997).

Bazı amid dolgu fazları sadece belli bir analit sınıfını ayırmak için özel olarak tasarlanmıştır. Örneğin TSK-gel Amide 80 mono ve oligosakkaritlerin, şeker türevlerinin, peptid ve aminoasitlerin ayrılmasında kullanılan oldukça popüler bir HILIC kolondur (Karlsson ve ark. 2005).



Şekil 2.8. Silika yüzeyine kimyasal olarak bağlı bazı polar dolgu fazlarının yapısı

Amid-80 yalın silika jel ve diğer polar dolgu fazları ile kıyaslandığında birçok polar analit için daha yüksek alıkonma süresi gösterir. Yine amid tabanlı çeşitli dolgu fazları geliştirilmiş ve siklodekstrin türevlerinin ters-faz sıvı kromatografik ayrılmasında kullanılmıştır (Szeman ve ark. 2006), (Şekil 2.9). Şekil 2.9’da bu dolgu fazlarının yapıları ve siklodekstrin türevlerinin ayrılmasındaki etkinliğini gösteren HPLC kromatogramları görülmektedir. Siklodektrinlere karşı en iyi seçiciliği N-(4-nitrofenil)karbamid (NPhC) türevi dolgu fazının gösterdiği tespit edilmiştir.

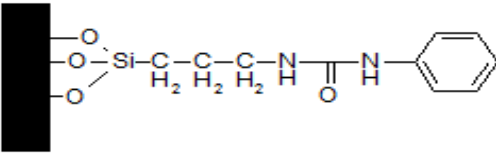
Welch ve çalışma arkadaşları (2005) çeşitli aminoasitlerden yola çıkarak bir seri yeni amid ve amin türevi dolgu maddesi sentezlemiş ve pneumocandin B₀ (Şekil 2.10) antibiyotiğinin HPLC ile kromatografik saflaştırılmasının geliştirilmesinde kullanmıştır. Şekil 2.11’de bu çalışmada sentezlenen amino-silika türevi dolgu maddelerinin farklı yollardan sentezi gösterilmektedir. Şekil 2.12’de ise aminoasit türevi dört adet dolgu maddesinin sentezi görülmektedir. Böylece bu çalışma kapsamında amid ve amin türevi on yedi adet dolgu maddesi sentezlenmiş ve pneumocandin B₀’ın ayrılmasında kullanılmış, en iyi selektivitenin 6 ve 13 numaralı dolgu maddeleriyle sağlandığı belirtilmiştir.

- Polisüksinimit ve Türevi Dolgu Fazları

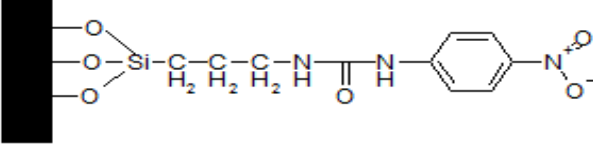
Alpert (1983) polisüksinimitle aminopropil silikanın reaksiyonu ile polisüksinimid-silikayı elde etmiş ve daha sonra polisüksinimid-silika tabanlı bir seri yeni HILIC dolgu fazları geliştirmiştir (Şekil 2.13). Poli(aspartik asit)-silikanın 2-aminoetanol ile reaksiyonu sonucu poli(2-hidroksietil)aspartamid-silika ve 2-aminoethilsülfonik asit ile reaksiyonu sonucu poli(2-sülfoetil)aspartamid-silika elde edilmiştir (Alpert 1990). Polisüksinimid-silika tabanlı dolgu materyalleri ticari olarak Poliglikopleks (PolyGlycoplex) (Şekil 2.13.a), Polihidroksietil (PolyHydroxyethyl) A (Şekil 2.13.b), PolyCAT A (Şekil 2.13.c) ve Polisülfoetil (Polysulfoethyl) A (Şekil 2.13.d) ticari isimleri altında üretilmektedir ve peptidler, proteinler, nükleik asitler, oligosakkaritler, karbonhidratlar gibi oldukça yüksek polarlıktaki bileşiklerin ayrılmasında kullanılmaktadır.

Polisülfoetil A (Şekil 2.13.d) güçlü kation değiştirme özelliklerine sahiptir ve birleşik modlu (mixed-mode) HILIC/kasyon-değiştirme mekanizması gösterir. Bu kolonun hidrofilik peptidlerin ayrılmasında uygun olduğu görülmüştür (Hartmann ve ark. 2003). % 50 ya da daha fazla asetonitril içeren sulu organik hareketli fazda tuz derişiminin artmasıyla ayırmada en iyi sonuçlar elde edilir (Alpert ve Andrews 1988). % 90’dan daha az asetonitril içeren hareketli fazlarda çok güçlü polar analitler için ayırma etkisi azalabilir (Alpert 1990).

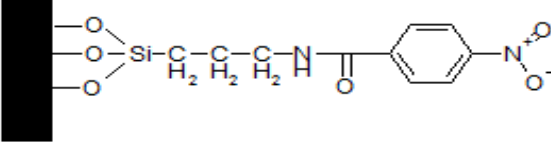
PhC: N-fenil-karbamid



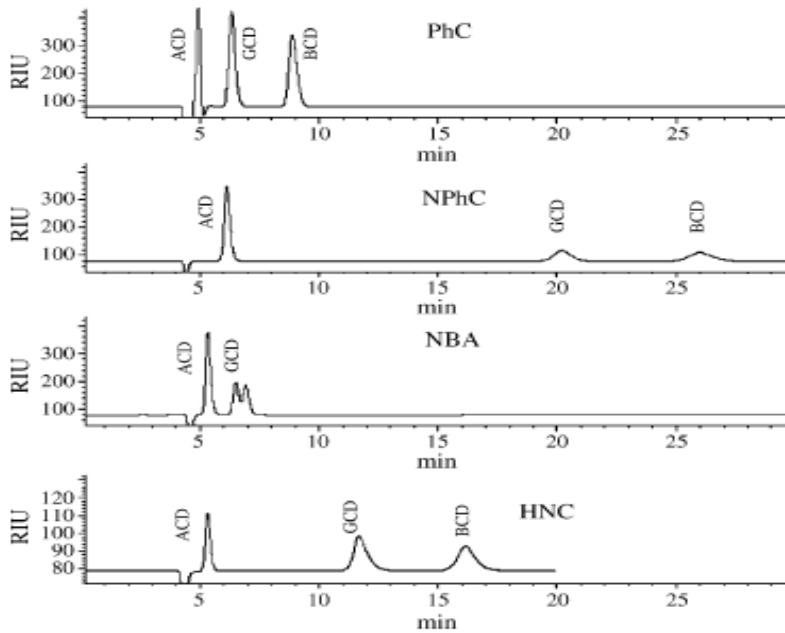
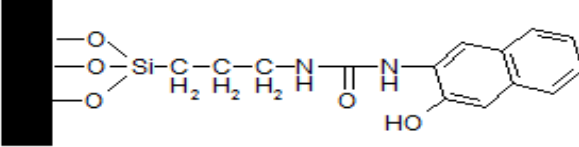
NPhC: N-(4-nitrofenil)-karbamid



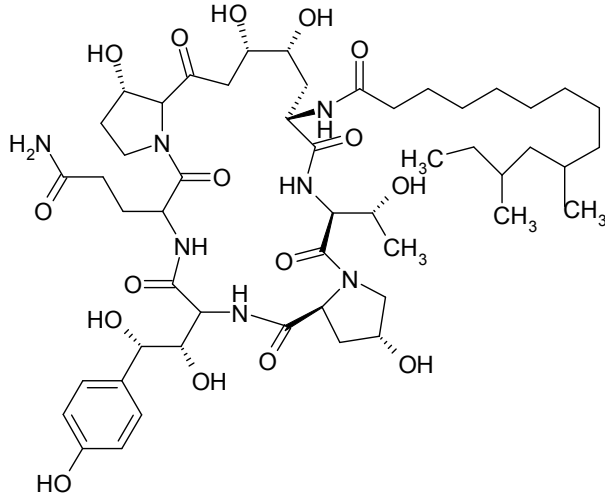
NBA: 4-nitro-benzamid



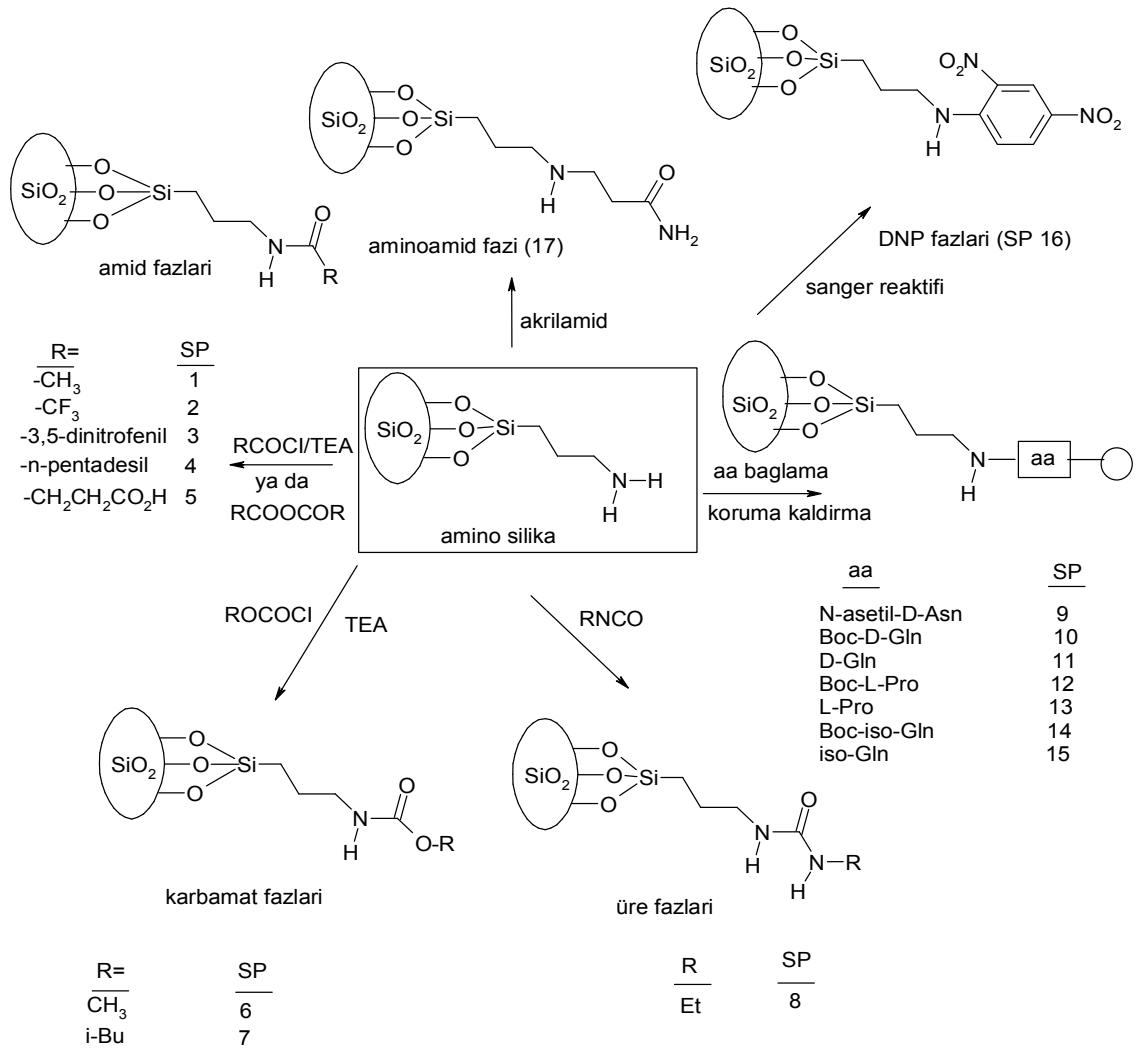
HNC: N-(3-hidroksi-2-naftil)-karbamid



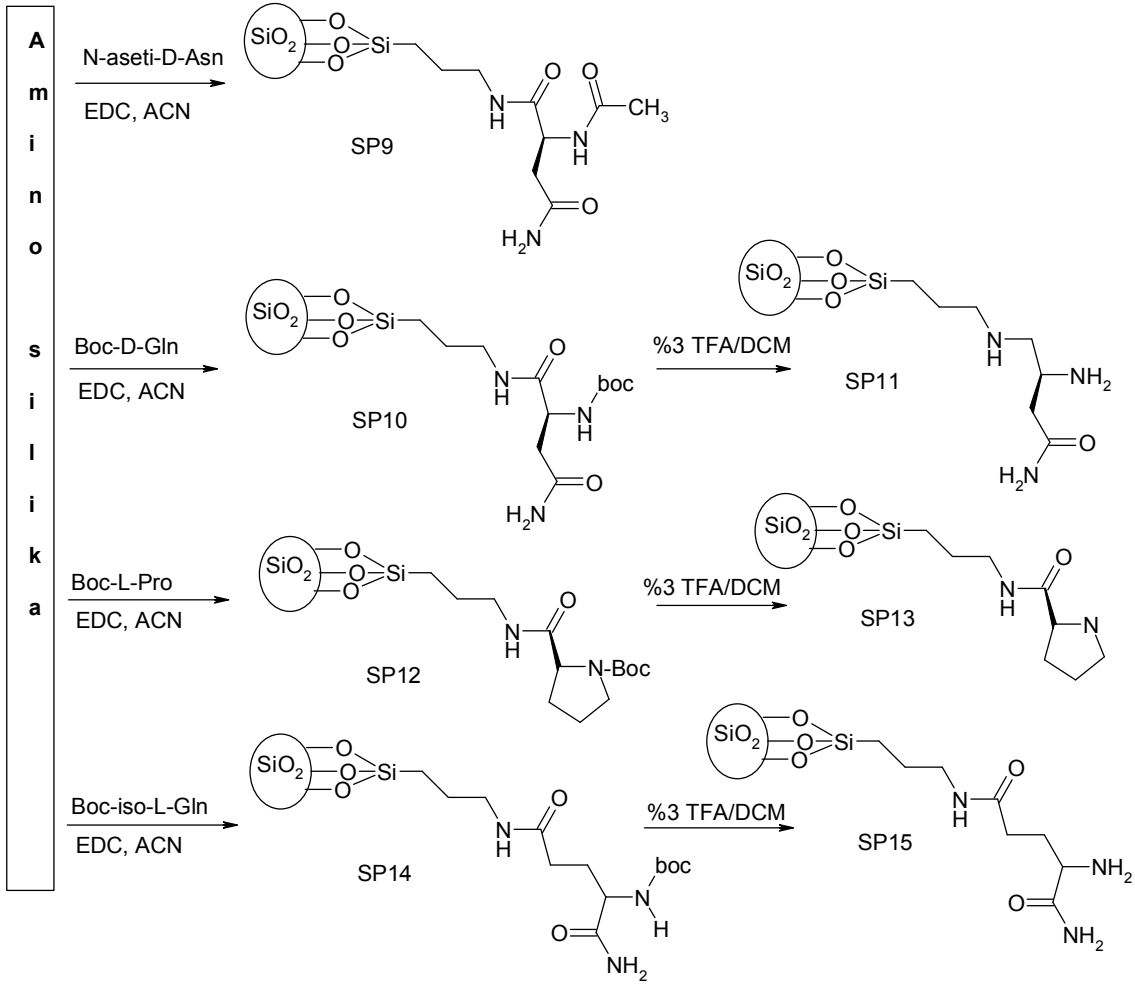
Şekil 2.9. Amid Türevi Yeni Dolgu Fazlarının Yapısı ve Siklodekstrin Türevlerinin Ayrılmasındaki Etkinliği Hareketli faz: metanol/su: 30/70 (v/v), akış hızı: 0.7mL/dk, dedektör: RI



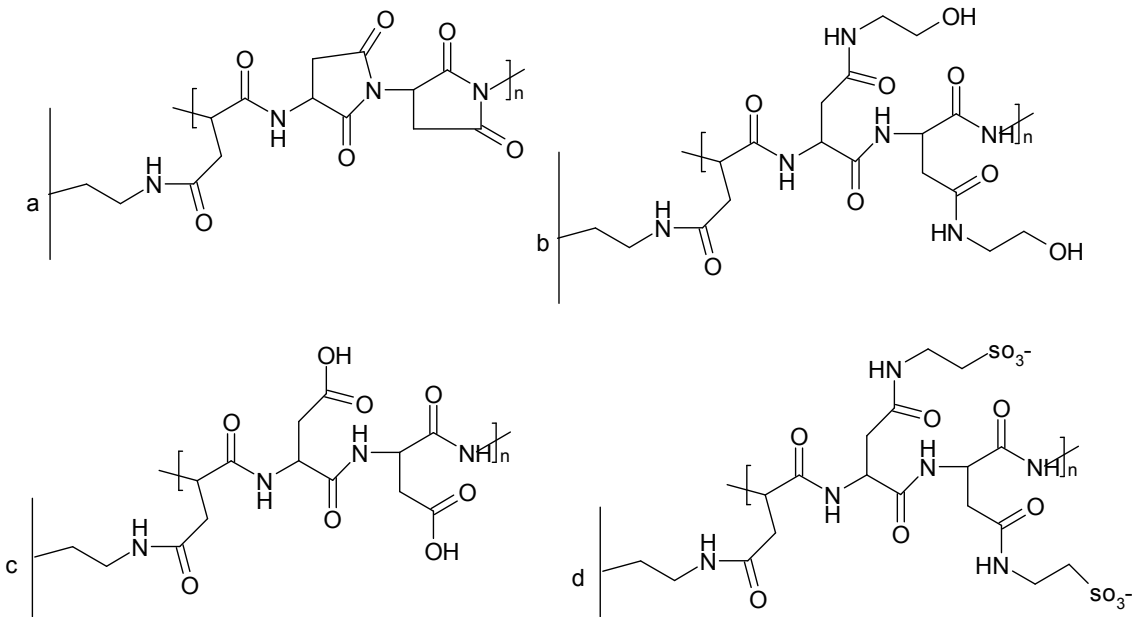
Şekil 2.10. Pneumocandin B₀



Şekil 2.11. Amino-silika türevi dolgu maddelerinin farklı yollardan sentezinin şematik gösterimi



Şekil 2.12. Aminoasit türevi dolgu maddelerinin sentezi



Şekil 2.13. HILIC ayırmalarında kullanılan polisüksinimit silika türevi dolgu fazları

Polidroksietil A (Şekil 2.13.b) fosforlanmış ve fosforlanmamış aminoasitler, peptidler ve glikopeptidler, proteinler, oligonükleotidler, karbonhidratlar ve glikozidler, metabolitler ve küçük polar moleküllerin ayrılmasında kullanılabilir (Zhu ve ark. 1991), (Oyler ve ark. 1996), (Curren ve King 2002), (Tolstikov ve Fiehn 2002). Başarılı ayırmalar trietilamonyum tamponu gibi en az 7-10 mmol/L elektrolit içeren hareketli faz gerektirir. Analitin iyonikliği ne kadar fazla ise simetrik pikler elde etmek için o kadar çok tuza ihtiyaç vardır. Poliglikopleks kolonlar (Şekil 2.13.a) monosakkaritler, oligosakkaritler ve sialil şekerler ya da onların p-nitrobenzoiloksi türevlerinin ayrılması için uygundur (Alpert ve ark. 1994). Seri olarak bağlanan birleşik modlu (mixed-mode) anyon-değiştirme/HILIC katyon-değiştirme/HILIC silika-tabanlı küçük gözenekli iyon değiştiricilerinin dipeptidlerin ve biyolojik ve sentetik analitlerdeki diğer bileşiklerin analizi ve saflaştırılması için uygun olduğu bulunmuştur.

- Diol, Polietilenglikol ve Siyano-propil Türevi Dolgu Fazları

Kimyasal olarak bağlı diol fazları genellikle nötral hidrofilik 2,3-dihidroksipropil ligandlar içerirler ve silika jel yüzeyine glisidiloksipropiltrimetoksisilan molekülünün bağlanmasıyla ve bunu takiben epoksi grubunun hidroliz olmasıyla hazırlanırlar (Şekil 2.8.c). Bu fazlar yüksek polarite ve yalın haldeki silika jel gibi hidrojen bağı yapma özelliği gösterir ve polar bileşiklerin geri dönüşümsüz adsorpsiyonunu önlemek için bir sililleme reaktifıyla kısmen bloke olabilen ve bir kısmı serbest kalan silanol grupları dışında iyonlaşabilen gruplar içermez. Diol-silika kolonlar proteinlerin ayrılması için kullanılmaktadır (Regnier ve Noel 1976), fakat son zamanlarda daha çok hem ters faz sıvı kromatografisi modunda hem de HILIC modda ayrılabilen fenolik bileşiklerin ayrılmasında kullanılmaktadır (Jandera ve Hajek 2009). Silika jele bağlı undecyl-1,2- diol ligandlar içeren dolgu fazı alkil zincirinin sonunda polar diol fonksiyonel grubunu içeren uzun bir hidrofobik alkil zinciri içerir ve RP/HILIC ikili modunun alıkonma mekanizmasını gösterir. Bu dolgu fazı ile hem düşük organik hareketli fazlı hem de yüksek organik hareketli fazlı sistemlerle çalışılabildiği için hem ters-faz hem de HILIC özellik gösterir.

HILIC diol kolonlar polar aktif ilaçların kantitatif tayininde kullanılırlar ve burada hareketli faz olarak 10 mmol/L amonyum klorür içeren su-asetonitril karışımı kullanılır (Wang ve ark. 2005).

Çapraz bağlı diol dolgu fazı Luna HILIC 200 (Şekil 2.8.d) çapraz bağlı olmayan diol silika dolgu fazları ile kıyaslandığında hidrolize karşı yüksek kararlılık, daha güçlü hidrofobik etkileşimler ve daha iyi pik keskinliği ve ayırma gösterir (Jandera ve ark. 2010). Luna HILIC 200 kolon hem oksietilen ve hem de hidroksi bağlı gruplar içerirler (Jandera ve Hajek 2009).

Luna HILIC 200 kolon nikotin ve onun kotinin, trans-3-hidroksikotininini nikotin-N-oxid ve kotinin-N-oksit gibi temel metabolitlerinin ayrılmasında kullanılır. Ayırma işleminde kullanılan gradient şartlar şu şekildedir; 10 mmol/L amonyum format tamponu (pH:3.0) içerisinde asetonitril oranı % 98 oranında başlayıp % 35 oranına değişmektedir ve analiz süresi 13 dakikadır (Marclay ve Saugy 2010).

Hidrofobik etkileşimler daha az polar poli (etilen glikol), PEG, bağlı dolgu fazları için Luna HILIC 200 kolona göre daha önemlidir (Blahova ve ark. 2006).

Siyanopropil-silika bağlı dolgu fazları (Şekil 2.8.b) hidrojen bağı yapma kabiliyetinden yoksundur ve organik çözücü bakımından zengin hareketli fazlarda polar bileşiklerin alıkonması genellikle düşüktür. Bundan dolayı bu dolgu fazlarının HILIC ayırmalarındaki kullanımları spesifik analitlerle sınırlıdır (Yoshida ve Okada 1999), (Daunoravicius ve ark. 2006).

- Siklodekstrin Türevi Dolgu Fazları

Siklodekstrinler kısmen hidrofobik kaviteli toroid zincirli yapılardaki altı(α -CD), yedi(β -CD) ya da sekiz(γ -CD) D-glukoz ünitelerine sahip siklik oligosakkaritlerdir. CD kiral tanıma özelliği gösterir ve bundan dolayı sıvı kromatografisinde hareketli faza eklenerek kiral selektör olarak ya da enantiyoselektif ayırmalarda kiral dolgu fazı (CSP) olarak kullanılır. Amin, üretan ya da eter bağı ile modifiye edilerek hazırlanan silika jel tabanlı siklodekstrin kiral dolgu fazları ters-faz koşulları altında ya da polar organik modda enantiyomerlerin kromatografik ayrılmasında kullanışlıdır. Siklodekstrin dolgu fazları ayrıca hareketli faz olarak % 70 asetonitril kullanıldığında HILIC modda şeker alkollerin, monosakkaritlerin ve oligosakkaritlerin ayrılmasında kullanılır (Armstrang ve Jin 1989). Alıkonma süresi monosakkarit ünitesinin artmasıyla artar. Çünkü siklodekstrin birimlerinin artması analitlerin etkileşeceği kavite sayısını da artırır ve ayrıca polar hidroksil gruplarının sayısı da artacağından alıkonma süresinin artması olağandır (Berthod ve ark. 1998).

Siklodekstrin tabanlı kolonlar TSKgel Amide 80 kolonuna göre aminoasitler ve bazı polar analitlerin ayrılmasında daha yüksek alıkonma süresi gösterir ve aminopropil-silika dolgu fazlarından daha karardır (Risley ve Strega 2000).

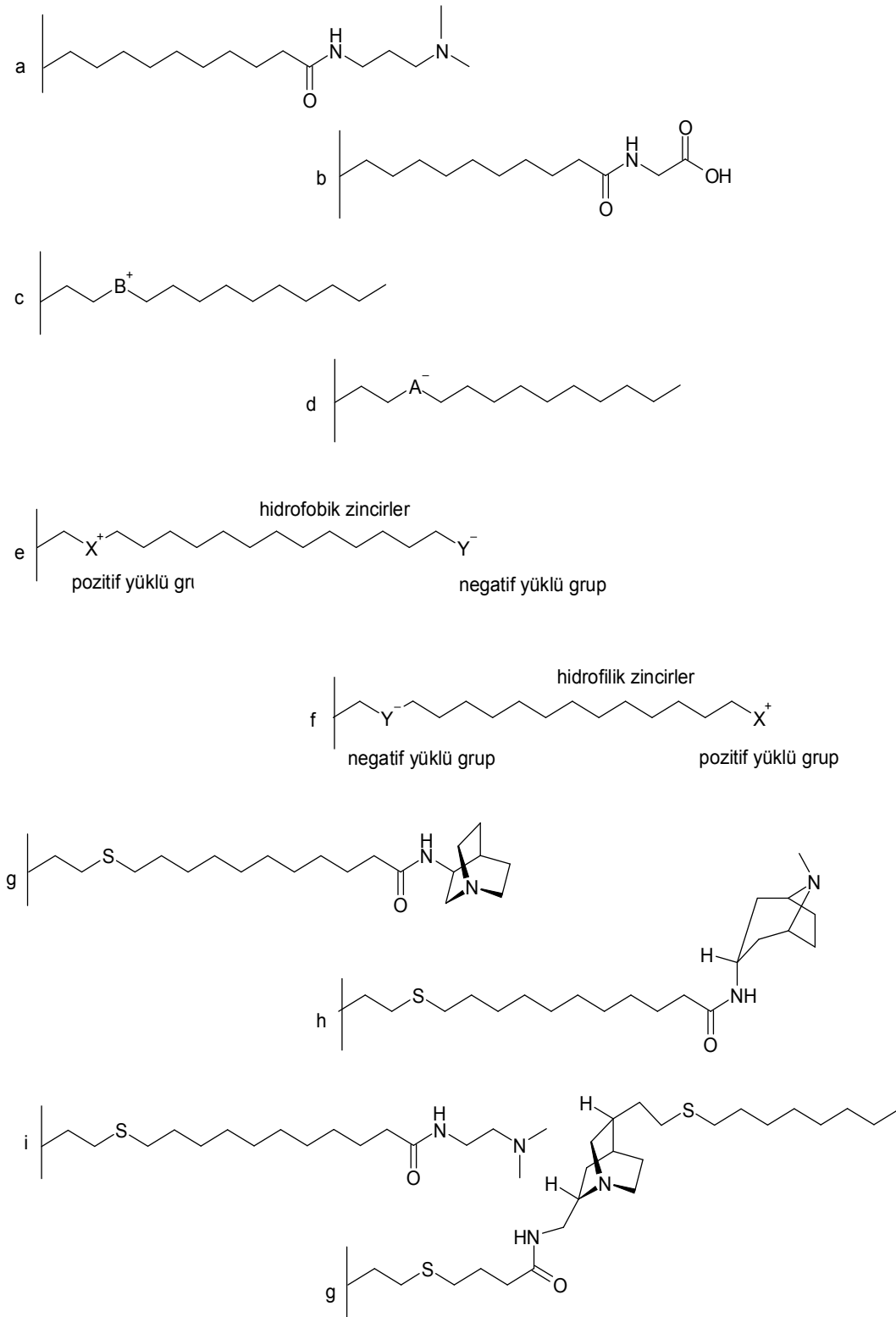
HILIC koşulları altında kiral tanıma özelliği gösteren β -siklodekstrin fazı alkin modifiyeli silika tanelerinin yüzeyinde azit modifiyeli β -siklodekstrinin bağlanmasıyla hazırlanmıştır (Şekil 2.14.a) (Liu ve ark. 2008). Ters-faz ile ayrılabilen bazı flavanoidler ve izoflavanoidler HILIC koşulları altında Atlantis HILIC silika ve siklodekstrin kolonlarda iyi tutunur ve ayrılır (Zhang ve ark. 2008).

- Silika jel Tabanlı Dolgu Fazlarının Diğer Türleri

Birkaç diğer polar silika jel tabanlı dolgu fazları HILIC ayırmalarında kullanılmaktadır (Şekil 2.8- 2.15). 1,2,4-triazol grubu ile uyarlanmış Cosmosil HILIC kolon bazik karakterlidir ve suda çözünebilen vitaminler, karboksilik asitler, aminoasitler, peptidler ve polar ilaçların etkili bir şekilde ayrılmasında kullanılmaktadır (Ikeami ve ark. 2008). Flor ile uyarlanmış silika tabanlı dolgu fazları aromatik aminlerin ve diğer polar aromatik bileşiklerin HILIC ayırmalarında kullanılabilir. Şekil 2.8.k'de gösterilen dolgu fazı hem HILIC hem de ters-faz modda kullanılabilir ve vitamin ve nükleotit gibi çeşitli analit sınıfının ayrılmasında kullanılır (Bicker ve ark. 2008), (Wu ve ark. 2008).

Şekil 2.14.b-d'de gösterilen dolgu fazları karbonhidrat ile uyarlanmış silika jel tabanlı dolgu fazları olup monosakkaritlerin stereoselektif ayrılmasında ve polar aminoasitlerin, glikopeptidlerin, oligonükleotitlerin ve flavanoidler gibi doğal ürünlerin HILIC modda ayrılmasında kullanılır (Moni ve ark. 2010).

Birleşik modlu (Mixed-mod) HILIC/iyon-değiştirme kolonlar organik çözücü bakımından zengin olan hareketli fazlarda güçlü polar, zayıf polar ve polar olmayan bileşiklerin bile geniş çapta ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Bu tip kolonlara örnek olarak mixed-mod WAX-1 ve WCX-1 kolonları (Şekil 2.15.a ve b), (Lämmerhofer ve Lindner 2011) ve zayıf asidik ya da bazik özellikler gösteren polar bir hidrofilik grup ve uzun bir alkil zincirine sahip bir ligand ile modifiye olmuş silika jel tabanlı bazı ticari kolonlar (Şekil 2.15.c-j) gösterilebilir (Wu ve ark. 2008).



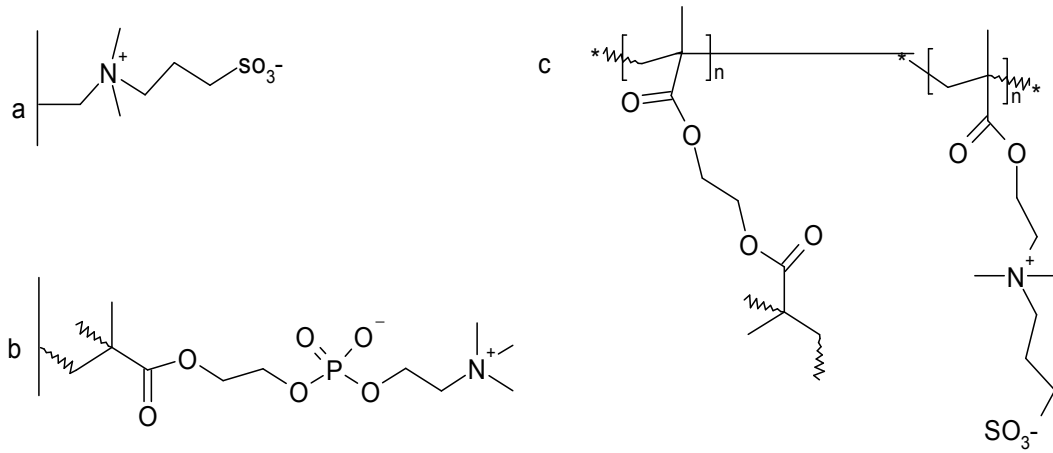
Şekil 2.15. Silika tabanlı bazı birleşik modlu (mixed mod) HILIC/ iyon-değişim dolgu fazlarının yapısı

- Zwitteriyonik Dolgu Fazları

Zwitteriyonik yapılı dolgu fazları temel olarak iyon değiştirme ayırmaları için tasarlanmıştır. Irgum'un grubu inorganik tuzların, küçük organik iyonik bileşiklerin ve proteinlerin HILIC ayırmaları için sülfoalkilbetain dolgu fazlarını geliştirmiştir (Jiang ve Irgum 1999), (Viklund ve Irgum 2000), (Jiang ve Irgum 2002), (Wikberg ve ark. 2009). Bu dolgu fazları ile hem anyonik hem de katyonik bileşiklerin eş zamanda ayrılması mümkündür (Guo ve Gaiki 2005).

Sülfoalkilbetain bağlı dolgu fazları güçlü bir şekilde suyu adsorplar. Zayıf elektrostatik etkileşimler negatif ya da pozitif yükler taşıyan analitlerin ayrılmasını etkilese de dolgu fazındaki polar etkileşimler (hidrojen bağı ve dipol-dipol) temel öneme sahiptir. Zwitteriyonik kolonlar ticari olarak ZIC-HILIC (silikajel tabanlı) ve ZIC-pHILIC (polimer tabanlı) isimleri ile mevcuttur. Zwitteriyonik materyallerin kromatografik özellikleri önemli ölçüde diğer HILIC fazlarından farklıdır. ZIC-HILIC kolonlar küçük polar bileşiklerin (Guo ve Gaiki 2005), metabolomeslerin (Idborg ve ark. 2005), glukosinولاتeslerin (Wade ve ark. 2007), aminoglikozidlerin (Oertel ve ark. 2004), peptidlerin (Boersma ve ark. 2007), glikopeptidlerin (Takegawa ve ark. 2006) ve diğer bileşiklerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. ZIC-HILIC kolonlarla peptidlerin HILIC modda ayrılması pH'a bağlıdır. pH 3'de ayırma güçlü katyon değiştiricileri (Strong Cation Exchangers, SCX) ile ayırmaya benzerlik gösterir. Daha yüksek bir pH'da (pH 7-8) daha iyi kromatografik ayırma gösterir (Boersma ve ark. 2007). Farmasötik olarak önemli olan pürin ve pirimidin bazları ve nükleozitler tampon-asetonitril hareketli fazındaki asetonitril oranını gradient olarak düşürerek sülfobetain ZIC-HILIC ya da TSKgel Amid kolonlar ile ayrılabilirler (Marrubini ve ark. 2010).

HILIC ayırmaları için Zwitteriyonik dolgu fazlarının diğer türü Şekil 2.16.b'de gösterilen dolgu fazıdır. Bu kolonlar ZIC-cHILIC ve KS-polyMPC ticari isimleri ile mevcuttur. Bu kolonlar bitki dokularındaki serbest aminoasitler, karboksilik asitler ve bunların metal kompleksleri gibi analitlerin selektif olarak ayrılmasını sağlaması bakımından ZIC-HILIC kolondan farklılık gösterir (Weber ve ark. 2008). Anyonik ve katyonik türler hem ZIC-HILIC hem de ZIC-cHILIC zwitteriyonik materyalleri ile ayrılabilirler ancak bunların ayrılma sıraları farklılık gösterir.



Şekil 2.16. Bazı Zwitteriyonik HILIC dolgu fazlarının yapısı

- HILIC Ayırmalarında Çalışma Şartları

HILIC metodlarının sistematik gelişiminde, çalışma faktörlerinin incelendiği ve ayarlandığı yerde tek değişkenli optimizasyon biçimi kullanılabilir (Dejaegher ve ark. 2008). HILIC modda kullanılan bazı yararlı deneysel kurallar vardır (Jandera, 2011).

Genellikle standart çalışmalar için 3-5µm tanecik boyutlu 100-150 mm uzunluğunda 4.6 mm çaplı kolonlar kullanılır. Analiz süresini azaltmak ya da rezölüsyonu artırmak için kolon uzunluğu ve akış hızı değiştirilebilir. Çok yüksek bir basınç altında çalışmak ayırmayı hızlandırır, bununla beraber HILIC ayırmalarında ikinci etkiye sahip olabilir. Ters-faz sistemlerdeki davranışın aksine, hidrofilik etkileşim kromatografisinde şekerlerin alıkonma faktörlerinin yüksek basınç altında düştüğü görülmüştür (Neue ve ark. 2010).

Ters-faz HPLC'nin aksine, saf organik çözücülerde çözünen analitler genellikle bir HILIC sisteme direkt olarak enjekte edilebilir, çünkü organik çözücüler zayıf elüentler oldukları için polar analitler kolonun ucunda dar bir bölgede birikir. Bu, plazma örneklerindeki bazik ilaçların analizini çok kolaylaştırır. Çünkü plazma proteinleri asetonitril çözeltilerinde çöktürülür ve matriks karıştırıcıları uzaklaştırılır. Asetonitril supernatantları HILIC modda direkt olarak analiz edilebilir. Diğer yandan, yüksek elüsyon gücüne sahip sulu bir çözücünün analitin çözülmesinde kullanılmasından kaçınılmalıdır. Çünkü yüksek çözme gücüne sahip olan çözücü analitleri kolonda sürükleyeceği için analitler hareketli faz ile eş zamanlı olarak analize başlayamazlar. Bu da analitin daha az tutunmasına, düşük kromatografik etkinliğe ve zayıf ayırmaya yol açabilir (Guinebault ve Broquaire 1981), (Vukmanic ve Chiba

1989), (Layne ve ark. 2001), (Loeser ve Drumm 2006), (Ali ve ark. 2008). HILIC'ta polar analitler için yüksek bir performans elde etmek için örnek karışımı hazırlanırken % 50'den fazla organik çözücü kullanılmalıdır.

Bazı çok güçlü polar bileşikler HILIC kolon ile çok güçlü bir etkileşim yapacaklarından dolayı kolonda alıkonurlar. Bu da kolon performansının düşmesine yol açar. Böyle bir problemi bertaraf etmek için farklı pH'lara sahip hareketli fazlar kullanılabilirdiği gibi örnek iyice temizlenerek kolona verilebilir veya koruyucu bir kolon kullanılabilir (Jian ve ark. 2010).

- HILIC'ta Hareketli Faz

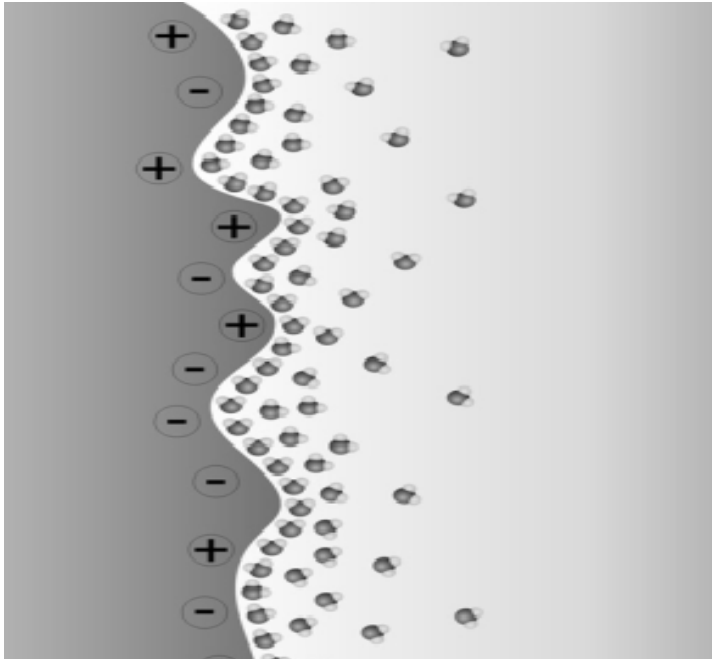
HILIC'ta genellikle % 5-40 arasında su ya da tampon içeren organik çözücü bakımından zengin hareketli faz kullanılır. Analize ilk başladığında tüm örnek analitlerinin ayrılması için su ya da tampon oranının % 40 olması tavsiye edilir. Daha sonra uygun bir alıkonma sağlayıncaya kadar asetonitril oranı artırılır. Alternatif olarak asetonitril oranının gittikçe azaltıldığı bir gradient elüsyon yapılabilir. Asetonitril oranının azaldığı böylece su ya da tampon oranının arttığı gradient elüsyon sistemi özellikle yalın haldeki silika kolonlar ile çeşitli biyolojik örneklerin HILIC ayırmalarında başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Gradient elüsyon genellikle % 5 oranında amonyum asetat ya da amonyum format tamponu içeren % 95 asetonitril oranından başlar yavaş yavaş asetonitril oranı düşürülür. Su oranının artırılması kolonda güçlü bir şekilde tutunmuş örnek karışımlarının ayrılmasına yardım edebilir.

Sulu organik hareketli fazdan su yüklü ya da yüksüz bağlanma fazı üzerinde güçlü bir şekilde adsorplanır. Sulu fazın derişiminin birkaç yüz ppm'den daha fazla olduğu hareketli fazlarda, suyun dolgu fazı üzerinde adsorbe edilmesi dolgu fazı üzerinde yüksek oranda su adsorbe etmiş ekstra bir tabaka oluşmasına neden olur (Şekil 2.17). % 0.5-1 arasında su içeren sulu organik hareketli fazlı normal fazda su adsorbe eden tabaka yeterince kalındır. Bununla beraber, polar yüzey merkezlerinde analit adsorpsiyonu alıkonmayı önemli ölçüde etkileyebilir (Buszewski ve Noga 2012).

HILIC modda organik çözücünün seçimi alıkonmada güçlü etkiye sahiptir. HILIC modda organik çözücülerin elüsyon gücü genellikle çözücü polaritesi arttıkça artar. Proton-donör/Proton-akseptör etkileşim güçleri şu şekilde sıralanabilir: Metanol>Etanol>2-propanol>tetrahidrofur>asetonitril (Quiming ve ark. 2007).

HILIC modda en çok tercih edilen organik çözücü asetonitrildir. Çünkü diğer organik çözücüleri içeren hareketli fazlar genellikle örnek analitin yeterince alıkonmamasına ve pik keskinliğinin simetrik olmamasına neden olur. Bu olumsuz etki genellikle metanol kullanıldığında görülür. Bu yüzden HILIC uygulamalarında metanol tercih edilmez. Metanolün tercih edilmemesi suya benzer özellik göstermesinden kaynaklanabilir. Çünkü hem metanol ve hem de su protik çözücüdür. Protik çözücüler silika ya da diğer polar dolgu fazlarının yüzeyini solvatize ederler. Ayrıca, su ve metanol birbirleriyle güçlü hidrojen bağı yapar. Bundan dolayı etanol, 2-propanol gibi diğer alkoller de HILIC modda organik çözücü olarak tercih edilmezler. Asetonitril ise proton-donör etkileşimleri göstermez ve böylece polar adsorbentlerin yüzeyinde adsorbe olmuş su bakımından zengin sıvı dolgu fazına karşı daha büyük farklılıklar sağlar. Asetonitril yerine kullanılacak daha az toksik organik çözücüler denenmiş fakat şimdiye kadar tetrahidrofuran dışında herhangi uygun bir çözücü bulunamamıştır. Aseton da asetonitril ile benzer polarlıktadır, fakat aseton HILIC koşulları altında daha düşük alıkonma ve önemli selektivite farklılıkları gösterir. Ayrıca, UV bölgesinde absorpsiyon yapar. Bundan dolayı asetonitrilin yerine kullanılması tavsiye edilmez (Fountain ve ark. 2010), (Kawachi ve ark. 2011).

Polar dolgu fazı - Sulu alt tabaka - Organik çözücü ağırlı hareketli faz



Şekil 2.17. Organik çözücü bakımından zengin bir çevrede polar dolgu maddesinin yüzeyinde adsorbe olan sulu tabakanın şematik gösterimi

Hareketli faza karbondioksit eklenmesi yalın haldeki silika jel üzerinde ayırmaya çalışılan nükleik bazlar, kortisol, florbiprofen, teofilin ve kafeinin HILIC moddaki ayrımını ve alıkonmasını etkiler (dos Santos Pereira ve ark. 2010).

Ayrılan zayıf asit ve bazların iyonik ya da nötral formda olması gerekir. Eğer bir kısmı iyonik bir kısmı nötral formda ise, bu pikin yayvan olmasına, pikin şekilsiz olmasına ve hatta omuz şeklinde olmasına bile neden olur. Ters-faz sıvı kromatografisinde, iyonlaşma genellikle ortadan kaldırılmıştır. Çünkü iyonlaşan formlar genellikle kolonda çok zayıf alıkonurlar. HILIC hareketli fazları genellikle tampon içerirler. Kullanılan tamponun pH ve iyonik kuvveti iyonlaşabilen örneklerin alıkonmasını ve ayırmadaki selektivitesini önemli ölçüde etkiler (Hao ve ark. 2008), (Jandera 2008). Ters-faz sıvı kromatografisinin aksine, tamponun pH'sı örnek bileşiklerin iyonlaşmasını artırabilecek değerde olmalıdır (asitler için $pH > 7$, bazlar için $pH < 7$). HILIC dolgu fazı iyonlaşabilen fonksiyonel gruplara sahip ise selektivitenin pH'ya bağlılığından yararlanılarak ayırma yapılabilir. Bununla beraber, yüksek ve düşük pH arasındaki alıkonma farklılıkları genellikle ters-faz sıvı kromatografisindeki kadar büyük değildir. Çünkü analitin iyonlaşması yüksek asetonitril oranında ortadan kalkar.

HILIC sistemde iyonlaşabilen herhangi bir fonksiyonel grup içermeyen dolgu fazlarında alıkonma tampon derişiminin artmasıyla artar. Çünkü tampon derişiminin artmasıyla hareketli fazdaki solvate olmuş tuz iyonlarının sayısı artacak ve böylece analit ile dolgu fazı arasındaki hidrojen bağı etkileşimi artacaktır (salting-out etkisi). Bununla beraber, iyon kuvvetinin artmasıyla amino tabanlı ve üzerinde iyonlaşabilen fonksiyonel grup içeren dolgu fazlarında HILIC modda alıkonma düşebilir. Çünkü karşit tuz iyonları iyon değışim etkileşimiyle dolgu fazındaki zıt yüklü bölgelerle etkileşmek için analit iyonlarıyla yarış halindedir (Nguyen ve ark. 2010).

Kuyruklu pikler HILIC modda ters-faz şartlarına göre daha temeldir. Pik keskinliğı iyon kuvvetinin artmasıyla bazan artabilir. Bazı örnek analitler 100 mmol/L tampon derişimi gerektirebilir. Hareketli faza trifloroasetitasit (TFA) eklendiğinde silika tabanlı dolgu fazlarında bazik analitlerin pik keskinliğı artar.

Normal-faz sıvı kromatografisinde olduğu gibi, HILIC moddaki alıkonma analitin polaritesinin artmasıyla artar ve alıkonma dolgu fazının polaritesinin artmasıyla ve hareketli fazın polaritesinin azalmasıyla artar. Uygun bir dolgu fazını seçmenin yanı

sıra hareketli fazdaki organik çözücünün yüzdesi de ayırmayı etkileyen temel faktördür. Organik çözücünün (asetonitril) oranının artması çeşitli dolgu fazlarında polar bileşiklerin alıkonmasını artırır. Ayırma selektivitesindeki değişiklikler hareketli fazdaki su ya da tampon yüzdesinin değişimiyle meydana gelebilir (Guo ve Gaiki 2011), (Kučera ve ark. 2011).

Su HILIC koşulları altında en güçlü elüenttir. Bundan dolayı su oranındaki küçük bir artış alıkonmayı çok önemli ölçüde düşürür. Alıkonmayı ve kolona çok zayıf bir şekilde tutunmuş bileşiklerin ayırımını artırmak için hareketli fazdaki su oranı % 5 ya da daha az olmalıdır. Bazı uygulamalarda, su kısmen ya da tam olarak polar bir organik çözücünün yerini alabilir. Örneğin, BEH-HILIC kolonda metakrilik asit, sitosin, nortriptilin ve nikotinik asitin alıkonması önemli ölçüde artmıştır ve ayırmaya % 90 asetonitril-% 10 amonyum asetat (10 mM) oranlı hareketli faz ile başlanmış ve tampon oranı % 5'e gradient olarak değiştirilerek ayırma sağlanmıştır. Alıkonma polaritenin azalmasıyla artmıştır ve organik çözücünün elüsyon gücü metanol>ethanol>2-propanol şeklinde sıralanmıştır (Jandera, 2008).

Polar bir kolonun kullanıldığı bir çalışmada hareketli faz olarak sadece polar organik çözücü kullanılmıştır. Bu tekniğe susuz HILIC (NA-HILIC) kromatografi adı verilmiştir. Hareketli fazda hiç su olmadığı için, dolgu fazı üzerinde adsorplanan sıvı akışkan tabaka etilen diol, metanol ya da etanol gibi organik protik bir modifier içerir. Böyle elüsyon koşulları bazan polar organik mod olarak ifade edilir ve polar analitlerin normal faz ve sulu-organik HILIC arasındaki farkını sağlayabilir. Serbest silika, diol ve tiyogliserol gibi polar dolgu fazlarıyla HILIC modda nükleik bazların, nükleozitlerin deoksiniükleotitlerin alıkonması ve selektif ayrılması için asetonitrile protik bir çözücü eklenmiştir (Bicker ve ark. 2008). NA-HILIC çözünürlüğü düşük olan bazı oligomerlerin ya da su içeren HILIC hareketli fazlarda çökebilene oldukça az polar özellik gösteren bileşiklerin analizine yardım edebilir.

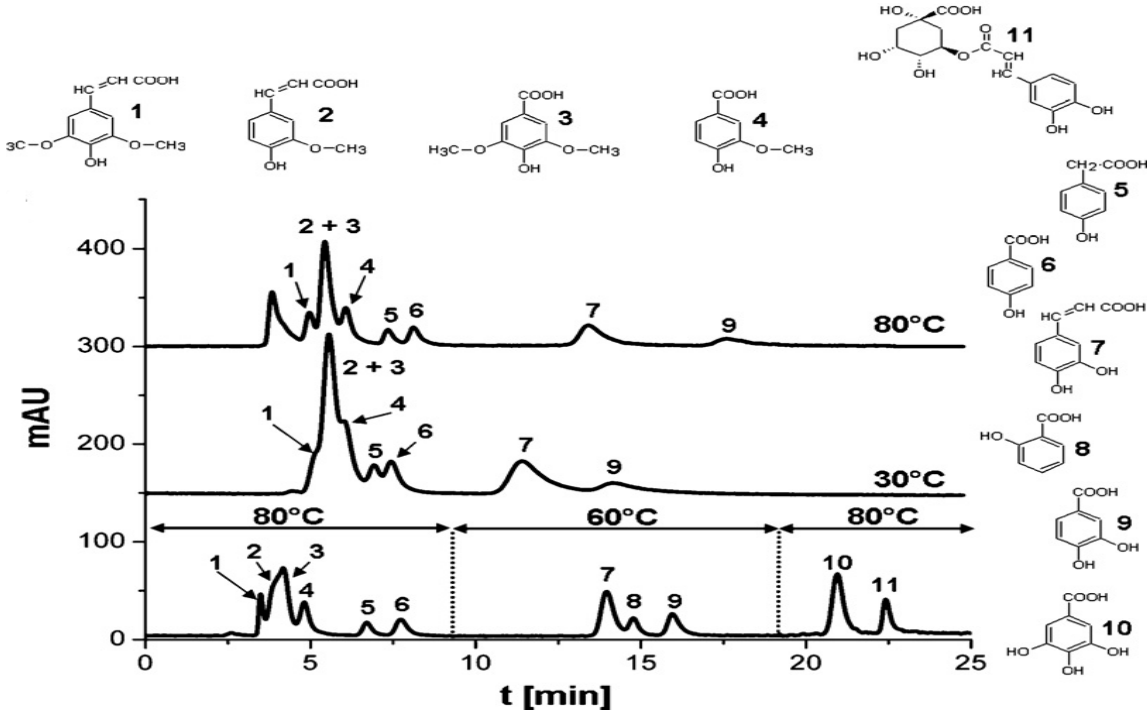
- Sıcaklık Etkisi

HILIC'ta alıkonma genellikle sıcaklığın yükselmesiyle azalır. Bu muhtemelen hareketli faz ve dolgu fazı arasındaki hidrojen bağı ve diğer polar etkileşimlerin bağ enerjisindeki farkın azalmasından kaynaklanır (Guo ve ark. 2007). Fakat sıcaklık değişimi alıkonmada hareketli faz bileşiminden daha az bir etkiye sahiptir. Ayırma

selektivitesinde önemli sıcaklık etkileri moleküllerin büyüklük ya da bulunduğu form farklı olan bileşikler için beklenebilir (Zhu ve ark. 1996).

Bazı durumlarda, ayırma selektivitesi sıcaklıktan önemli ölçüde etkilenebilir. Modifiye olmamış silika hibrid bir kolon ve UDC kolesterol hidrosilat bir silika kolon ile fenolik asitlerin HILIC alıkonma verilerine göre bir ya da iki tane metoksi grubu içeren asitlerin alıkonması daha fazladır. Bu nedenle, fenolik asitler ortamın sabit sıcaklığında en iyi ayrılmaya sahiptir (Jandera 2011).

Bununla beraber, bazı diğer HILIC sistemlerde farklı sıcaklık etkileri bulunmuştur. Şöyle ki, bazılarında daha yüksek sıcaklıklarda alıkonma artarken, bazılarında sıcaklığa bağlı olmaksızın alıkonma daha fazla ya da daha azdır (Guo ve Gaiki 2005). Bu davranış zwitteriyonik bir kolon üzerinde HILIC modda alıkonmaya çok düşük entalpik katkıyı ve ayırma üzerinde entropik etkilerin temel role sahip olduğunu işaret eder. Bu muhtemelen dolgu fazı üzerinde adsorbe olmuş sıvı faz ve hareketli fazda farklı hidrojen bağı yapan örnek analitlerin solvatize olmasından kaynaklanır.



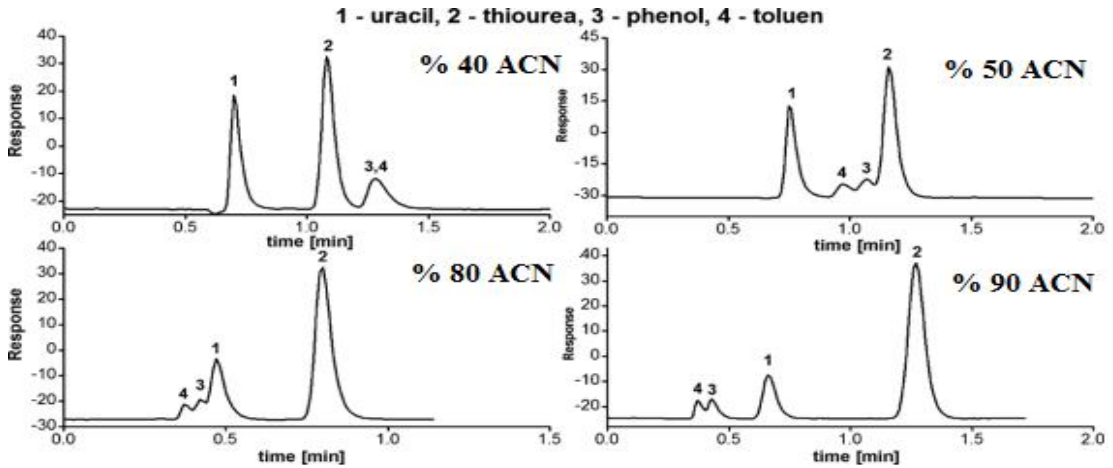
Şekil 2.18. MEDSA-EDMA kolon ile fenolik asitlerin alıkonmasında sıcaklığın etkisi

Kolon sıcaklığının artması kromatografik etkinliği daha düşük viskozite ve daha yüksek difüzyondan dolayı genellikle olumlu yönde etkiler. Ancak, Amid-80 kolon üzerinde sıcaklık 40°C'den 60°C'ye değiştirildiğinde monosakkaritlerin ve üronik asitlerin pik genişliğinin arttığı ve alıkonmalarının düştüğü görülmüştür (Karlsson ve ark. 2005).

HILIC koşulları altında polimetakrilat monolitik sülfobetain kolon sıcaklıktan çok fazla etkilenmese de, bu kolon üzerinde fenolik asitlerin pik genişliği ve hem izokratik ve hem de gradient ayırma etkisi 30°C'deki ayırma ile kıyaslandığında 60-80°C arasında önemli ölçüde artmıştır (Şekil 2.18) (Škeřikova ve Jandera 2010).

- HILIC-RP Arası Özellik Gösteren Polar Kolonlarda Ayırma Mekanizması

Sulu normal faz kromatografide alıkonma ters-fazdakinin aksine su oranının artmasıyla azalır. Bununla beraber, ters-faz sistemlerde dolgu fazı üzerindeki serbest silanol grupları ile polar grupların etkileşimi alıkonmayı etkileyebilir. Diğer yandan, solvofobik (polar olmayan) etkileşimler HILIC koşulları altında alıkonmaya bir dereceye kadar katkıda bulunabilir. Çünkü birçok polar dolgu fazı (yalın haldeki silikagel hariç) silika yüzeyi ile polar grupların kovalent bağlanmasına olanak kılan hidrokarbon halkası gibi bazı polar olmayan yapısal elementler içerir.



Şekil 2.19. MEDSA-EDMA kolonda RP ve HILIC modda alıkonmaya hareketli fazda asetonitril yüzdesinin ve analit polaritesinin etkisi

HILIC-RP arası özellik gösteren polar kolonların varlığında, su bakımından zengin hareketli faz kullanıldığında ters-faz davranışı baskındır ve minimum alıkonma elde edilinceye kadar alıkonma organik çözücünün oranının artmasıyla azalır. Organik çözücünün oranı daha da arttığında alıkonma yeniden artmaya başlar. Çünkü yüksek oranda organik çözücü içeren hareketli fazlarda polar etkileşimler solvofobik etkileşimlerden daha güçlü olur (Şekil 2.19).

Şekil 2.19 hareketli fazdaki su oranı azar azar arttığında zwitteriyonik polimetakrilat monolitik kapiler kolonda HILIC ve RP arasındaki geçişi göstermektedir. % 40 Asetonitrilde elüsyon sırası; urasil, tiyoüre, fenol ve tolüen şeklinde olup tipik bir ters faz davranışı gösterir. Şöyleki polar urasil kolonu ilk önce terk ederken en apolar tolüen kolonu en son terk etmiştir. % 80 ve 90 asetonytril kullanıldığında HILIC koşulları altında tolüen ve fenol urasil ve tiyoüreden önce kolonu terk etmiştir. % 50 asetonytril kullanıldığında hem HILIC ve hem de RP mekanizması alıkonmaya aynı anda etki eder (Urban ve ark. 2009).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

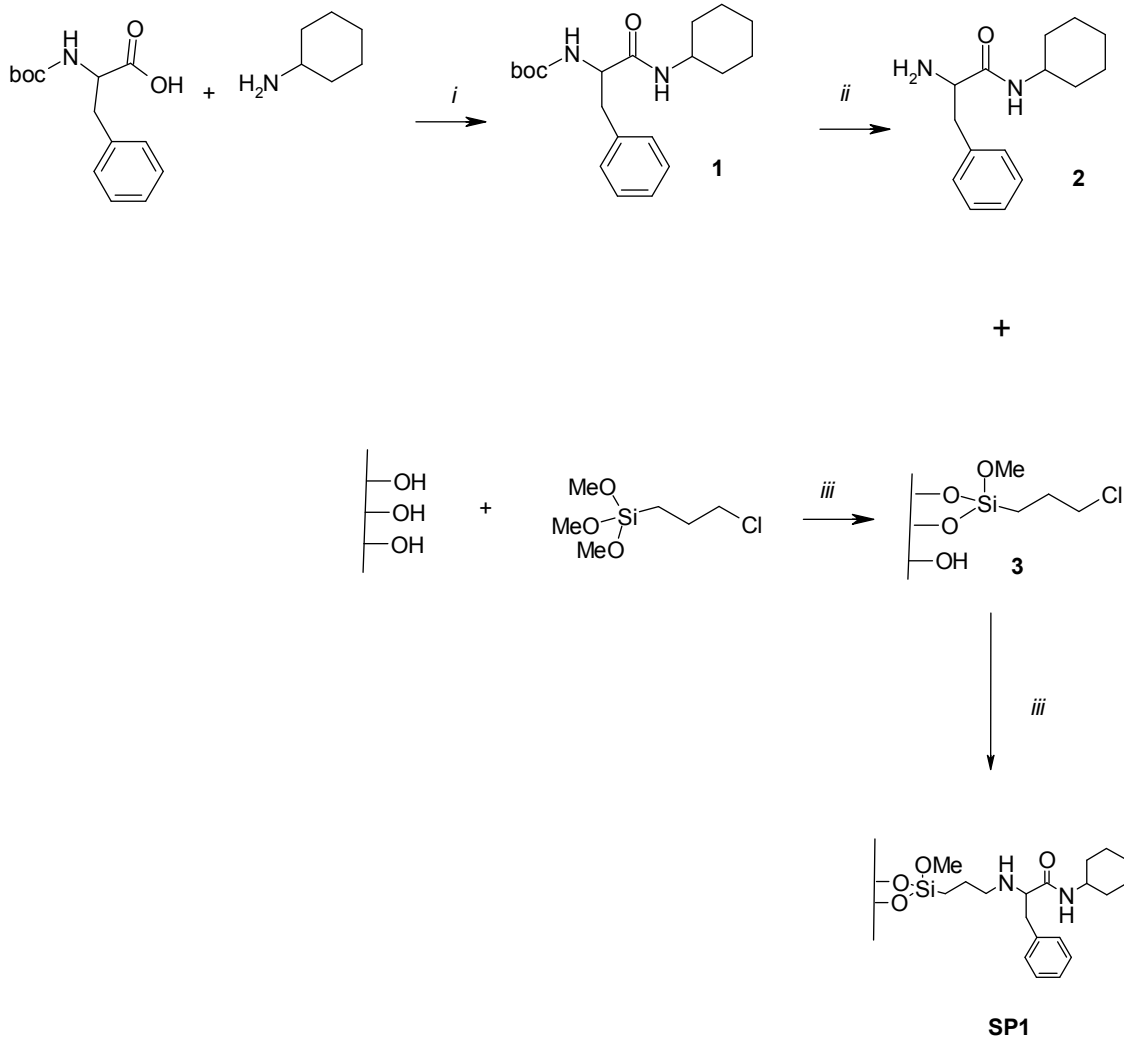
Spherical silika jel (küresel silika jel) (SuperSpherSi 60, 4 μ m, 60 Å), kolon kromatografisi için kullanılan silika jel 60 (Merck, 0.040-0.063 mm) Merck'ten temin edildi. HPLC'de kullanılan çözücüler HPLC kalitesinde olup Merck'ten temin edildi. Tüm analitler, diğer tüm reaktif ve çözücüler Sigma-Aldrich ya da Merck'ten temin edildi. Sentezde kullanılan tüm reaktifler yüksek saflıkta olup ayrıca saflaştırılmadan kullanıldı. DCM ve THF destillendikten sonra kullanıldı. Erime noktaları açık kapilerli Electrothermal 9300 cihaz ile belirlendi. İnfrared spektrumu Mattson 1000 FTIR spektrometresi ile alındı. Element analizleri Thermo Scientific FLASH 2000 cihazı ile belirlendi. Ultra saf su Millipore Milli-Q ultra saf su cihazı ile elde edildi. SEM görüntüleri JEOL/JSM-6510 LV cihazı ile elde edildi. ¹H (400 MHz) ve ¹³C (100 MHz) NMR spektrumları Bruker DPX-400 hig-performance digital FT-NMR spektrometresi ile belirlendi. Kimyasal kaymalar (d) ve eşleşme sabitleri (j) sırasıyla milyonda bir (ppm) ve hertz olarak belirlendi.

3.2. Sentez

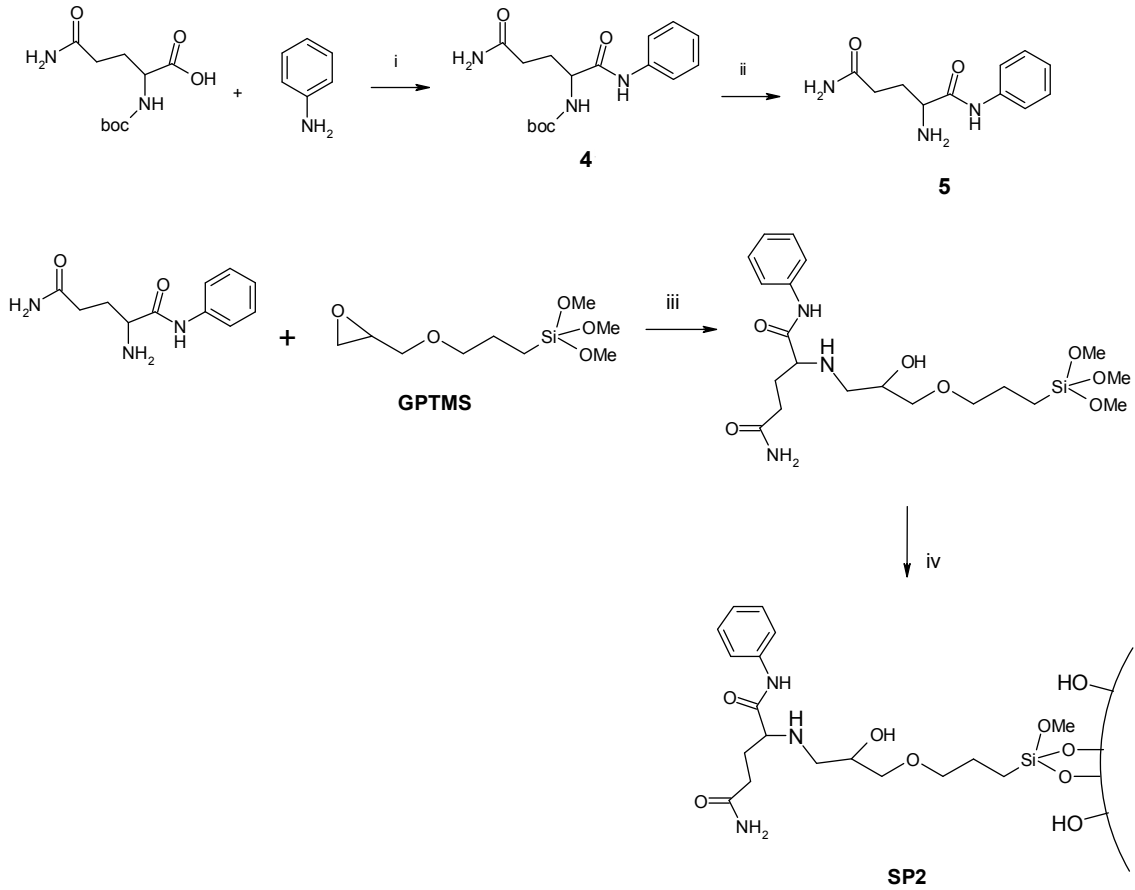
Bu çalışmada iki adet yeni kolon dolgu maddesi sentezlendi. Başlangıç maddeleri olarak N-Boc-Fenil alanin ve N-Boc-Glutamin aminoasitleri seçildi. Şekil 3.1'de SP1 dolgu maddesinin sentezi verilmektedir.

N-Boc-Fenil alanin DCC varlığında siklohegzilamin ile etkileştirilerek bileşik **1**, bunun da TFA/AcOH ile etkileşimi sonucu Boc- grubu kaldırılarak bileşik **2** elde edildi. Öte yandan 3-kloropropiltrimetoksisilan silikaya tutturularak kloropropillenmiş silika jel (**3**) elde edildi. Bileşik **2** ile **3**'ün toluendeki dört günlük reaksiyonu sonucu **SP1** dolgu maddesi edildi.

SP2 dolgu maddesinin sentezi için N-Boc-Glutamin anilin ile DCC varlığında etkileştirilerek bileşik **4**, bunun da TFA/AcOH ile etkileşimi sonucu Boc- grubunun uzaklaştırılmasıyla bileşik **5** elde edildi. Bileşik **5** GPTMS ile etkileştirilmesini takiben silika jel ile toluende 4 gün boyunca reflaks edildi ve **SP2** dolgu maddesi elde edildi (Şekil 3.2). Sentezlenen bileşiklerin yapıları ¹H NMR, ¹³C NMR ve IR ile aydınlatıldı. Dolgu fazlarının yapıları da IR, SEM ve element analizi ile karakterize edildi.



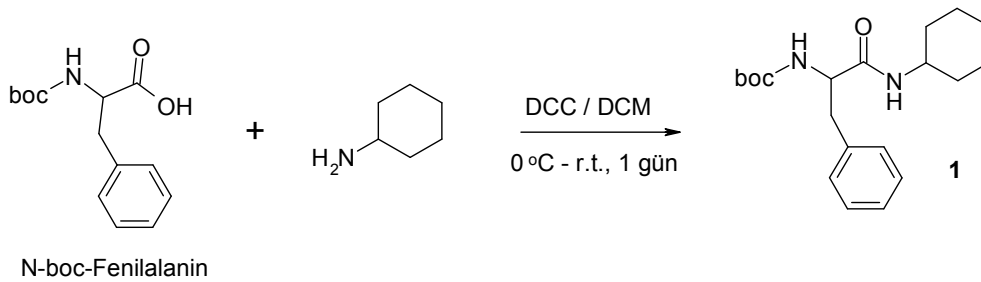
Şekil 3.1. SP1'in Sentez Şeması. Reaktifler ve Koşullar; *i*: DCC, 0°C-oş, 24 saat; *ii*: TFA/AcOH (1:1, v:v), DCM; *iii*: toluen, riflaks, 4 gün



Şekil 3.2. SP2'nin sentez şeması. Reaktifler ve Koşullar; *i*;DCC, oda şartları, 24 saat *ii*; TFA /AcOH (1:1, v:v), DCM, *iii*;EtOH, riflaks, 2 gün, *iv*;Küresel silica jel, Toluen, riflaks, 4 gün

3.3. Metot

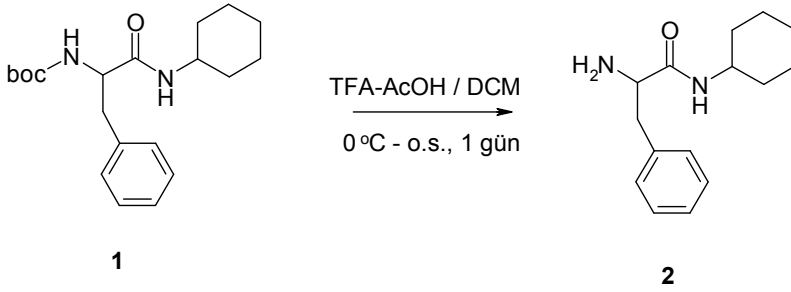
3.3.1. N-Boc-N'-Sikloheksilfenilalanamid'in Sentezi (1)



N-Boc-fenilalanin (2g, 7.55 mmol) ve sikloheksilamin (820 mg, 8.3 mmol) diklorometanda (15 mL) çözüldü ve karışmakta olan bu karışımın üzerine 0°C'de yaklaşık bir saat süreyle 15 mL diklorometanda çözülmüş disikloheksilkarbodiimid (DCC, 1.71 g, 8.3 mmol) eklendi. Bir gece oda şartlarında karıştırıldıktan sonra, karışım süzüldü ve çözücü uzaklaştırıldı. Kalan kısım silika jel üzerinde Hekzan/ Etilasetat (4/1)

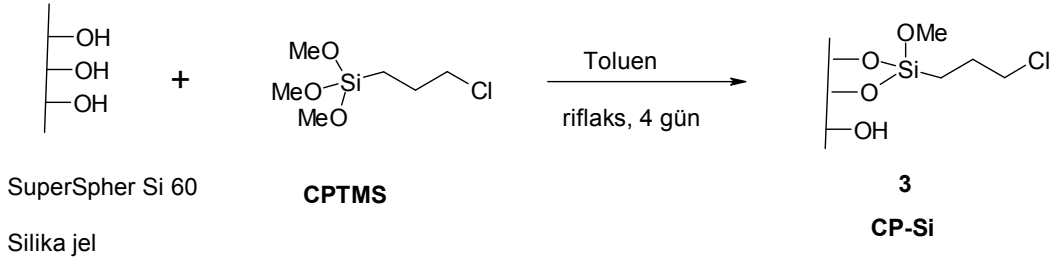
oranında kolon kromatografisiyle ayrıldı. Beyaz katı N-Boc-N'-Sikloheksilfenilalanamid (1) elde edildi. Verim 3.11 g olup % 90 olarak kaydedildi. E.N: 134-135 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 0.90-1.95 (m, 19 H), 2.91-2.99 (m, 1H), 3.05-3.15 (m, 1H), 3.65-3.76 (m, 1H), 4.18-4.27 (m, 1H), 5.18 (bs, 1H), 5.57 (bs, 1H), 7.21-7.33 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 26.64, 25.41, 32.71, 38.96, 48.08, 56.73, 79.11, 126.90, 128.64, 129.38, 136.95, 155.35, 169.90. IR v (cm⁻¹) ; 3341, 3060, 3020, 29.60, 2930, 2853, 1690, 1649, 15.38, 1521, 1449, 1386, 1291, 1264, 1166, 743, 699.

3.3.2. N'-Sikloheksilfenilalanamid'in Sentezi (2)



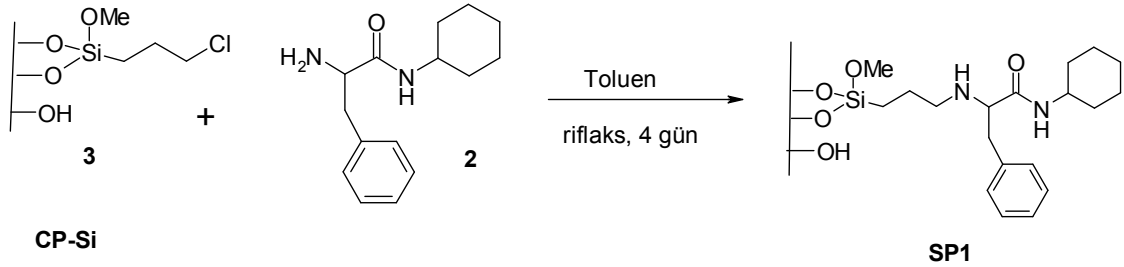
N-Boc-Amid (1) 5 mL diklorometanda çözüldü ve 0°C'de iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine TFA/AcOH (1:1) (1.2 mL) eklendi. Bir gece oda şartlarında karıştırıldıktan sonra çözücü uzaklaştırıldı ve kalan kısmın üzerine 1N NaOH (5 mL) eklendi. Karışım DCM (3x15 mL) ile ekstrakte edildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu, süzülde ve çözücü uzaklaştırıldı. Beyaz katı N'-Sikloheksilfenilalanamid (2) elde edildi. Verim 710 mg olup % 99 olarak kaydedildi. EN: 217 °C'de bozunuyor. ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 1.1-2.2 (m, 12H), 2.90-2.95 (m, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 3.75-3.81 (m, 1H), 4.16-4.19 (m, 1H), 6.07 (s, 1H), 7.19-7.33 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 24.94, 25.77, 28.99, 37.78, 51.29, 57.44, 127.28, 128.66, 129.44, 134.97, 173.17. IR v (cm⁻¹) ; 3324, 3296, 3084, 3027, 2935, 2853, 1631, 1547, 1445, 1388, 1305, 1249, 1151, 1091, 746, 701, 663.

3.3.3. 3-Kloropropilsilika jel (3)



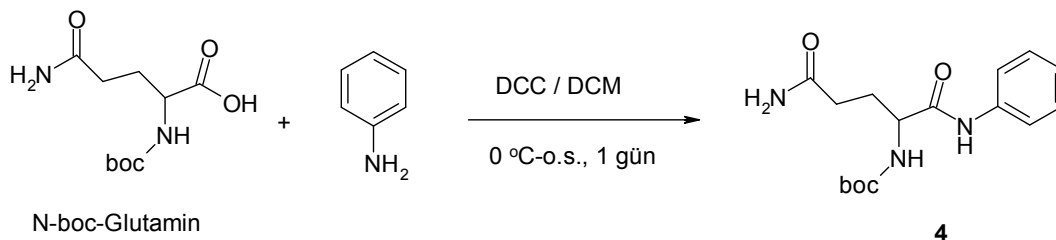
HPLC kalitesindeki küresel silika jel (4 μ m, 60 Å) toluenle (60 mL) süspansiyon haline getirildi ve üzerine 3-kloropropiltrimetoksisilan (2 g, 10 mmol) eklendi. Karışım dört gece karıştırılarak riflaks edildi. Toluene süzöldü ve kloropropillenmiş silika jel soxhlet ekstraksiyonu ile bir gece kloroformla yıkandı. Daha sonra beyaz katılar sekiz saat boyunca vakum altında kurutuldu. Element analizi: C 5.32, H 1.09 (Bu kloropropillenmiş silika gel'in 1 gramma 1.11 mmol kloropropilsilinin karşılık geldiğini ifade eder).

3.3.4. SP1 Dolgu Maddesinin Sentezi



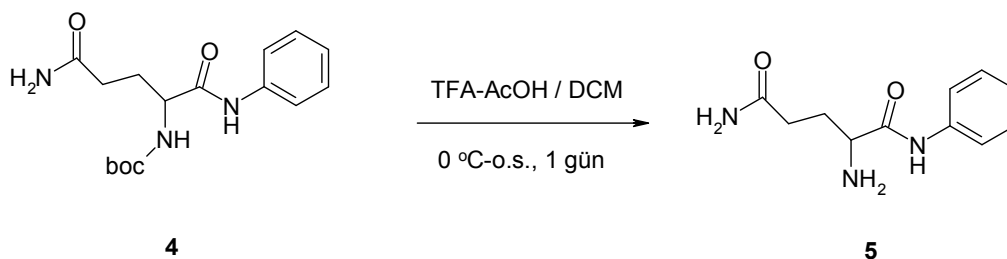
3-Kloropropilsilika jel (3) (4 g) toluenle (60 mL) süspansiyon haline getirildi ve bileşik (2) (1.5 g, 6 mmol) bu karışıma eklendi. Karışım dört gün boyunca karıştırılarak riflaks edildi. Toluene süzöldü ve elde edilen SP1 dolgu maddesi soxhlet ekstraksiyonu ile bir gece kloroformla yıkandı. Daha sonra beyaz katılar yedi saat boyunca vakum altında kurutuldu. Element analizi: C 21.45, H 3.24, N 2.46 (Bu SP1'in 1 gramma 1.11 mmol ligandın karşılık geldiğini ifade eder).

3.3.5. N-Boc-N'-Fenilglutamid'in Sentezi (4)



N-Boc-glutamin (1.86 g, 7.55 mmol) ve anilin (7.22 mg, 8.3 mmol) THF'de (15 mL) çözüldü ve karışmakta olan bu karışımın üzerine 0°C'de yaklaşık bir saat süreyle 15mL THF'de çözülmüş disikloheksilkarbodiimin (DCC, 1.71 g, 8.3 mmol) eklendi. Bir gece oda şartlarında karıştırıldıktan sonra, karışım süzüldü ve çözücü uzaklaştırıldı. Kalan kısım silika jel üzerinde Hekzan/ Etilasetat (1/6) oranında kolon kromatografisiyle ayrıldı. Beyaz katı N-Boc-N'-Fenilglutamid (4) elde edildi. Verim 1.44 g olup % 60 olarak kaydedildi. EN: 178-179 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 1.98 (s, 9 H), 1.74-1.94 (m, 2H), 2.08-2.22 (m, 2H), 4.02-4.07 (m, 1H), 6.81 (s, 1H), 7.02-7.61 (m, 7H), 9.67 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 28.08, 28.65, 32.04, 55.32, 78.59, 119.70, 123.73, 129.16, 139.42, 155.87, 171.44, 174.16. IR ν (cm⁻¹): 3423, 3386, 3329, 3251, 3195, 3132, 3037, 2979, 2931, 2851, 1698, 1659, 1606, 1558, 1510, 1446, 1367, 1251, 1172, 1027, 756.

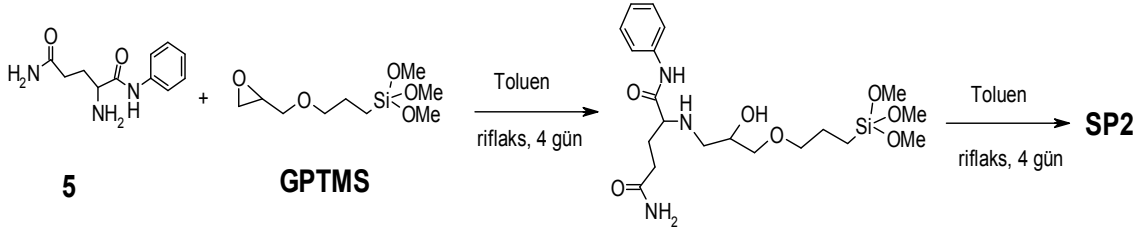
3.3.6. N'-Fenilglutamid'in Sentezi (5)



N-Boc-Amid (4) (1 g, 3.1 mmol) 5 mL diklorometanda çözüldü ve 0°C'de iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine TFA/AcOH (1:1 v:v) (1.2 mL) eklendi. Bir gece oda

şartlarında karıştırıldıktan sonra çözücü uzaklaştırıldı ve kalan kısmın üzerine 1N NaOH (5mL) eklendi. Karışım sırası ile THF (3x20 mL) ve toluen (3x10 mL) ile ekstrakte edildi, organik fazlar birleştirildi, Na₂SO₄ ile kurutuldu, süzüldü ve çözücü uzaklaştırıldı. Beyaz katı N'-Fenilglutamid (**5**) elde edildi. Verim 500 mg olup % 72 olarak kaydedildi. EN: 185-186⁰C. ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm); 2.00-2.55 (m, 7H), 4.02 (m, 1H), 7.05-7.09 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 2H), 7.60-7.63 (m, 2H), 7.89 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm); 25.80, 29.71, 56.88, 119.84, 123.98, 129.22, 139.24, 152.01, 171.75, 178.06. IR ν (cm⁻¹) ; 3326, 3256, 3197, 3139, 3093, 3047, 2929, 2850, 1698, 1662, 1623, 1564, 1498, 1444, 1309, 1244, 1087, 1044, 893, 755, 666.

3.3.7. SP2 Dolgu Maddesinin Sentezi

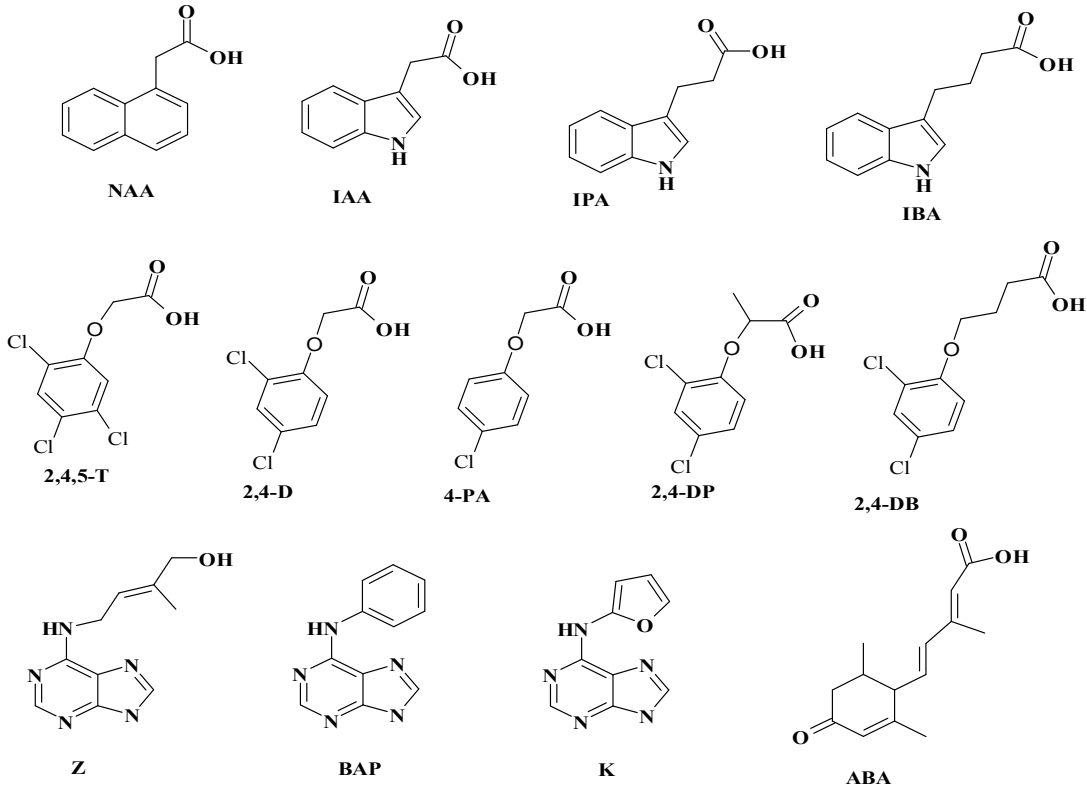


5 mL etanolde çözülmüş **5**'in (500 mg, 2.25 mmol) üzerine 3-glisidiloksipropiltrimetoksisilan (GPTMS) (1 g, 4.2 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı iki gün boyunca karıştırılarak reflaks edildi. Etanol uzaklaştırıldı ve kalan katı kısım GPTMS'nin fazlasını uzaklaştırmak için birkaç kez DCM ve heksan ile yıkandı. Daha sonra toluende (60 mL) çözüldü ve üzerine küresel silika jel (4 g) eklenerek dört gün reflaks edildi. Toluene süzüldü ve amid uyarlanmış silika jel soxhlet ekstraksiyonu ile bir gece kloroformla yıkandı. Daha sonra beyaz katılar yedi saat boyunca vakum altında kurutuldu. Element analizi: C 9.36, H 1.38, N 1.63 (Bu SP2'in 1 gramına 0.39 mmol ligandın karşılık geldiğini ifade eder).

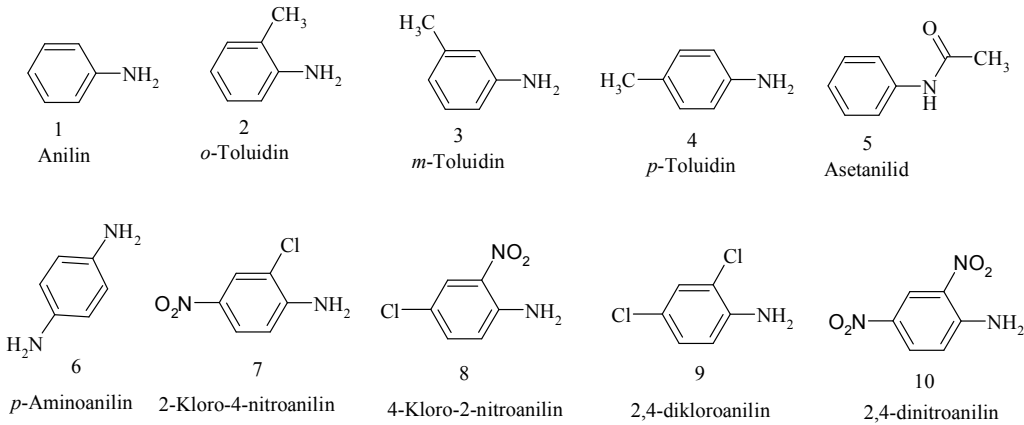
3.4. HPLC Koşulları

Kromatografik çalışmada dört yollu bir pompa, degasser, autosampler, DAD dedektör, termostat kolon bölmesi içeren Agilent 1260 HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) sistemi kullanıldı (Şekil 3.3). Kolon (250-4.6 mm, paslanmaz çelik) slurry (bulamaç) paketleme tekniği kullanılarak yüksek basınç altında modifiye olmuş silika gel ile dolduruldu. Her bir analitin standart çözeltisi (1 mg/mL) asetonitrilde hazırlandı.

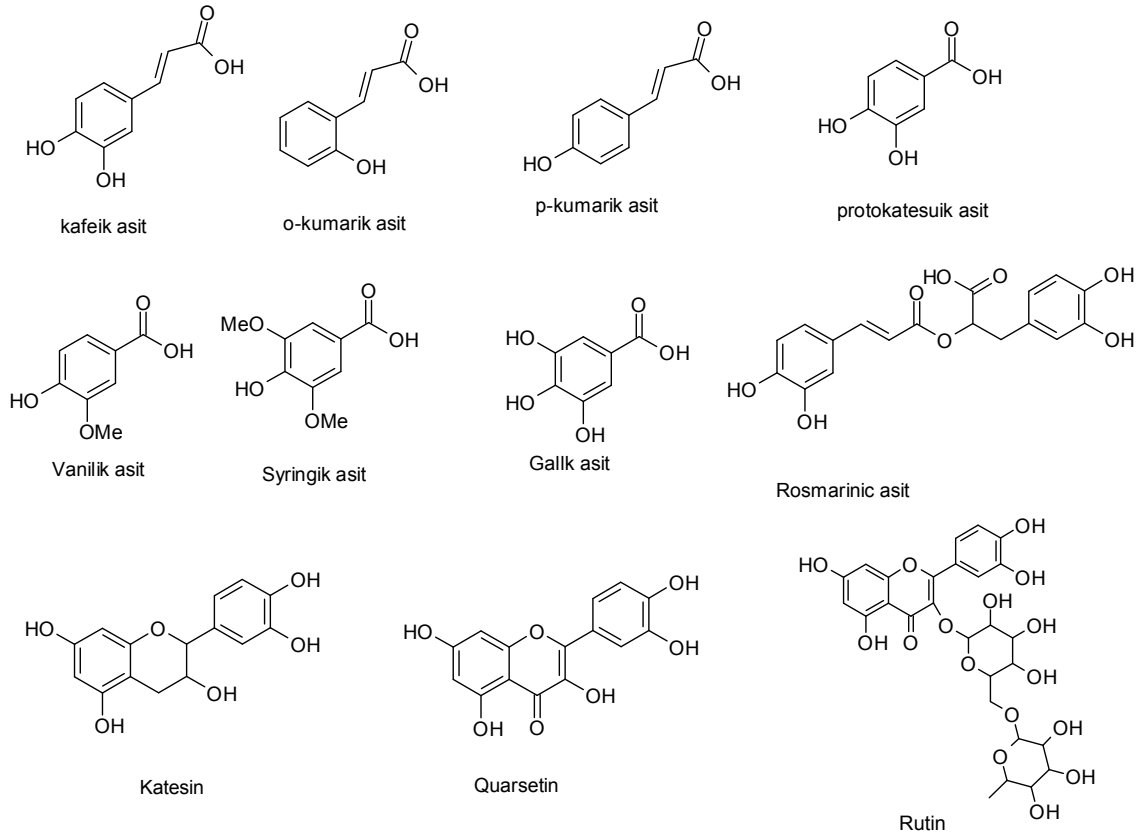
Ancak Kinetin (K) ve N-benzilaminopürin (BAP) analitlerinin standart çözeltisi 30:70 asetonitril: 0.1 N NaOH karışımında hazırlandı. Bütün çözeltiler – 25 °C’de muhafaza edildi. Seyreltmeler her bir analitin son konsantrasyonu 100 ppm olacak şekilde su ile yapıldı. Sudan boya larının ise ortamdaki konsantrasyonları 25 ppm olacak şekilde hazırlandı. Dalga boyları için 230 ve/veya 275 nm seçildi. Bu çalışma kapsamında model bileşikler olarak kullanılan analitler aşağıda verilmektedir (Şekil 3.3-7)



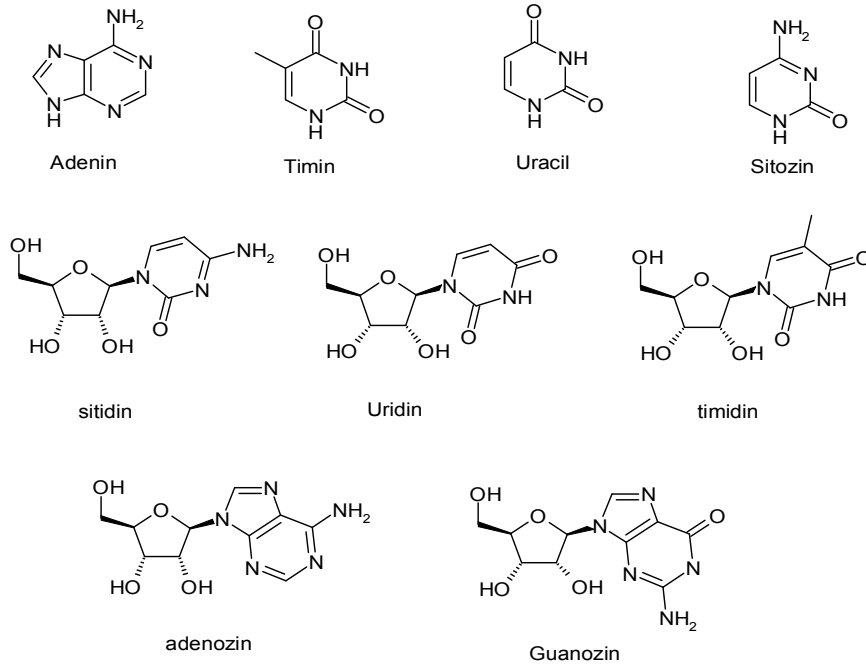
Şekil 3.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri



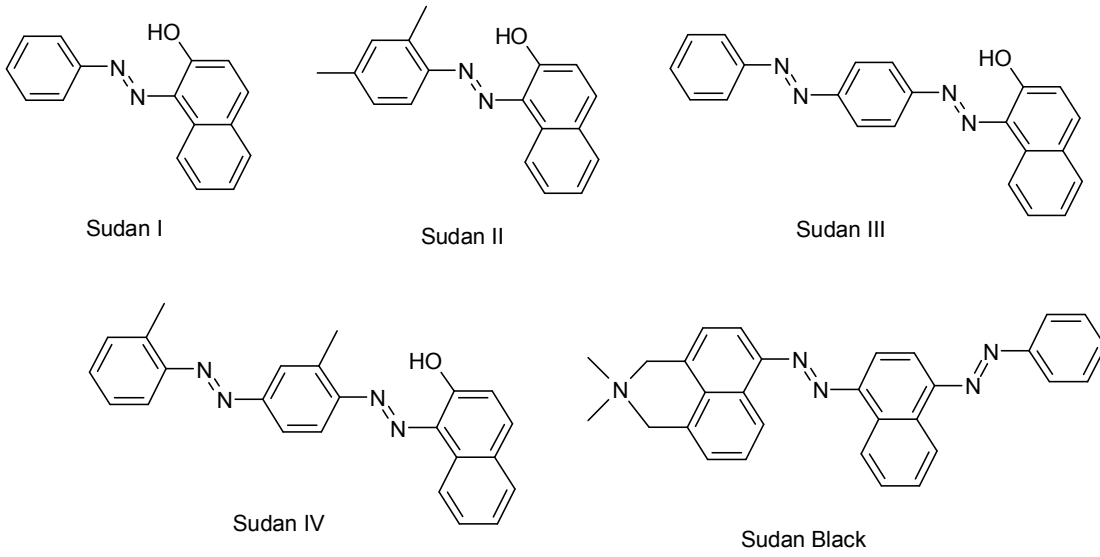
Şekil 3.4. Sübstitüe Anilinler



Şekil 3.5. Fenolik Asitler ve Flavanoidler



Şekil 3.6. Nükleotit ve Nükleozitler



Şekil 3.7. Sudan Boyaları

3.5.1. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

Sulu fazın pH'nın ayarlanması için tampon çözeltiler kullanıldı (asetik asit, fosforik asit, borik asit ve onların potasyum tuzları). pH 2-3 tamponları H_3PO_4 ve KH_2PO_4 'ten, pH 4-5 tamponları asetik asit ve sodyum asetat ve amonyum asettan, pH 6-8 tamponları KH_2PO_4 ve $KHPO_4$ 'den, pH 8.5 tamponu borik asit ve sodyum hidroksit kullanılarak aşağıda verildiği gibi hazırlanmış ve bu çözeltilerin pH'ları pH metreden ölçülerek gerektiğinde asit ve baz ilave edilerek pH'ları ayarlandı.

a) pH 2.5 tamponu

1.36 g KH_2PO_4 ve 0.413 g H_3PO_4 alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

b) pH 3.2 tamponu

1.36 g KH_2PO_4 ve 0.0815 g H_3PO_4 alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

c) pH 4.6 tamponu

0.77g CH_3COONH_4 ve 0.87 g CH_3COOH alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

d) pH 6.85 tamponu

1.14 g KH_2PO_4 ve 0.575 g K_2HPO_4 alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı (pH 7.03, 6.46 ve 6.75 değerleri yukarıdaki çözeltinin pH'sı fosforik asit ve/veya KOH ilave edilerek hazırlandı).

e) pH 8.0 tamponu

0.332 g KH_2PO_4 ve 2.63 g K_2HPO_4 alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

f) pH 8.5 tamponu

0.4 g NaOH ve 3.9 g H_3BO_3 alınıp 500 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın ilk aşamasında iki adet N-boc ile korunmuş amid (**1**, **4**) ve koruma gruplarının kaldırılması ile iki adet amid ligand (**2**, **5**) sentezlendi. Sentezlenen tüm bileşiklerin yapıları yapıları IR, ¹H, ¹³C ve gerektiğinde DEPT 90 ve DEPT 135 spektrumları ile doğrulandı. Bu bileşiklere ait söz konusu spektrumlar ekler bölümünde verilmiştir. Bu bileşiklerin silikaya bağlanması ile SP1 ve SP2 dolgu maddeleri sentezlendi. Sentezlenen dolgu maddelerinin yapıları -IR, SEM ve element analizi ile karakterize edildi.

Kromatografik çalışmalar silika tabanlı amid türevi SP1 ve SP2 dolgu maddeleri ile çeşitli polar analitler kullanılarak yapıldı. Mobil faz içeriği, pH, akış hızı ve sıcaklık gibi parametrelerin model analitlerin ayrılmasına ve alıkonmasına olan etkisi incelendi. Mobil faz olarak genellikle su-asetonitril ya da su-metanol kullanıldı. Bütün kromatografik çalışmalar fosfat ya da amonyum asetat tamponu içeren asetonitril ya da metanol karışımından oluşan mobil faz ile yapıldı. Her bir model analitin ayrılmasında optimum şartları elde edene kadar farklı gradient ve izokratik şartlar denendi.

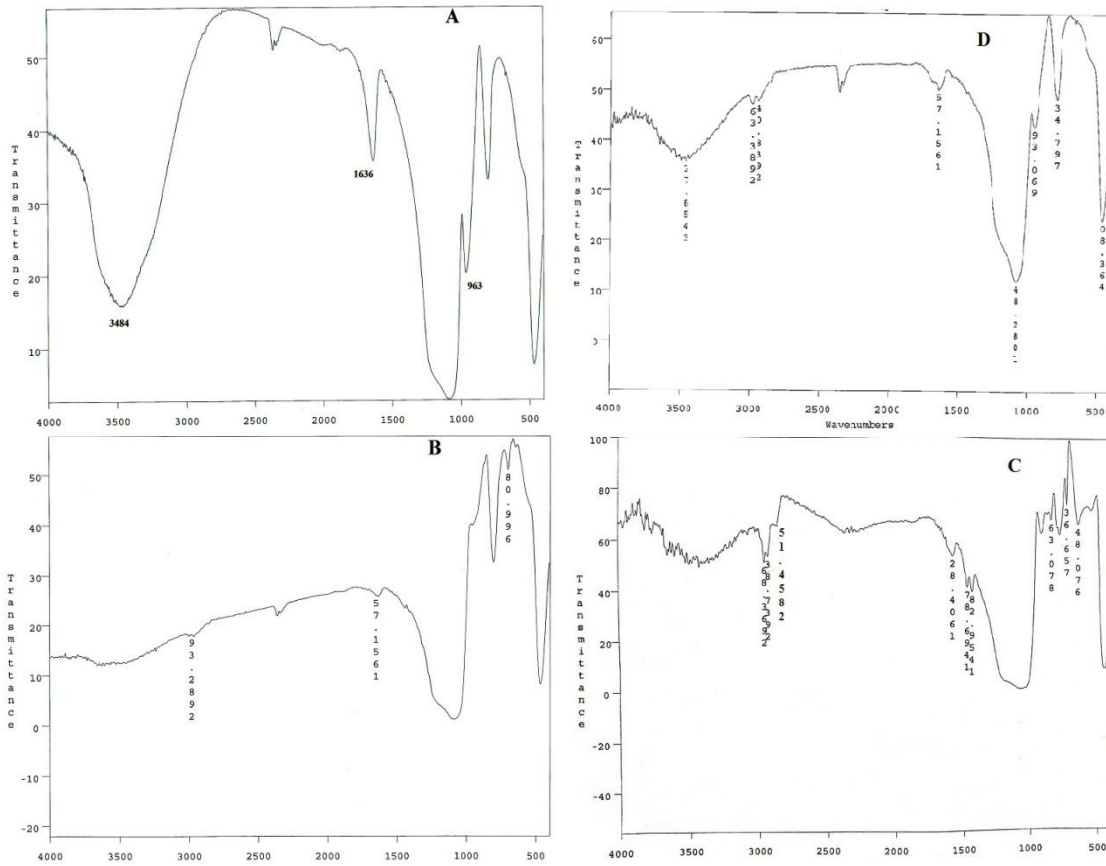
4.1. Dolgu Maddelerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen dolgu maddeleri FT-IR, SEM ve element analizi ile karakterize edildi. Tablo serbest silikanın ve modifiye edilmiş hallerinin element analizi sonuçlarını göstermektedir. Bilindiği gibi, amid ligandın (**2**) kloropropillenmiş silikaya (CP-Si) bağlanması ile SP1 elde edildi. Bu nedenle SP1'in element analizi sonuçlarını CP-Si'nin sonuçlarıyla kıyaslamak gerekir. Tablo 4.1'deki element analizi sonuçlarından mol hesabı yapıldığında CP-Si'deki hemen hemen tüm klorların ligand ile yerdeğiştirdiği anlaşılmaktadır. SP2 dolgu maddesi ise, GPTMS ile etkileştirilen amid ligand **5**'in direk serbest silica gele bağlanması ile elde edildi. Bu nedenle SP2'nin sonuçlarını serbest silica (Si) ile karşılaştırmak gerekir. Sonuçlar 1 g SP1 dolgu maddesinin 0.88 mmol ligand (**2**), 1 g SP2 dolgu maddesinin ise 0.39 mmol ligand (**4**) bağladığı anlaşılmaktadır.

Şekil 4.1. Serbest silika gel (A), CP-Si (B), SP1 (C) ve SP2 (D)'nin IR spektrumlarını göstermektedir. Element analizi için yapılan karşılaştırmanın benzerini bu sefer IR spektrumları için yapacağız.

Tablo 4.1. Dolgu maddelerinin element analizi sonuçları

Yapı	% C	% H	% N
Serbest silika (Si)	0	0.03	0
CP-Si (3)	5.32	1.09	0
SP1	21.45	3.24	2.46
SP2	9.36	1.38	1.63

**Şekil 4.1.** Dolgu maddelerinin IR spektrumları. **A:** Serbest silika, **B:** CP-Si, **C:** SP1, **D:** SP2

A spektrumu 3484 cm^{-1} de güçlü bir silanol (Si-OH) bandını göstermektedir. Bu band **B** spektrumunda neredeyse kaybolmuştur. Ayrıca **A** spektrumundaki at 1636 ve 963 cm^{-1} bandları da **B** spektrumunda çok çok küçülmüş ve C-H gerilmeleri (CH_2 , CH) gösteren $2990\text{-}2980\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni bandlar ortaya çıkmıştır. Bu da silikanın CPTMS ile modifikasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. **B** ile **C** spektrumlarını kıyasladığımızda; **C** spektrumunda C-H gerilme banlarının güçlendiği ve çok sayıda

yeni bandın ortaya çıktığı görülmektedir. Bu da kloropropil silikanın ligand ile başarılı modifiye olduğunu göstermektedir. SP2'nin karakterizasyonu için D spektrumunu A ile kıyasladığımızda; yine Si-OH bandının küçüldüğü ancak kaybolmadığı görülmektedir. Çünkü GPTMS'deki epoksit halkasının açılması ile C-OH fonksiyonel grubu oluşmaktadır. Bu da 3456 cm^{-1} 'deki bandın hem C-OH'a hem de ligand ile bloke olmayan Si-OH piklerine ait olduğunu gösterir. Yine, A spektrumundaki 1636 cm^{-1} 'deki bandın B spektrumunda kaybolduğu, 963 cm^{-1} 'deki bandın ise çok küçüldüğü ve 2983 cm^{-1} , 2938 cm^{-1} ve 1650 cm^{-1} civarında yeni bantların oluştuğu görülmektedir. Bu sonuçlar SP2 nin de başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

Modifikasyon sonucu küresel yapıdaki silika jelin partikül şekli ve boyutunda değişimler olabilmektedir. Bu nedenle, dolgu maddelerinin partikül boyutu ve şeklini incelemek için dolgu maddelerine ait SEM spektrumları alındı. Serbest silika, CP-Si, SP1 ve SP2'nin SEM spektrumları ekler bölümünde verilmiştir. Serbest silika ile dolgu maddelerinin SEM spektrumları kıyaslandığında, modifikasyon sonucu bazı partiküllerin kırıldığı bazılarının da birleştiği görülmektedir. Bu beklenen bir durumdur. Ancak silikanın küresel yapısının ve parçacık boyutunun çok büyük oranda korunduğu anlaşılmaktadır.

4.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması

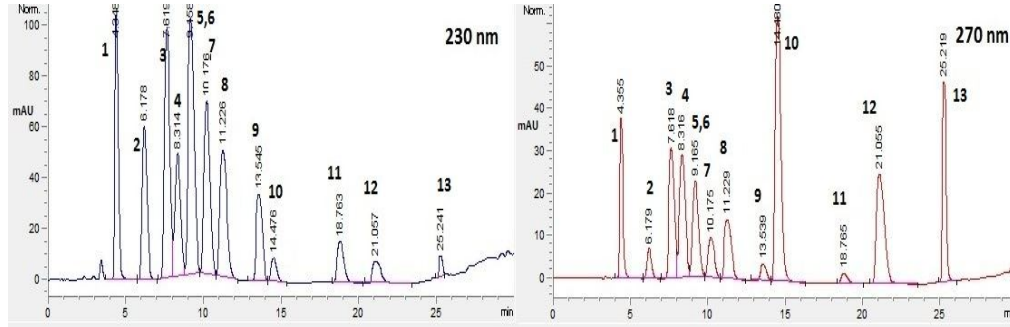
Bitki büyüme düzenleyicilerinin çok düşük miktarı bitki gelişiminin farklı evrelerinde hücre bölünmesi, büyüme ve farklılaşma, organ oluşumu, tohum ve çimlenme, lif ve organ gelişimi gibi birçok önemli fizyolojik işlevi yerine getirir. 1926'da auxin olan ilk bitki büyüme düzenleyicisinin keşfinden beri, bilim adamları temel olarak auxin, sitokinin, absisik asit, gibberellin ve etilen içeren birçok bitki büyüme düzenleyicisi keşfettiler. Auxinlere benzer aktiviteye sahip klorlu fenoksiasetik asitler herbisit (2,4-D, 2,4-DP, 2,4-DB, 2,4,5-T ve 4-PA) olarak bilinir. Herbisitler sudaki çözünürlüklerinden dolayı doğal kaynak sularını ve çevreyi kirletirler (Cserhati ve Forgacs 1998), (Song ve Budde 1998).

HPLC bu polar bitki büyüme düzenleyicilerinin analizi için en geniş çapta kullanılan tekniktir (Wurst ve ark. 1980), (Gupta ve ark. 2011). LC-MS ile auxin (Sitbon ve ark. 1993), (Chmarro ve ark. 2001) ve absisik asitin (Gomez-Cadenas ve ark. 2002), (Zhou ve ark. 2003) RP-C18 kolon ile analizi yapılmıştır. Bununla beraber,

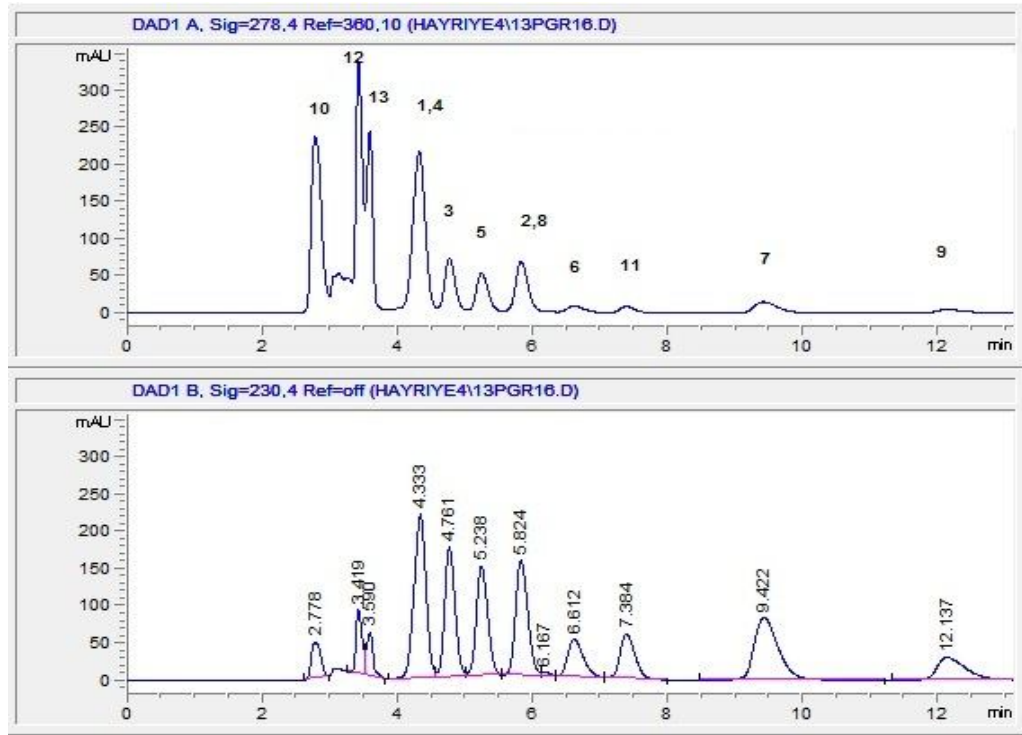
auxinler, sitokininler ve absisik asit çok farklı bitki fizyolojik fonksiyonuna ve farklı kimyasal özelliklere sahiptir. Bundan dolayı, farklı sınıf bitki büyüme düzenleyicilerinin HPLC ayırımı için ayırma metodları ve dolgu fazları geliştirmek son derece öneme sahiptir. Literatür bilgimize dayanarak, farklı sınıf bitki büyüme düzenleyicisinin ayrılması ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır (Dobrev ve Kamınek 2002), (Chiwocha ve ark. 2003), (Kelen ve ark. 2004), (Dobrev ve ark. 2005). Son birkaç yılda, Ma ve çalışma arkadaşları (2008) RP-C18 kolon kullanarak LC-MS ile dört grup bitki büyüme düzenleyicisinin ayırımını çalışmıştır. Yazarlar bu makalenin dört grup bitki büyüme düzenleyicisinin ayırımının ilk kez başarıldığını ifade etmiştir. Bu çalışmada, sekiz tane bitki büyüme düzenleyicisi 50 dakikalık analiz süresinde ayrılmıştır. Diğer birçok çalışmalarda, RPLC bitki büyüme düzenleyicilerinin ayırımı ve analizi için kullanılmıştır. Literatür bilgimize göre, farklı sınıf on iki tane bitki büyüme düzenleyicisinin HPLC ile ayırımını içeren herhangi bir makaleye rastlayamadık.

Bu çalışmada çeşitli gradient elüsyon şartları denenerek SP1 dolgu maddesi ile on iki SP2 dolgu maddesi ile on bir bitki büyüme düzenleyicisinin HPLC ayırımı yapıldı. En iyi ayırma SP1 dolgu maddesi ile pH= 6.85, 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ tampon sistemi ve asetonitrilden oluşan mobil faz ile gradient elüsyon şartlarında 22 °C'de elde edildi (Şekil 4.2). SP2 dolgu maddesi ile pH=2.5, 10 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ tampon sistemi ve asetonitrilden oluşan mobil faz ile gradient elüsyon şartlarında 20 °C'de elde edildi (Şekil 4.3). Şekil 4.2'de görüldüğü gibi SP1 ile on iki tane bitki büyüme düzenleyicisi optimum şartlarda 26 dakikada ayrılırken SP2 ile her ne kadar on bir tane bitki büyüme düzenleyicisi ayrılabilse de bu süre 12 dakika gibi çok kısa bir süreye inmiştir. SP1 dolgu maddesi yapısındaki apolar fenil alanin ve siklohegzil halkaları ile amid embedded grubu içeren polar-embedded bir dolgu fazıdır (Şekil 5.1). SP2 dolgu maddesi ise yapısında apolar benzen halkası ile polar hidroksil grupları içeren bir dolgu fazı olup oldukça polar özellik taşır (Şekil 5.2). Bitki büyüme düzenleyicileri orta polarlıkta olup apolar özelliği daha baskın olan analitlerdir ve bundan dolayı muhtemelen SP1 dolgu maddesi ile daha güçlü hidrofobik etkileşim yapacaklarından alıkonmaları daha fazladır. SP2 dolgu maddesi ise daha çok polar gruplar içerdiğinden dolayı bu analitler ile etkileşimi daha zayıf olacağından alıkonma süresi daha az olur.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin ayrıntılı optimizasyon çalışmaları için SP1 dolgu maddesi kullanıldı. SP2 de bu analit grubuna karşı benzer özellik göstermesinden dolayı ayrıntılı optimizasyon şartları bu dolgu maddesi için verilmeye gerek duyulmamıştır.



Şekil 4.2. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması. Gradient Elüsyon: % ACN / Fosfat Tamponu (pH: 6.85, 20 mM), 0-20 dk; % 10-25, 20-30 dk; % 25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230-270 nm.



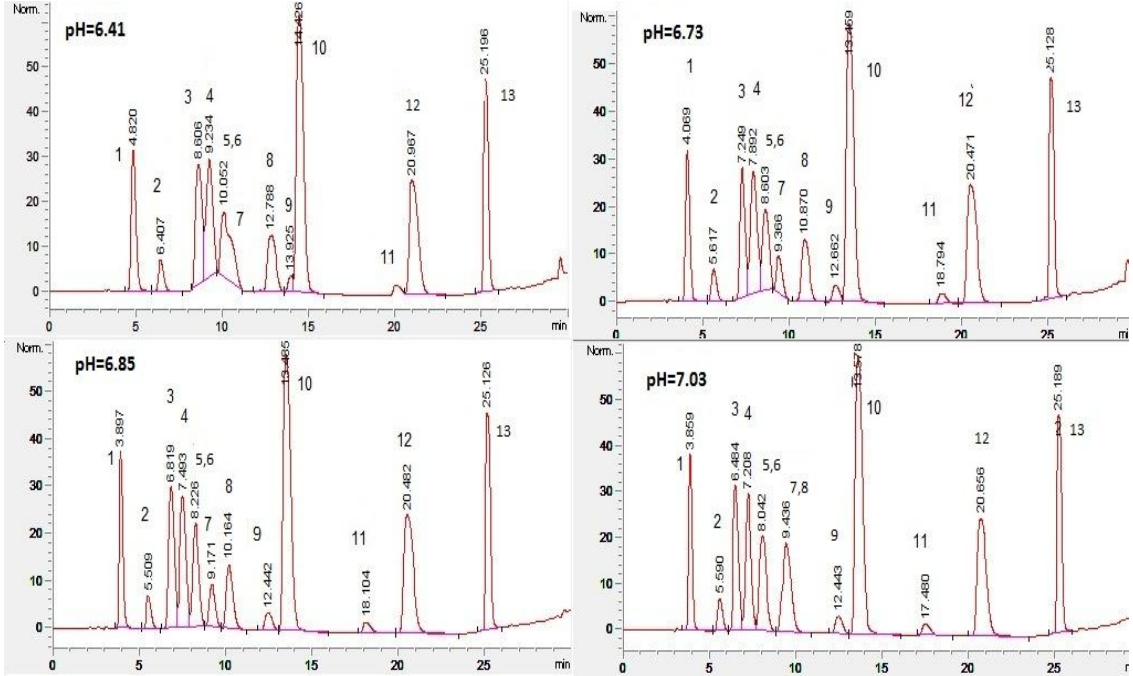
Şekil 4.3. SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılması. Gradient Elüsyon: % ACN / Fosfat Tamponu (pH: 2.5, 10 mM), 0-30 dk; % 10-30. Akış hızı: 1mL/dk. Sıcaklık: 20 °C. Enjeksiyon Hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230-278 nm.

4.2.1. Ayırma Üzerine pH'nın Etkisi

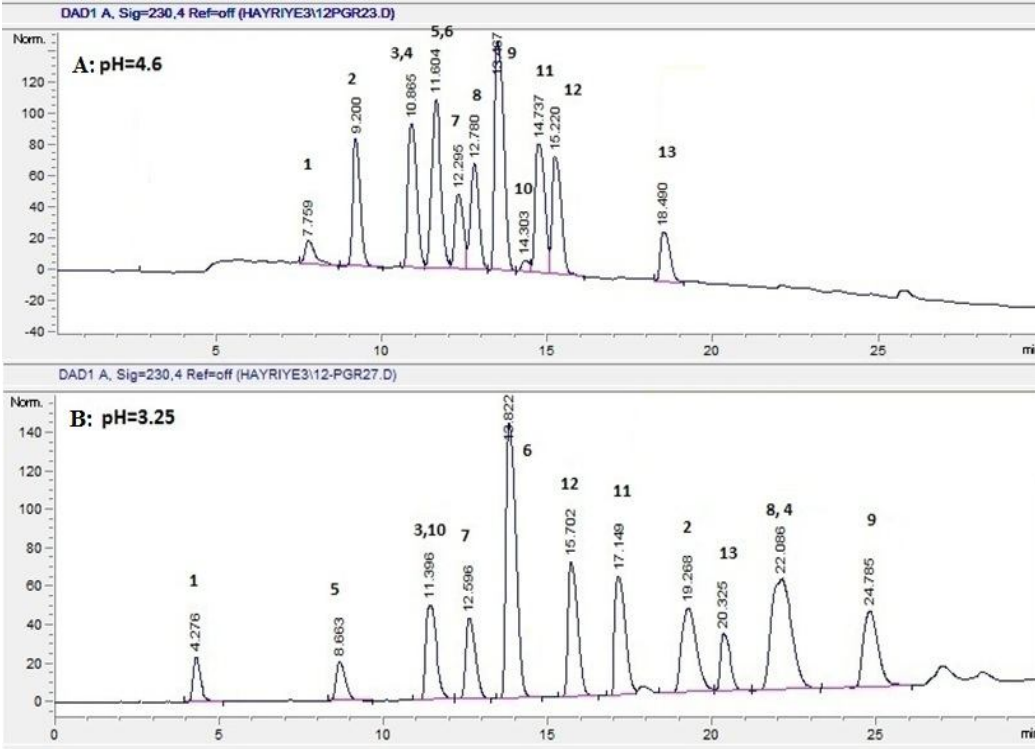
Ortamanın pH'sı mobil fazdaki analitlerin iyonlaşmasını etkileyeceğinden ters-faz kromatografisinde alıkonma ve selektivitede çok güçlü bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak ters-faz sıvı kromatografik ayırmada pH'nın ayırmaya olan etkisi incelendi. pH 6-7 (6.42, 6.73, 6.85 ve 7.03) aralığında tampon çözeltiler hazırlanırken $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'tan 20 mM pH= 6.73 olan bir tampon çözelti hazırlandı ve daha sonra istenilen pH'ya ulaşmak için ortama asit ve/veya baz ilave edildi. pH=3.12, 10 mM olan bir tampon çözelti $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'tan hazırlandı. pH=4.6, 10 mM olan bir tampon çözelti $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 'tan hazırlandı. Şekil 4.4 ve 4.5'te asitliğin fonksiyonu olarak alıkonma süreleri ve ayırma etkisi kıyaslanmaktadır. Görüldüğü gibi mobil fazın asitliği arttığında bazik analit olan BAP, Z ve K'nin alıkonma süresi azalmakta fakat asidik analitlerin alıkonma süresi artmaktadır. Özellikle klorlu asitler pH'nın düşmesiyle (asitliğin artmasıyla) amid dolgu fazı üzerinde çok iyi alıkonulmaktadır. Bütün klorlu asitler pH= 3.25'te kolonu en geç terk eden ve pH= 7.03'te kolonu oldukça erken terk eden analitlerdir. Ayrıca, pH düştüğünde kolonun klorlu asitleri ayırma etkisi düşmektedir. Klorlu asitler için etkili ayırma pH=4.6'da elde edilmiştir. Bununla beraber, alıkonma süresi düşmesine rağmen kolonun sitokininler olarak bilinen BAP, Z ve K bazik analitlerini ayırma etkisi asitliğin artmasıyla değişmemektedir. Silika tabanlı amid dolgu fazları bu bazik analitlere karşı büyük bir selektivite gösterir. İndol türevi asitler (IAA, IPA, IBA) hem asidik hem de bazik gruplar içerdiklerinden kolonu pH'ya bağlı olarak klorlu asitler ve sitokininler arasında bir yerde terk eder. pH değeri bu çalışmada kullanılan asidik ve asidik-bazik analit karışımlarının ayrılmasında önemli bir etkiye sahiptir.

Polarite ve farklı analit sınıflarının kolonu terk etme sırası arasındaki ilişki pH'ya önemli ölçüde bağlıdır. Aynı sınıf içerisinde polar olmayan analitler genellikle kolonu daha geç terk etse de, farklı sınıflar arasında kolonu terk etme sırası daha komplekstir. Örneğin, aynı sınıfta yer alan IAA, IBA ve IPA'nın alıkonma süresi IBA>IPA>IAA şeklindedir. Benzer şekilde, bazik analit olan sitokininlerin kolonu terk etme sırası BAP>K>Z şeklindedir. Her iki durumda da, üç bileşik de aynı polar gruplar fakat farklı apolar gruplar içerir. Bundan dolayı daha apolar bileşik kolonu daha geç terk eder. Şöyle ki; daha apolar analitlerin sudaki çözünürlüğü zordur ve hem fenil ve hem de sikloheksil grubu içeren bir dolgu maddesi (SP1) ile daha güçlü bir şekilde etkileşir.

Bununla beraber, farklı analit sınıftaki bileşikler (farklı tür ve sayıda polar ve apolar gruplar içeren bileşikler) doğru bir şekilde kıyaslanamaz. Çünkü analitler hem mobil faz ve hem de dolgu fazı ile etkileşir. Dolgu fazındaki asidik amid, bazik amin grubu, aromatik ve alifatik halkalar farklı polar ve apolar gruplar içeren farklı sınıftaki analitlerle iyi bir etkileşime neden olur. Bununla beraber, en polar gruplara sahip sitokininler pH= 6-7 arasında kolonda daha uzun süre tutunur. Bazı klorlu asitler (2,4-D, 4-PA, 2,4-DP) pH= 6-7 arasında kolonu erken terk etse de pH= 3.2’de kolonu çok geç terk eder. Diğer bütün analitlerin kolonu terk etme süresi pH ile değişmiştir.



Şekil 4.4. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. Gradient elüsyon: % ACN/ Tampon (pH=6.41-7.03, 20 mM fosfat tamponu), 0-20 dk; % 10-25, 20-30 dk; % 25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230 nm.



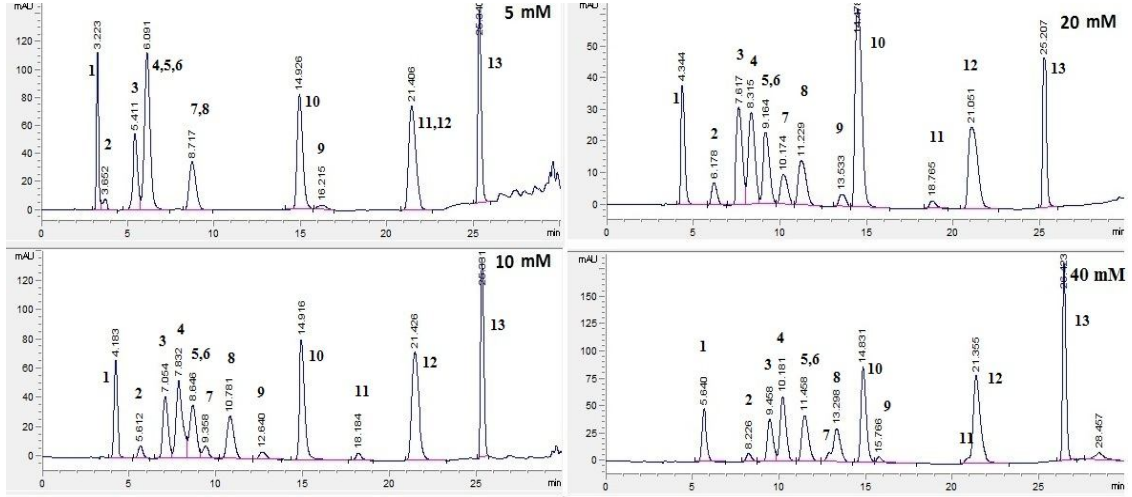
Şekil 4.5. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. A; gradient elüsyon: (pH= 4.6, 10 mM amonyum asetat tamponu), 0-20 dk; % 10-25, B; gradient elüsyon: (pH= 3.25, 10 mM fosfat tamponu), 0-20 dk; % 20-70. Akış hızı:1 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13:BAP, dalga boyu: 230 nm.

4.2.2. Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi: Tampon Derişimi ve ACN oranı

Alkoller, THF ve ACN gibi farklı organik çözücüler RPLC ve HILIC ayırmalarında mobil faz karışımlarında kullanılsa da en iyi sonuçlar asetonitril ile elde edilmiştir (Ascah ve ark. 1996). Aslında, bu çalışmada kullanılan mobil faz genellikle su ve ACN karışımını içermektedir. Bütün kromatografik çalışmalar potasyum fosfat ve amonyum asetat tamponlarını içeren sulu mobil faz ve asetonitrile karşı gradient elüsyon kullanılarak yapıldı.

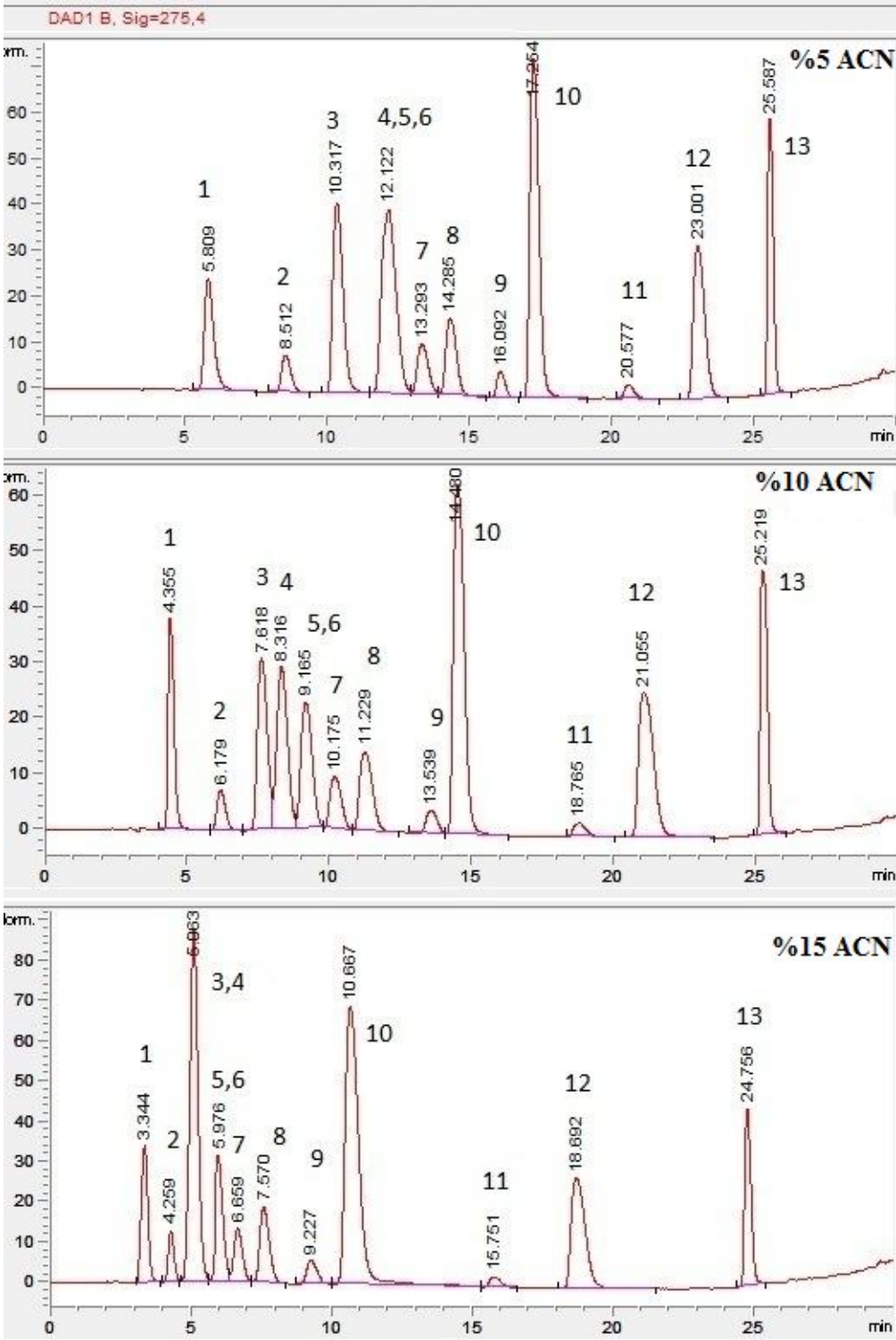
Alıkonmaya tampon konsantrasyonunun etkisi optimum pH=6.85'te 0.5, 10, 20 ve 40 mM fosfat tamponu kullanılarak çalışıldı (Şekil 4.6). En iyi ayırma 20 mM tampon konsantrasyonunda elde edildi. Tamponun kullanılmadığı mobil faz olarak su/asetonitril kullanıldığı durumda iyi bir ayırma görülmedi. Uzun analiz süresi, zayıf pik keskinliği ve düşük selektivite gözlemlendi. 5 mM tampon kullanıldığında ise ayırmanın ve spektrum görüntüsünün düzeldiği görüldü. 0-10 dakika arasında kolonu terk eden asidik analitlerin ayırma selektivitesi tampon konsantrasyonunun artmasıyla daha iyiye gittiği görülmüştür. Bazik analitler olan BAP, Z ve K hariç diğer tüm analitler, özellikle klorlu

asitler tampon derişiminden yüksek oranda etkilenmiştir. Tampon derişimi arttıkça asidik analitlerin alıkonma zamanları da artmaktadır. pH'nın düşmesiyle asidik analitler kolonu daha geç terk etmiştir. 5-20 mM tampon konsantrasyonunda ayrılan pikler tampon konsantrasyonunun 40 mM olmasıyla iç içe girmiştir. Böylece en iyi ayırma 20 mM tampon derişiminde elde edildi.



Şekil 4.6. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Tampon Derişiminin Etkisi. Optimum koşullar (Şekil 4.2). Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 230 nm.

Hareketli fazdaki ACN oranının ayırmaya etkisini incelemek için gradient elüsyondaki asetonitril başlangıç derişimi % 5-90, % 10-90, % 15-90 oranlarında 40 dakika içerisinde değiştirilerek incelendi (Şekil 4.7). % 5 ve % 15 ACN oranı ile başlandığında on bir analit ayrılabilirken, % 10 ACN oranı ile başlandığında on iki analit ayrılabilmiştir. Bununla beraber, artan ACN oranı analiz süresinin kısalmasına yol açtığı görülmektedir. Bu tipik bir ters-faz kolon davranışıdır. Ancak, analitlerin polaritelerine göre alıkonma zamanları kıyaslandığında ise tamamen ters-faz ile aynı özellik göstermediği anlaşılmaktadır. Bu durum yukarıdaki başlık altında ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Kısacası, dolgu maddesi ağırlıklı olarak ters-faz özellik göstermesine karşın yapıdaki polar grupların etkisi zaman zaman ters-faz davranışının dışına çıkmasına neden olduğu da görülmektedir.

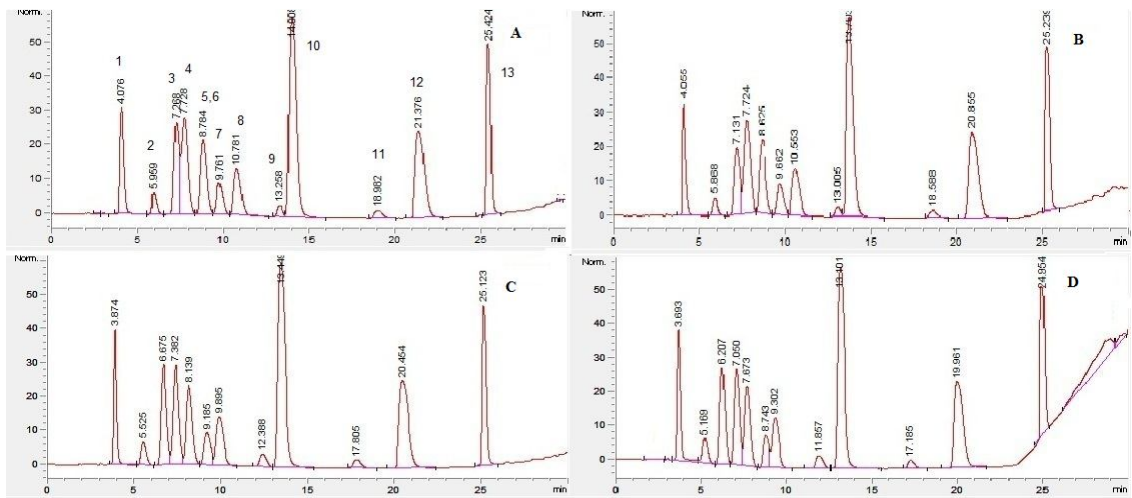


Şekil 4.7. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Asetonitril Derişiminin Etkisi. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH: 6.85, 20 mM): 0-20 dk; % X-25, 20-30 dk; % 25-90. Akış hızı: 0-13 dk; 0.9 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk. Sıcaklık: 22 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL, Analitler: 1: IAA, 2: 4-PA, 3: IPA, 4: ABA, 5: IBA, 6: 2,4-D, 7: 2,4-DP, 8: NAA, 9: 2,4,5-T, 10: Z, 11: 2,4-DB, 12: K, 13: BAP, dalga boyu: 275 nm

4.2.3. Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kolon sıcaklığı analitlerin alıkonmasını etkileyen önemli bir parametredir. Çoğu zaman, kolon sıcaklığındaki artış analiz süresini kısaltır. Çünkü sıcaklığın artmasıyla analitlerin mobil fazdaki çözünürlüğü artar ve dolgu fazı ile etkileşimi azalır ve bundan dolayı alıkonma süresi kısalır (Li ve Carr 1997). Kolon sıcaklığının bir fonksiyonu olarak selektivitedeki bu değişim mobil fazın bileşimi kadar hem analitin ve hem de dolgu fazının fonksiyonel gruplarına bağlıdır (Li ve Carr 1997), (Mao ve Carr 2001), (Hao ve ark. 2008). Ters-faz HPLC’de yüksek sıcaklıkların analitlerin alıkonmasını azalttığı ve mobil fazı daha hidrofobik yaptığı geniş çapta kabul edilen bir düşüncedir (Chen ve Horvath 1997). Bu teoriye dayanarak, aslında bu durumun HILIC’ta olması gerekirdi: hidrofilik analitlerin alıkonması mobil fazın etkisinin azalmasından dolayı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak artmalıdır. HILIC’ta asetonitril ağırlıklı mobil faz kullanıldığı için sıcaklığın artmasıyla asetonitrilin iyonlaşması artacağından oluşan iyonların büyük bir kısmı su fazına geçecek ve mobil fazda hidrofilik kısım artacağından dolayı analitlerin alıkonması artar. Bununla beraber, alıkonmanın sıcaklığın artmasıyla beraber hem artması ve hem de azalması literatürde mevcuttur. Bundan dolayı, bu bulgular hem analitin hem de dolgu fazının doğasının ve ikisinin ortak etkisinin toplam alıkonmayı etkilediğini kanıtlamıştır (Kucera ve ark. 2011).

Bu çalışmada, optimum şartlar altında 10-30 °C arasında değişen kolon sıcaklıklarında sıcaklığın alıkonma ve ayırmaya olan etkisi çalışıldı (Şekil 4.8).

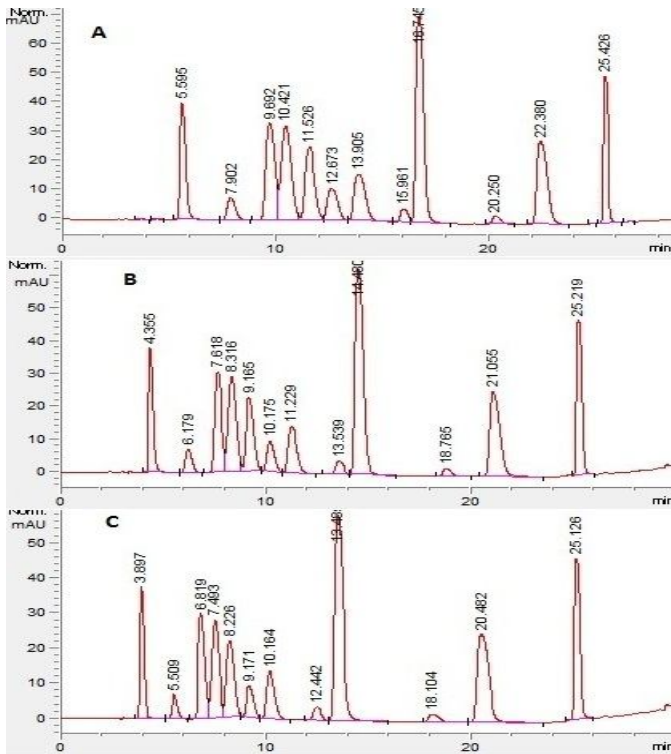


Şekil 4.8. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Sıcaklığın Etkisi. A: 15°C, B: 20°C, C: 22°C, D: 25°C, Optimum şartlar (Şekil 4.2), dalga boyu: 230 nm.

Şekil 4.8 15, 20, 22 ve 25 °C'de sıcaklığın ayırmaya olan etkisini göstermektedir. 10 ve 30 °C de çalışıldı ancak burada gösterilmedi. Bütün analitlerin alıkonması sıcaklığın artmasıyla beraber düşmüştür. Bununla beraber, sıcaklığın artması selektiviteyi etkileyerek alıkonma süresini değiştirmiştir. Sıcaklık 10 °C'den 22 °C'ye çıkartıldığında 4 ve 5 arasındaki selektivite artarken 7 ile 8 arasındaki selektivite azalmıştır. Sıcaklık 25 °C'ye çıkarıldığında 7 ile 8 iç içe geçmiştir. Bundan dolayı, en iyi sıcaklık 22 °C olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Ayırma Üzerine Akış Hızı Etkisi

En iyi ayırımı elde etmek için analizin ilk 20 dakikasında 0.7, 0.9 ve 1 mL/dk akış hızlarında çalışıldı. 20-30 dakika arasında 1.2 mL/dk sabit akış hızında çalışıldı (Şekil 4.9). Şekil'de görüldüğü gibi akış hızındaki değişiklik selektiviteyi küçük bir oranda etkilemektedir. Bununla beraber, 0-20 dakika arasında 0.7 mL/dk akış hızı ile kıyaslandığında daha iyi bir pik keskinliği elde edilmesinden dolayı 0.9 mL/dk akış hızı çalışılmıştır.



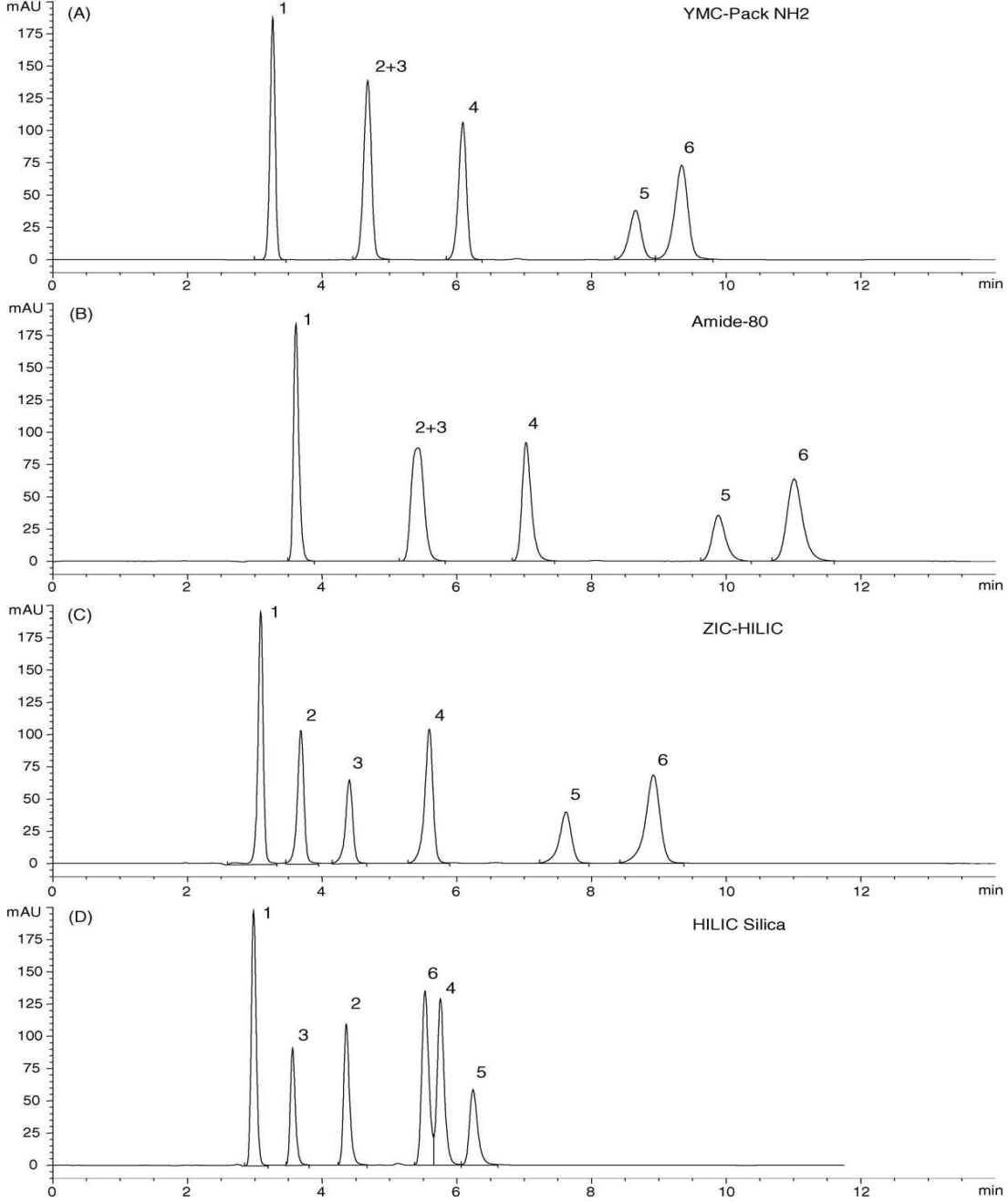
Şekil 4.9. SP1 Dolgu Maddesi ile Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ayrılmasına Akış Hızı Etkisi. Akış hızı: 0-13 dk; 1.2 mL/dk, 13-30 dk; 1.2 mL/dk- A: 0.7, B: 0.9, C: 1 mL/min. Optimum şartlar (Şekil 4.2), dalga boyu: 230 nm.

4.3. Nükleotit ve Nükleozitlerin Ayrılması

Küçük polar bileşikler geleneksel ters-faz kolonlarda alıkonulamadıklarından bunların ayırımını sağlayacak metod geliştirmek çok önemlidir. Polar bileşiklerin ayrılmasında çok etkili olsa da normal faz sıvı kromatografisi metodları yeniden üretilebilirliklerinin zayıf olmasından dolayı genellikle tercih edilmez. Polar embedded ya da polar end-capped dolgu fazları yüksek oranda sulu hareketli faz ile polar bileşiklerin alıkonmasını arttırabilir, fakat bu yaklaşım sudaki çözünürlüğü düşük olan bileşikler için olası değildir (Guo ve Gaiki 2005). Hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) polar dolgu fazı üzerinde küçük polar bileşiklerin etkili ayrımı için alternatif bir yaklaşım sunar (Alpert 1990). Son uygulamalar ilaçlar, toksik bileşikler, bitki ekstraktları, nükleotid ve nükleozidler ve daha birçok küçük polar bileşikler için alan geniş bir alana sahiptir (Grumbach ve ark. 2003), (Tolstikov ve Fiehn 2002), (Garbis ve ark. 2001), (Strege 1999), (Strege 1998), (Li ve Huang 2004), (Kimura ve ark. 2004), (McClintic ve ark. 2003), (Olsen 2001), (Dallet ve ark. 2000), (Strege ve ark. 2000), (Oertel ve ark. 2004), (Dell'Aversan ve ark. 2004), (Schlichtherle-Cerny ve ark. 2003). Guo ve Gaiki (2005) tarafından yapılan bir çalışmada HILIC özellik gösteren piyasada mevcut en çok kullanılan dört tane HILIC kolon ile bazı nükleotit ve nükleozitlerin ayrımı çalışılmıştır. Bu çalışmada altı tane analitin ayrılmasında kolonların etkinliği kıyaslanmıştır. Bununla ilgili kromatogramlar şekil 4.10'da görülmektedir. Buna göre SP2 dolgu maddesi ile nükleozid ve nükleotidlerin ayrımını bu çalışmadaki kolonlarla kıyasladığımızda, SP2'nin piyasadaki bu en etkili HILIC kolonlarla yarışacak etkinliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada SP1 dolgu maddesi ile üç tane nükleotit (Timin, Adenin, Sitozin) ve üç tane nükleozit (Timidin, Sitidin ve Adenozin), SP2 dolgu maddesi ile dört tane nükleotit (Timin, Adenin, Urasil, Sitozin) ve beş tane nükleozit (Timidin, Sitidin, Üridin, Guanozin, Adenozin) başarı ile birbirinden ayrıldı. SP1 dolgu maddesi ile nükleotitler için en iyi ayırma pH= 8.04, 10 mM fosfat tamponu ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile izokratik elüsyon şartlarında, 0.5 mL/dk akış hızı, 15 °C sıcaklık, 5 µL/100 ppm enjeksiyon hacmi ve 275 nm dalga boyunda elde edildi (Şekil 4.11). SP1 dolgu maddesi ile nükleozitler için en iyi ayırma pH= 8.5, 10 mM borat tamponu ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile izokratik elüsyon şartlarında, 0.8 mL/dk akış hızı,

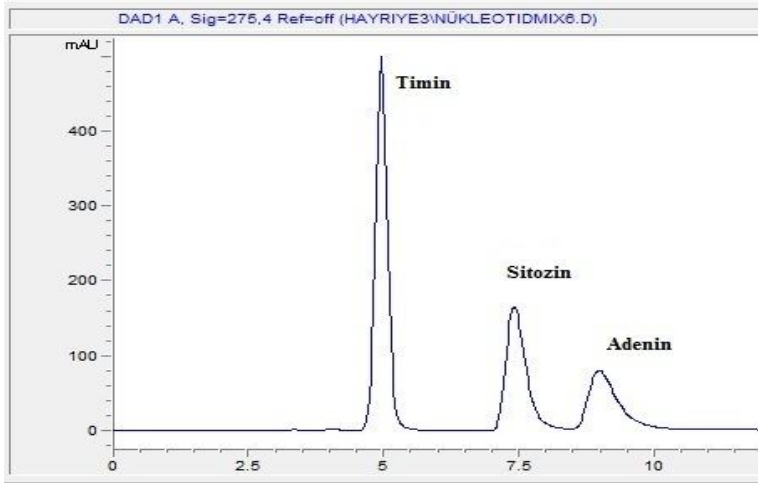
20 °C sıcaklık, 5 µL/100 ppm enjeksiyon hacmi ve 275 nm dalga boyunda elde edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.10. Çeşitli HILIC Kolonlar ile Nükleotit ve Nükleozitlerin Ayrılması: (A) YMC-Pack NH₂, (B) TSKgel Amide-80, (C) ZIC-HILIC ve (D) HILIC silika kolon. Hareketli Faz: ACN/Tampon (10 mM Amonyum asetat) (85/15), sıcaklık: 30 °C, Akış hızı: 1.5 mL/dk, dalga boyu: 248 nm. (1) urasil, (2) adenozin, (3) üridin, (4) sitozin, (5) sitidin, (6) guanozin (Guo ve Gaiki 2005).

SP2 dolgu maddesi ile nükleotitler için en iyi ayırma su-asetonitril içeren hareketli faz ile izokratik elüsyon şartlarında, 0.7 mL/dk akış hızı, 20 °C sıcaklık, 5 µL/100 ppm enjeksiyon hacmi ve 265-275 nm dalga boyunda, nükleozitler için en iyi ayırma pH 3.25, 10 mM fosfat tamponu ve asetonitril içeren hareketli faz ile izokratik elüsyon şartlarında 0.7 mL/dk akış hızı, 20⁰C sıcaklık, 5µL enjeksiyon hacmi ve 265 nm dalga boyunda elde edildi (Şekil 4.13 ve 4.14). SP2 ile bu analitlerin ayrımı daha iyi olduğundan SP1 ile bunların ayrıntılı optimizasyonu burada belirtilmedi.

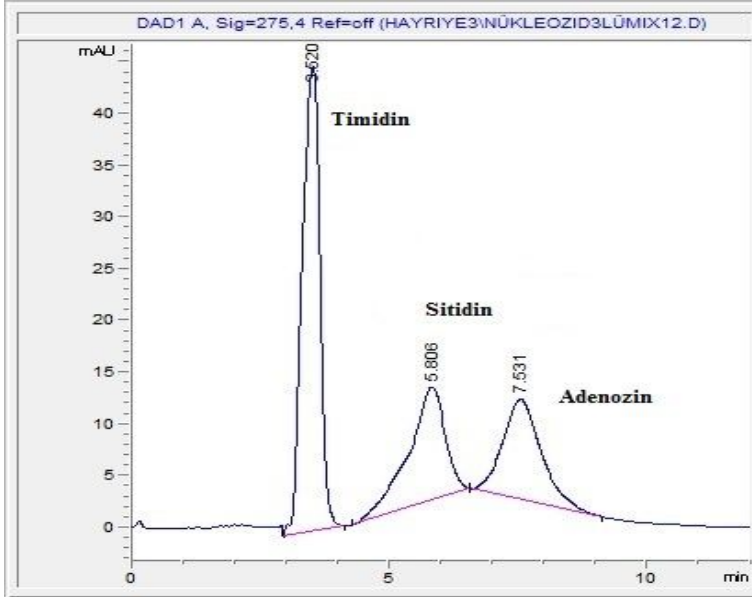
SP1 dolgu maddesi yapısındaki apolar fenil ve siklohekzil halkalarının yanı sıra amid grubu içeren polar gömülü özelliği olan bir dolgu maddesidir. Apolar ve orta polarlıktaki analitlerin ayrımında tipik bir ters-faz özelliği göstermesinin yanı sıra nükleotit ve nükleozitlere karşı kısmen HILIC özelliği göstermiştir. Bu analitler polar yapıda olmalarından dolayı sudaki çözünürlükleri çok yüksektir. Su ağırlıklı çözücü kullanıldığında analitlerin kolonu çok çabuk terk ettiği görüldü. Bu nedenle asetonitril ağırlıklı yüksek pH'lı sulu tampon kullanılarak analiz süresinin uzaması ve böylece analitlerin dolgu maddesi ile daha fazla etkileşimi için ortam sağlanmış oldu.



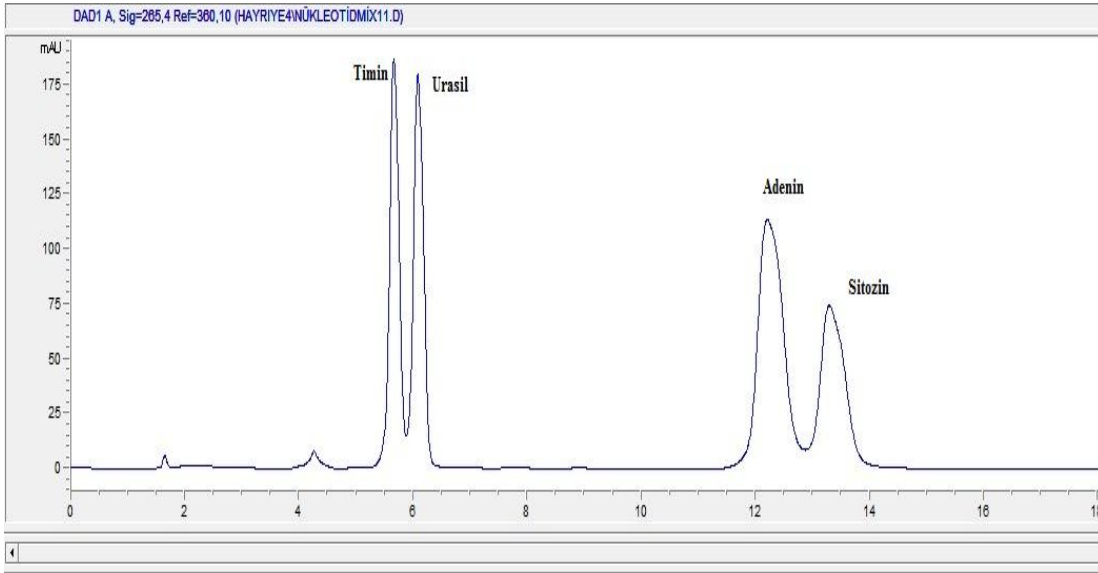
Şekil 4.11. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleotitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 8.04, 10 mM fosfat tamponu): 80/20, akış hızı: 0.5 mL/dk, sıcaklık: 15 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 275 nm.

SP2 dolgu maddesinin yapısı SP1'e göre çok daha polar olduğundan bu dolgu maddesi bu analitlere karşı tipik bir HILIC özellik göstermiştir. Analitlerin kolonla etkileşimi güçlü olduğu için orta pH'larda dahi analiz süresi uzun olduğundan bu pH'larda uygun pik keskinliği ve selektivite elde edilemedi. Bu nedenle SP1 dolgu maddesinin tam aksine, pH düşürülerek analitlerin kolon ile etkileşimini azaltmak

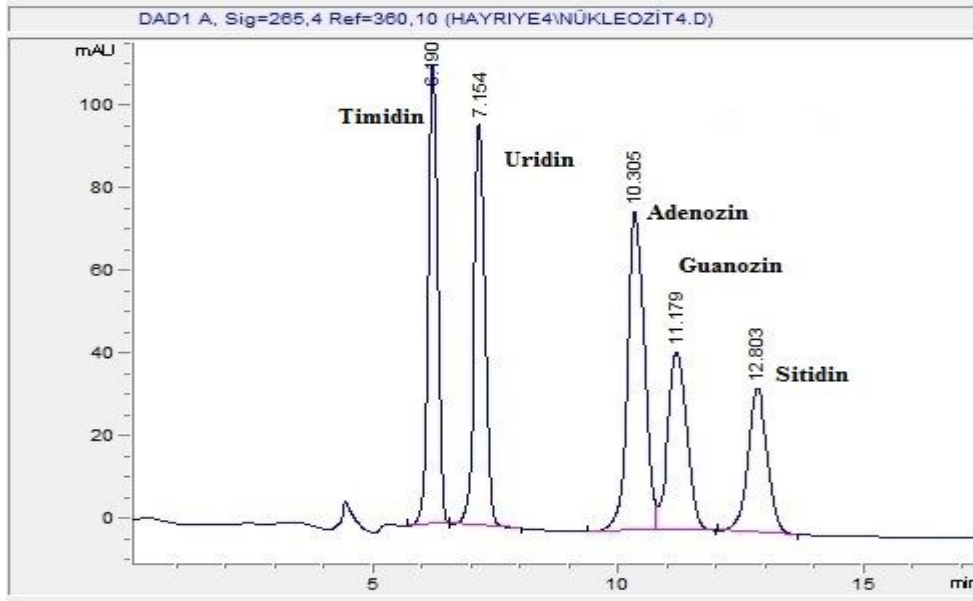
suretiyle analiz süresinin kısaltılması ve böylece daha iyi pik keskinliği ve yüksek selektivite sağlandı.



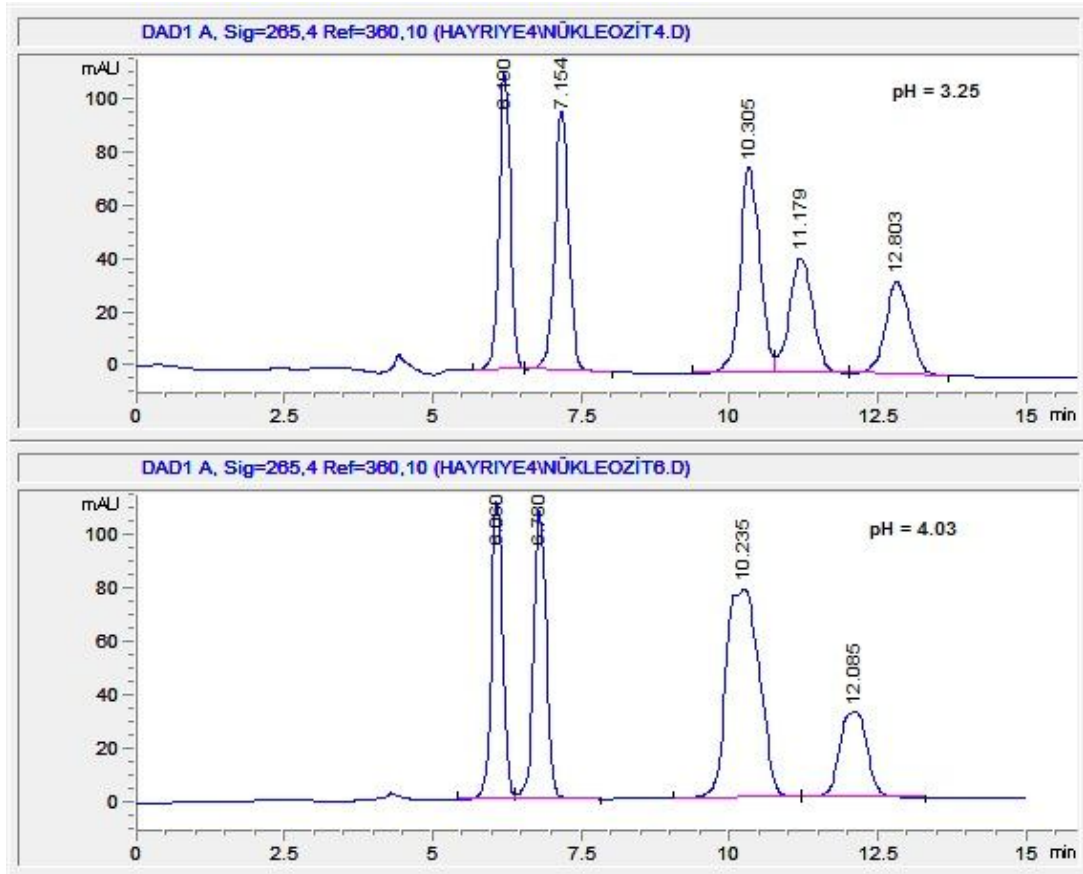
Şekil 4.12. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleozitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 8.5, 10 mM borat tamponu): 92/8, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 275 nm.



Şekil 4.13. SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleotitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 265 nm.



Şekil 4.14. SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Nükleozitlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm.



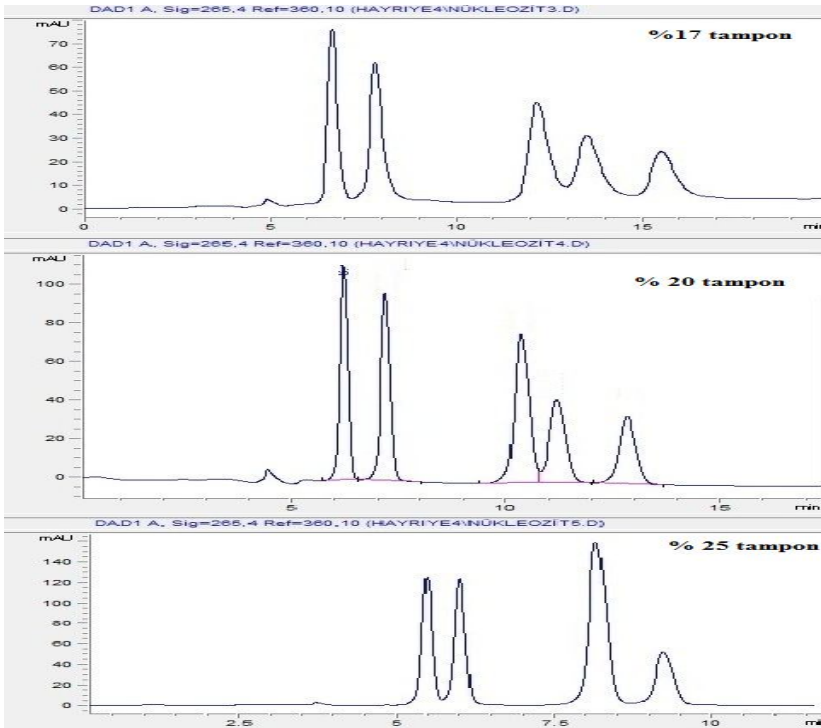
Şekil 4.15. SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 3.25-4.03, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şarttaki gibidir.

4.3.1. Ayırma Üzerine pH'nın Etkisi

pH= 3.25- 7.0 arasında tampon çözeltiler kullanıldı ve ayırmaya olan etkileri incelendi. pH= 4.03'te şekil 4.15'te görüldüğü gibi adenozin ve guanozin pikleri iç içe girmektedir. pH'nın artmasıyla birlikte diğer pikler de iç içe girdiğinden en uygun pH= 3.25 olarak kabul edildi. pH= 3.25'te daha iyi bir ayırma görülmesi bu analitlerin muhtemelen bazik doğasından kaynaklanır. Ayrıca pH düştükçe analiz süresinin kısaldığı görüldü. Çünkü bazik analitler asidik pH'da daha iyi çözündüğünden dolayı kolonu daha çabuk terk eder.

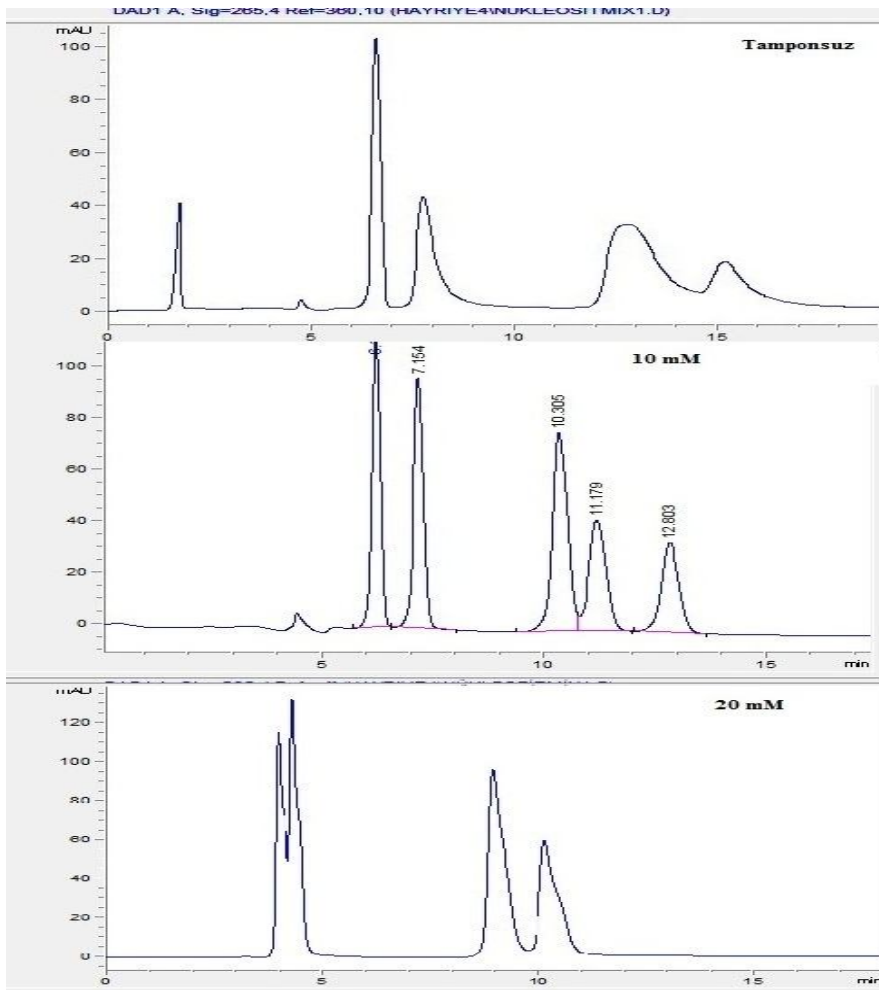
4.3.2. Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi: Tampon Derişimi ve Oranı

Çözücü oranının dolgu maddesi üzerine etkisini incelemek için farklı oranlarda sulu tampon kullanıldı. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi sulu fazın derişiminin artmasıyla analiz süresi kısalmaktadır. Bu da dolgu maddesinin tipik bir HILIC özelliğe sahip olduğunun göstergesidir. % 17, 20 ve 25 oranlarında sulu tampon kullanıldığında en iyi sonucun % 20 ile elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.16. SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayırılmasına Çözücü Oranı Etkisi. İzokratik elüsyon: % ACN/tampon (pH 3.25, 10 mM): % 17, 20 ve 25. Akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şart ile aynıdır.

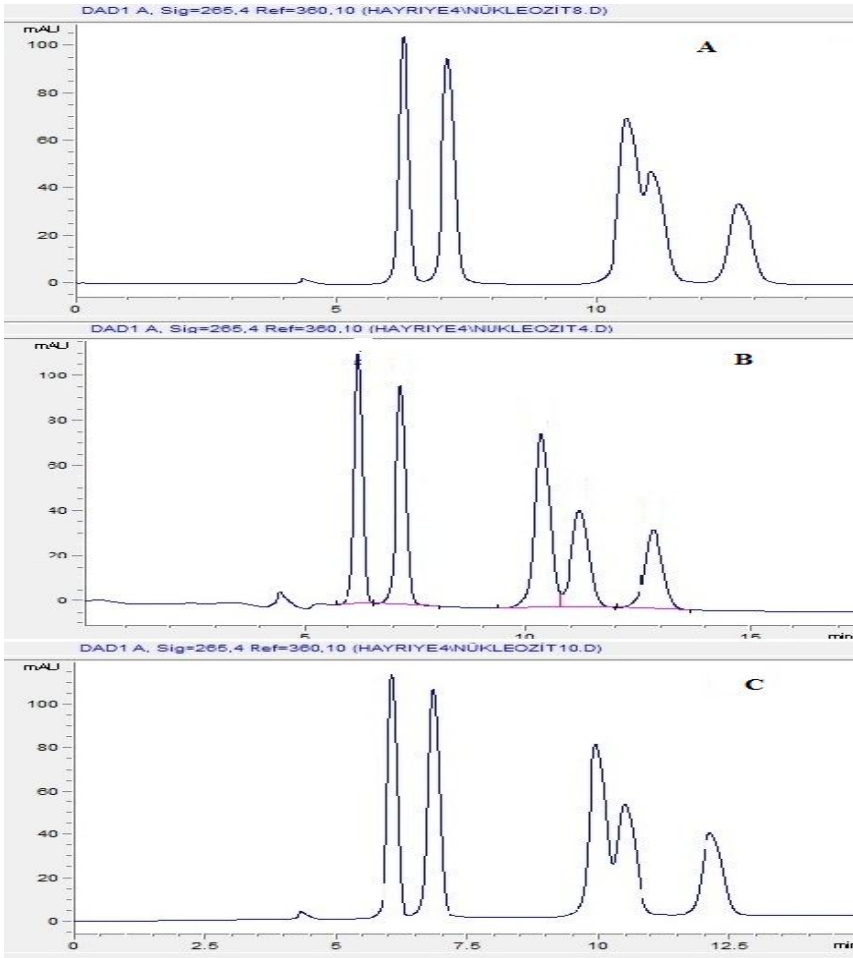
Şekil 4.17'de görüldüğü gibi tampon derişimi arttıkça analiz süresi kısalmaktadır. Asidik tampon kullanıldığından dolayı artan tampon derişimi ile beraber analitlerin hareketli fazdaki çözünürlüğünün artması da normaldir. İlk önce tamponsuz su-ACN karışımı denendi, ancak adenozin ve guanozinin iç içe olduğu görüldü. % 10 derişiminde fosfat tamponu kullanıldığında bu iki analitin birbirinden ayrıldığı pik keskinliğinin daha iyi olduğu analiz süresinin de biraz daha kısaldığı görüldü. Daha yüksek tampon derişiminde bu iki pikin tekrar iç içe geçtiği görüldü. Bu nedenle en uygun tampon derişimi % 10 olarak kabul edildi.



Şekil 4.17. SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına Tampon Derişiminin Etkisi. İzokratik elüsyon: ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM, 20 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm. Pik sıralaması optimum şart ile aynıdır.

4.3.3. Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın ayırma üzerine etkisinden bitki büyüme düzenleyicileri bölümünde ayrıntılı olarak bahsetmiştik. Sıcaklığın bazen analiz süresini uzattığını bazen de kıstattığını belirtmiştik. Bu nedenle SP2'nin ayırmadaki etkinliği üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 10, 20 ve 30 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta analiz yapıldı. Sıcaklığın artmasıyla tüm analitlerin alıkonma sürelerinin kıstaldığı şekil 4.18'de görülmektedir. En iyi selektevitenin 20 °C'de elde edildiği kromatogramdan anlaşılmaktadır.



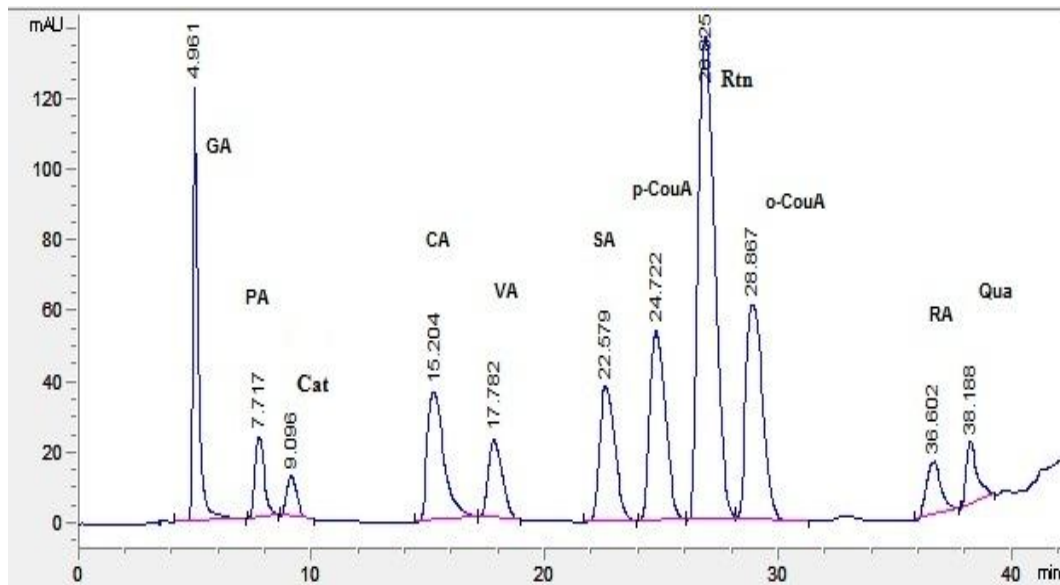
Şekil 4.18. SP2 Dolgu Maddesi ile Nükleozitlerin Ayrılmasına Sıcaklığın Etkisi. İzokratik elüsyon: % ACN/tampon (pH 3.25, 10 mM): 80/20, akış hızı: 0.7 mL/dk, sıcaklık: A: 10°C, B: 20°C, C: 30°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 265 nm.

4.4. Fenolik Bileşiklerin Ayrılması

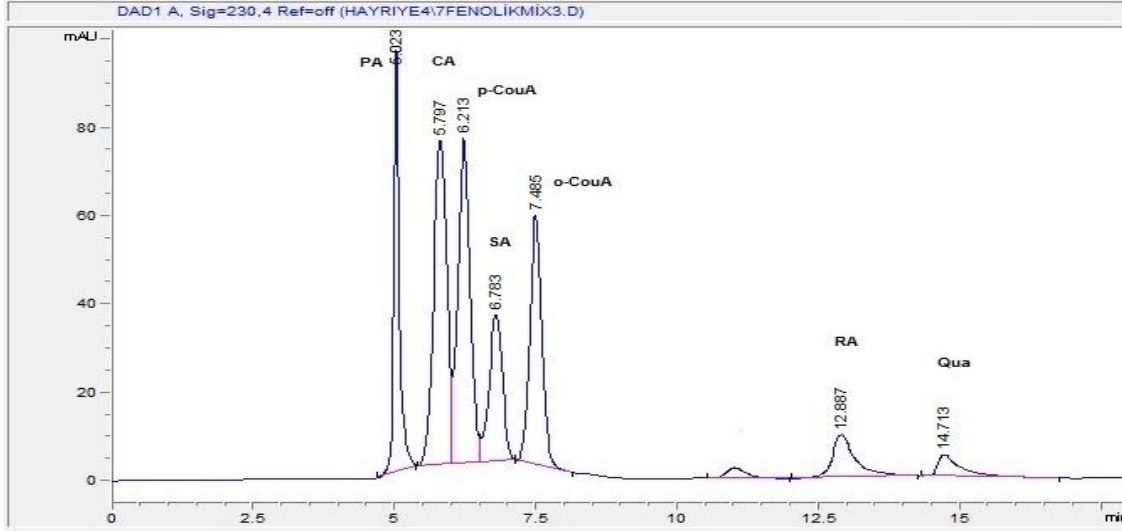
Birçok meyvede bulunan fenolik bileşikler iyi birer doğal antioksidant kaynağı olup mutajenite ve kansere yol açan etkenlere karşı inhibitör etkisine sahiptir (Gezici ve ark. 2006), (Kowalska ve ark. 2006).

Ters-faz HPLC temel olarak fenolik bileşiklerin ve bitki ekstraktlarında bulunan diğer doğal ürünlerin kompleks karışımlarının ayrılmasında kullanılır (Ascah ve Feibush 1990), (Nawrocki 1997), (Jaroniec ve ark. 1998), (Jandera 2011). Bununla beraber, genellikle sadece fenolik (Layne 2002) ya da antosiyaninlerin bir grubunu ya da sınırlı sayıda flavanoidlerin analizi yapılmaktadır. Flavanoid ve fenolik bileşiklerin bir arada analizini yapan çok az sayıda metod mevcuttur (Song ve Budde 1998), (Jandera 2011). Bundaki temel zorluk flavanoid ve fenolik asitler arasındaki ayrımın zor olmasıdır.

Bu çalışmada SP1 dolgu maddesi ile üç tanesi flavanoid (katesin, rutin, quvarsetin) ve sekiz tanesi fenolik asit (gallik, vanilik, kafeik, protokatesuik, şiringik, o-kumarik, p-kumarik ve rosmarinik asit) olmak üzere toplam on bir tane fenolik bileşiğin 40 dakikada ayrımı, SP2 dolgu maddesi ile bir tanesi flavanoid (quvarsetin) olmak üzere toplam yedi tane fenolik bileşiğin 15 dakikada ayrımı sağlanmıştır (Şekil 4.19 ve 4.20).



Şekil 4.19. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Fenolik Bileşiklerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25 10 mM fosfat tamponu): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm.

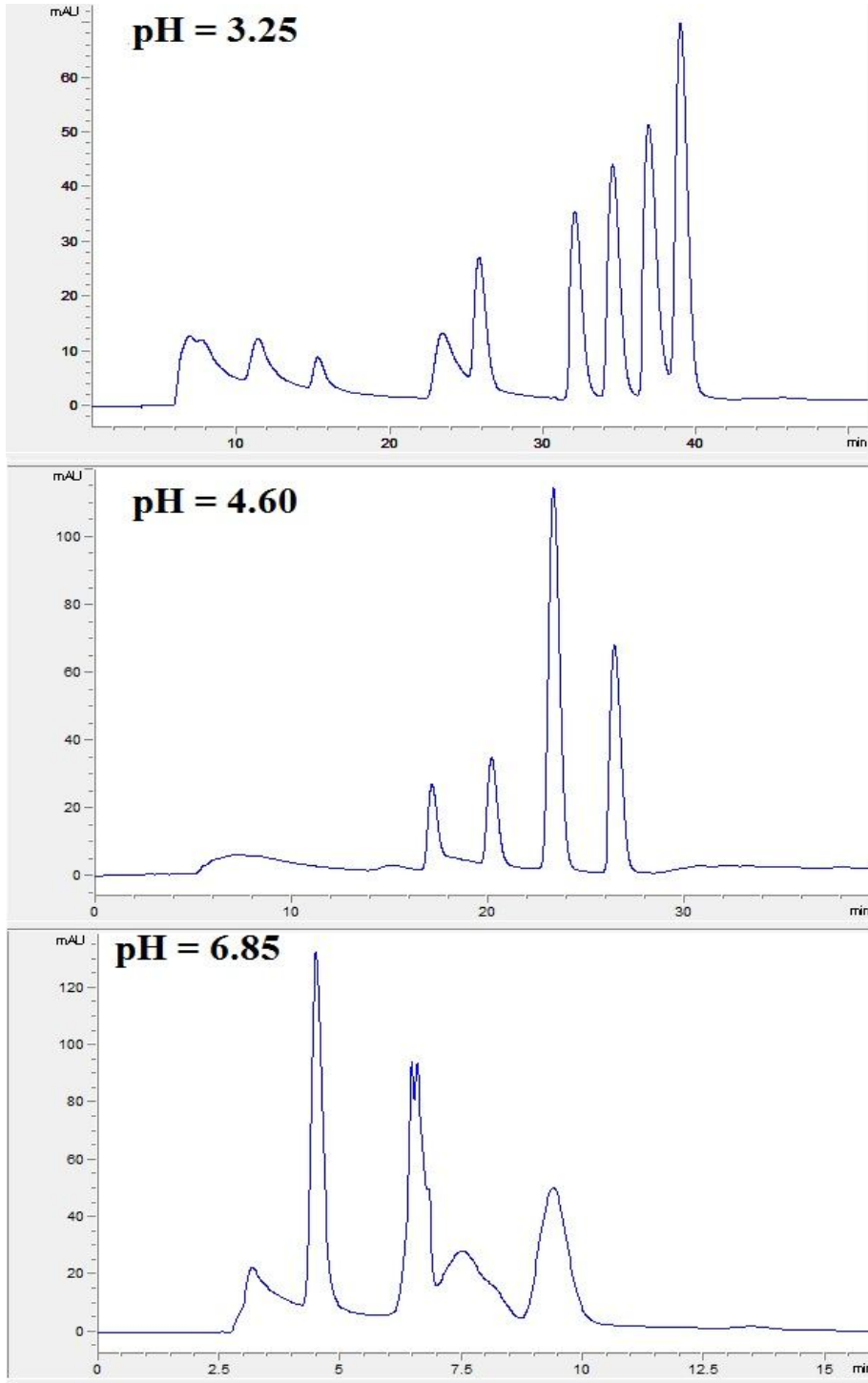


Şekil 4.20. SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Fenolik Bileşiklerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/tampon (pH 2.5, 10mM): 0-7 dk; % 3, akış hızı: 0.7 mL/dk, 8-20 dk; % 3-30, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 20°C, enjeksiyon hacmi: 3µL, dalga boyu: 230 nm.

Her iki dolgu maddesi ile fenolik bileşiklerin ayrılması çalışılırken hareketli faz olarak hem metanol ve hem de asetonitril içeren sulu hareketli fazlar denendi. Ancak en iyi selektivite SP1 dolgu maddesi ile metanol içeren sulu hareketli fazla, SP2 dolgu maddesi ile asetonitril içeren sulu hareketli fazla elde edildi. Bütün model bileşiklerin alıkonma süresi organik çözücü oranı arttıkça azaldı. SP1 dolgu maddesi yapısındaki sikloheksil ve fenil alanin halkarından dolayı apolar karakterlidir ve bu bileşiklere karşı ters-faz özellik göstermesi beklenen bir durumdur. SP2 dolgu maddesi ise benzen halkası gibi apolar bir grup ve hidroksil grupları gibi polar gruplar içeren bir yapıya sahiptir. Nükleotit ve nükleozitlere karşı oldukça etkin bir HILIC özellik gösteren SP2 dolgu maddesi orta polarlıktaki fenolik bileşiklere karşı ters-faz özelliği göstermiştir. Analitlerin alıkonma sürelerinin pH yükseldikçe azaldığı ve böylece ayırma selektivitesinin düştüğü gözlemlendi.

Alıkonma süresi ile analitlerin polarlığı arasında bir ilişki kurulduğunda klasik bir ters-faz özelliği gösterdiği görüldü: daha hidrofobik olan bileşik kolonu daha geç terk etmiştir. Daha hidrofobik olan analitlerin hem su bakımından zengin hareketli fazdaki çözünürlüğünün düşük olması hem de dolgu fazı ile daha güçlü hidrofobik etkileşim yapmasından dolayı kolonu daha geç terk etmesi beklenen bir durumdur.

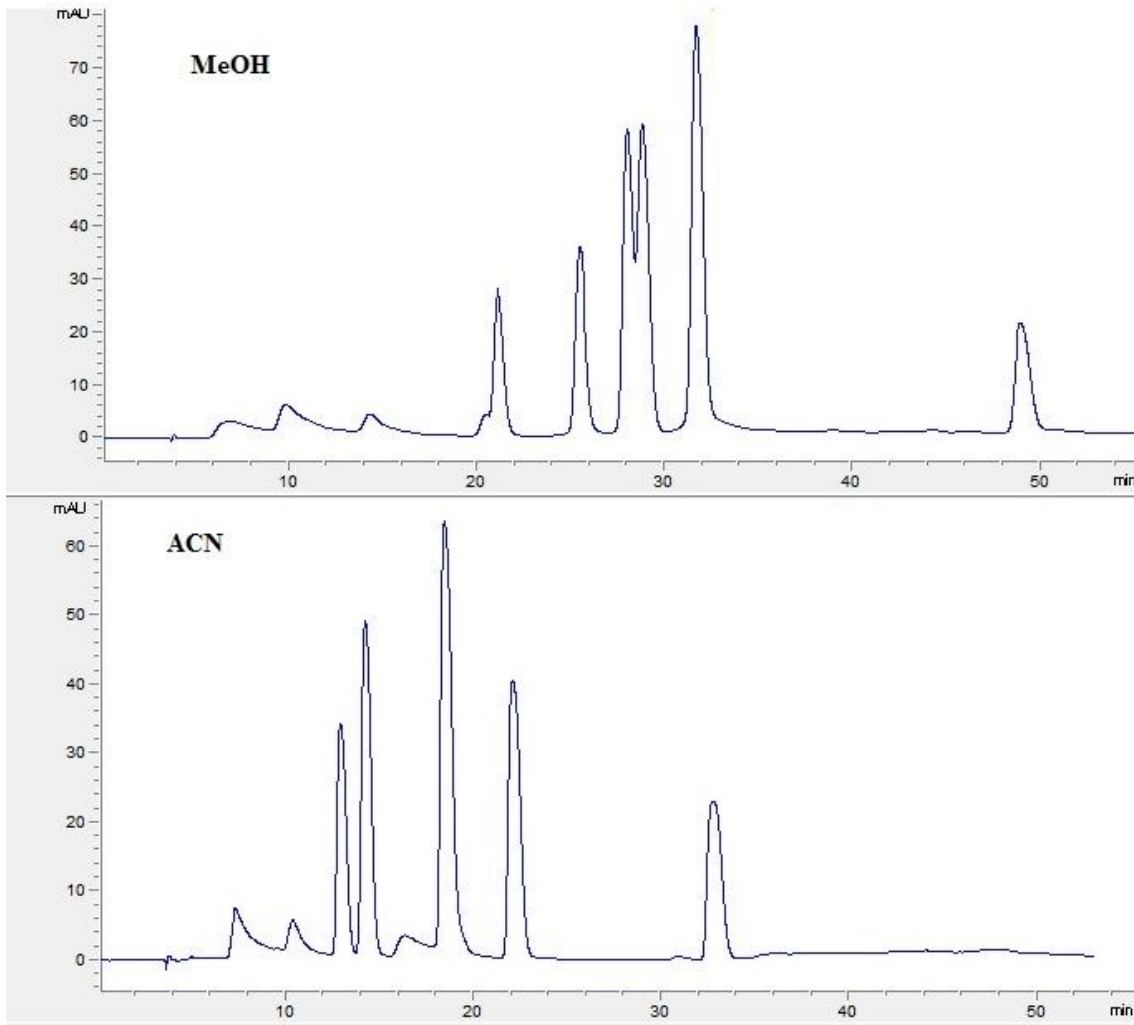
4.4.1. Ayırma Üzerine pH'nın Etkisi



Şekil 4.21. SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25 ve 4.61, 10 mM fosfat tamponu): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm.

Şekil 4.21’de görüldüğü gibi pH’nın artmasıyla ayırma selektivitesi düşmekte ve pikler iç içe girmektedir. Çünkü fenolik bileşikler asidik özellik gösterir ve bundan dolayı daha önce de bahsedildiği gibi pH yükseldikçe yani baziklik arttıkça asidik özellik gösteren analitler hareketli faz ile daha güçlü etkileşir ve böylece kolonu daha erken terk eder.

4.4.2. Ayırma Üzerine Çözücü Etkisi

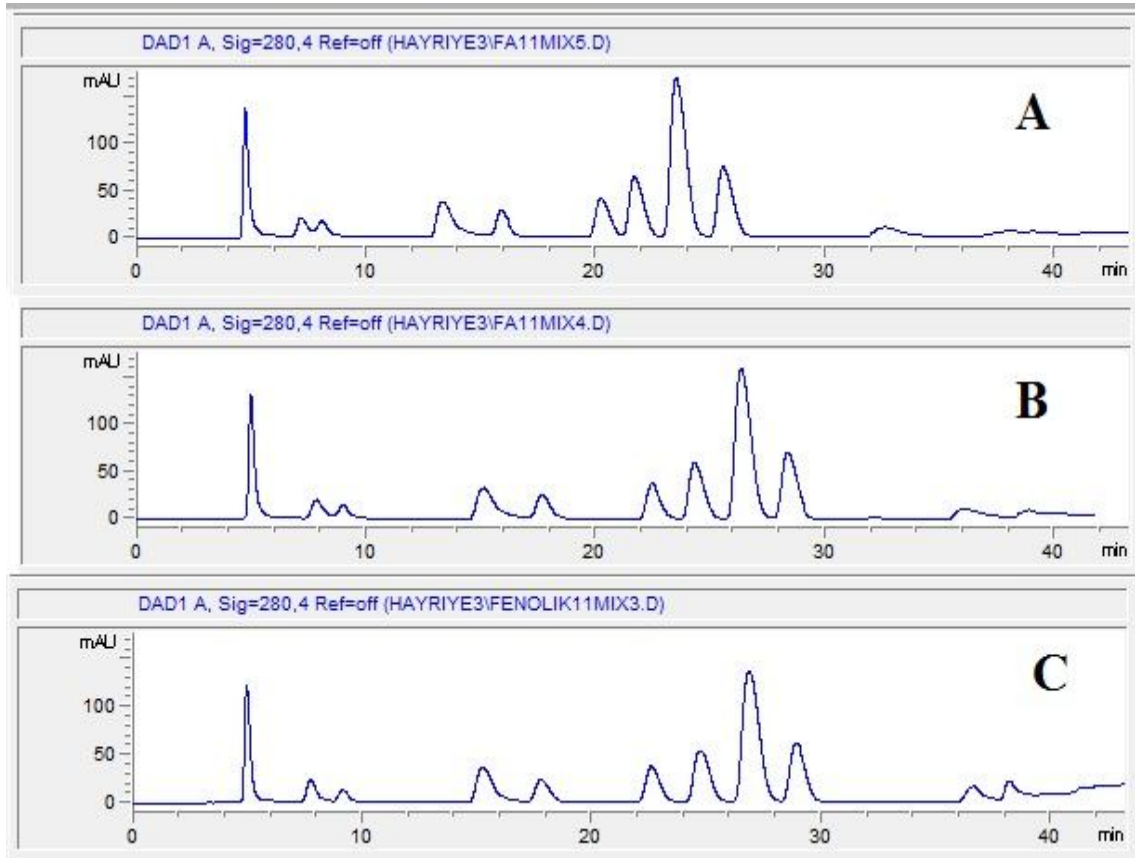


Şekil 4.22. SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına Çözücü Türü Etkisi. % X/Tampon (pH 4.02, 10 mM asetat tamponu): Gradient elüsyon: 0-40 dk: % 10/ 90-% 40/ 60, Akış Hızı: 0.8 mL/ dk, 20 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, Dalga Boyu: 280 nm.

Uygun organik çözücüyü bulmak için hem asetonitril ve hem de metanol denendi. Analitler asetonitrilde daha iyi çözüldüklerinden dolayı asetonitril daha etkin bir çözücüdür. Şekil 4.22’de görüldüğü gibi asetonitril ile çalışıldığında analitler kolonu

daha çabuk terk etmektedir. Ancak metanol ile çalışıldığında daha yüksek oranda organik çözücü kullanma imkânı doğmaktadır. Daha yüksek organik çözücü kullanarak daha yüksek selektivitenin metanol ile sağlandı. Bundan dolayı diğer optimizasyon çalışmalarına metanolde devam edildi.

4.4.3. Ayırma Üzerine Sıcaklığın Etkisi



Şekil 4.23. SP1 Dolgu Maddesi ile Fenolik Bileşiklerin Ayrılmasına Sıcaklık Etkisi. Gradient elüsyon: % MeOH/Tampon (pH 3.25 fosfat tamponu): 0-10 dk; % 20-25, 10-40 dk; % 25-60, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: A: 40 °C, B: 30 °C, C: 25 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 280 nm.

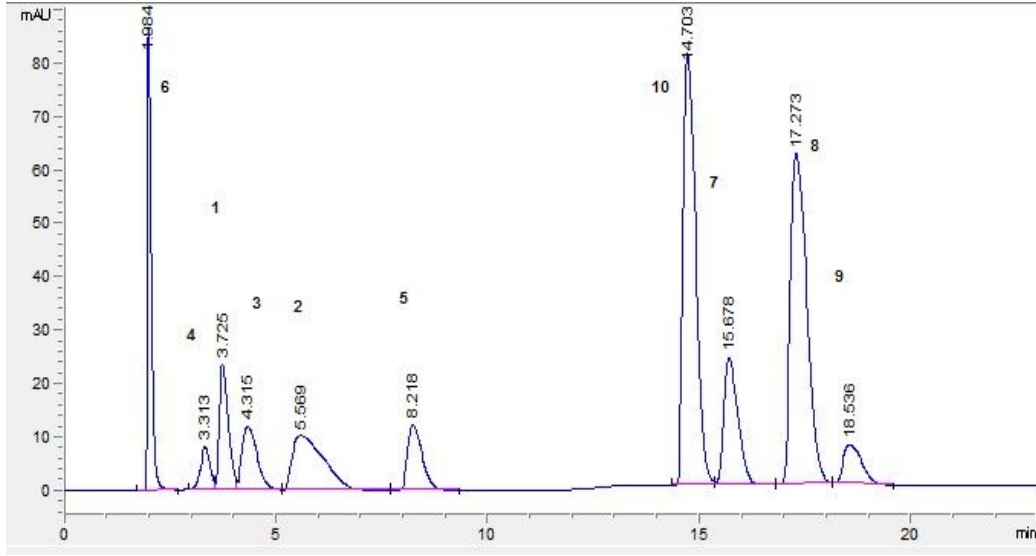
Sıcaklığın ayırma üzerine etkisinden daha önceki bölümlerde ayrıntılı olarak bahsetmiştik. Sıcaklığın bazen analiz süresini azalttığı bazen de kıstattığını belirtmiştik. Bu nedenle SP1'in ayırmadaki etkinliği üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 25, 30 ve 40 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta analiz yapıldı. Sıcaklığın artmasıyla analitlerin alıkonma sürelerinin ciddi oranda değişmediği şekil 4.23'de görülmektedir. Yine de en iyi selektivitenin 25 °C'de elde edildiği kromatogramdan anlaşılmaktadır. Bundan dolayı optimum sıcaklık 25 °C olarak kabul edilmiştir.

4.5. Sübstitüe Anilinlerin Ayrılması

Sübstitüe anilinler organik sentezde önemli ara ürünlerdir. Bununla beraber düşük konsantrasyondaki miktarları bile yüksek oranda toksiktir ve sudaki bir miktar çözünürlüklerinden dolayı nehirlerde, toprakta ve içme sularında bulunabilirler. Ayrıca düşük biyodegradabiliteye sahip olduklarından çevreye yayılma olasılıkları söz konusudur (Nawrocki 1997). Bundan dolayı anilinlerin analizi çok önemlidir. Sübstitüe anilinlerin ayrımı literatürde mevcuttur. Chang ve arkadaşları (1986) β -siklodekstrin bağlı silika tabanlı dolgu fazı kullanarak sübstitüe anilinlerin ters ve normal faz sıvı kromatografik ayrımını incelemiştir. Genaro ve çalışma arkadaşları (2002) iyon çifti kromatografisini kullanarak anilinlerin ayrımını incelemiştir. Bu çalışmaya göre gradient elüsyon kullanılarak on üç tane anilin türevi 80 dakikada ayrılmıştır (Shen ve ark. 2006). Shen ve çalışma arkadaşları (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada hibrid bir dolgu maddesi kullanılarak on iki tane sübstitüe anilini 10 dakika gibi kısa bir sürede ayırmayı başarmışlardır. Bu çalışmada 3.5 μ m tanecik boyutuna sahip hibrid dolgu maddesi kullanılmış ve 200 °C'de çalışıldığı rapor edilmiştir. Bu alanda yapılan en son çalışmalardan biri de Erdemir ve arkadaşlarına (2010) aittir. Yazarlar bu çalışmada bir kaliksareni silikaya tutturmak suretiyle hazırladıkları dolgu maddesini yedi adet aromatik aminin ayırmasında kullandılar. Yazarlar aynı zamanda aynı örneğin ayrılmasını C₁₈ kolon ile de yaparak kendi kolonlarıyla kıyasladılar. Bu çalışmada gerek kaliksaren dolgu fazı ile gerekse C₁₈ kolon ile yedi adet aromatik aminin 30 dakikaya yakın bir sürede ayrıldığı belirtilmiştir.

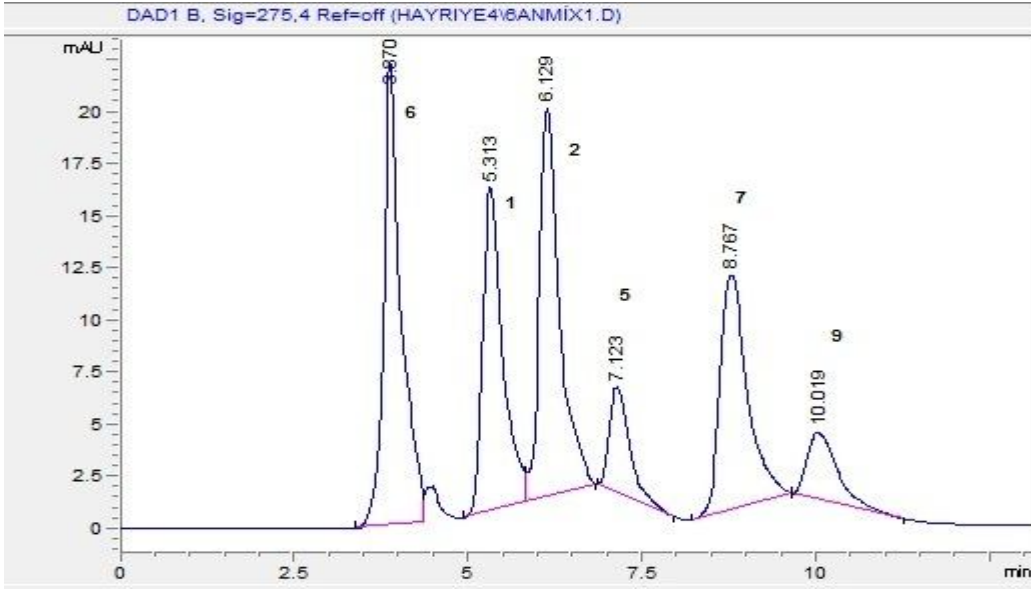
Bu çalışmada zayıf bazik özellik gösteren anilin türevlerinin SP1 ve SP2 dolgu maddeleri ile kromatografik ayrımı incelenmiştir. SP1 dolgu maddesi ile on tane sübstitüe anilinin pH=3.25, 10 mM fosfat tamponu ve ilk 7 dakika boyunca % 30, 7-10 dakika arasında % 45 ve 10-20 dakika arasında % 45 asetonyril içeren hareketli faz ile sabit 1 mL/dk akış hızı ile 10 °C'de 20 dakikada ayrımı sağlanmıştır (Şekil 4.24).

Daha yüksek pH değerlerine çıkıldıkça bazik özellik gösteren bu analitler için analiz süresi uzadığı şekil 4.26'da görülmektedir. Bundan dolayı daha yüksek pH'larda çalışılmamıştır.

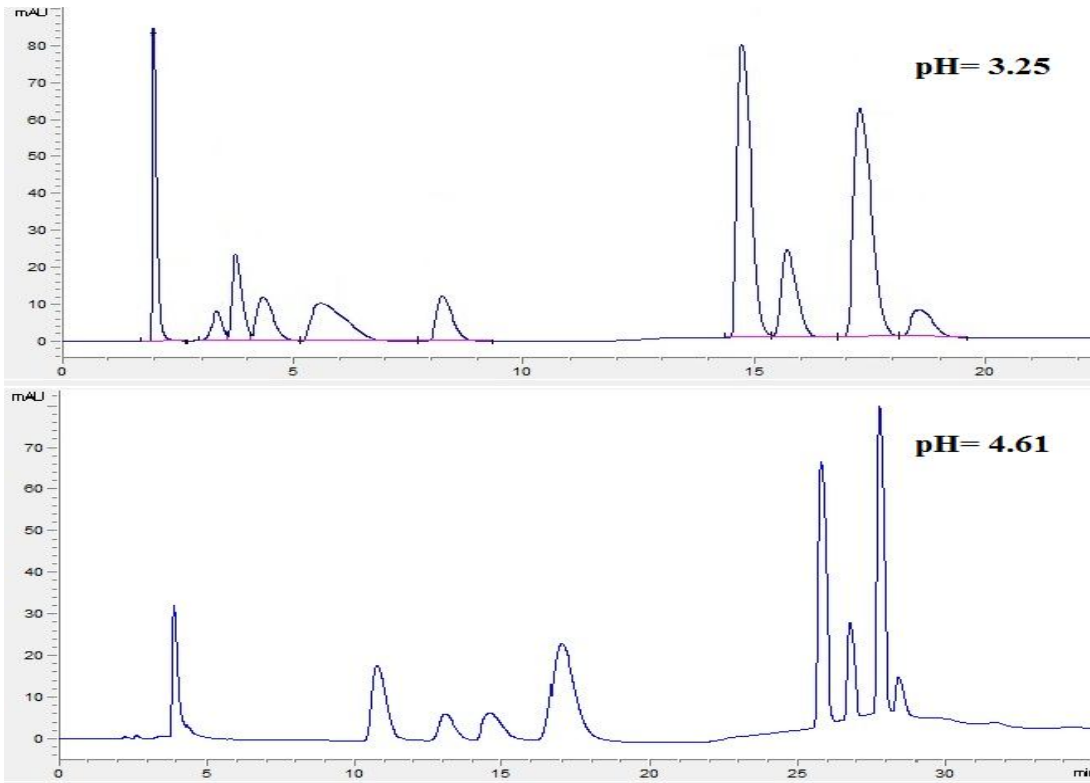


Şekil 4.24. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Süstitüe Anilinlerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM fosfat tamponu): 0-7 dk; % 30, 7-10 dk; % 30-45, 10-20 dk; % 45, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 10 °C, enjeksiyon hacmi: 10 µL, dalga boyu: 275 nm.

SP2 dolgu maddesi ile altı tane alinin türevi pH=4.6, 10 mM amonyum asetat tamponu ve % 5 asetonitril içeren hareketli faz ile izokratik şartlarda sabit 0.8 mL/dk akış hızında 10 °C'de 13 dakikada ayrılmıştır (Şekil 4.25). Fenolik bileşikler için yapılan bütün optimizasyon parametreleri süstitüe anilinler için de yapıldı. Her iki dolgu maddesi için kullanılan asetonitril oranlarına bakıldığında SP1 için çok yüksek oranda asetonitril kullanıldığı görülmektedir. Bu da SP1'in anilin türevleri ile çok daha güçlü hidrofobik etkileşim yaptığı ve analitleri daha çok alıkoyduğunu gösterir. Pik sıralamasına bakacak olursak bitki büyüme düzenleyicileri ve fenolik bileşiklerin gösterdiği özelliklere benzer davranış sergiledikleri görülmektedir. Yani apolarite arttıkça analitin kolonu daha geç terk ettiği, polariteleri çok yakın olan analitlerde ise daha güçlü bazik özellik gösteren analitin kolonu daha erken terk ettiği her iki şekilde de görülmektedir (Şekil 4.24 ve 4.25).



Şekil 4.25. SP2 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Süstitü Anilinlerin Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/tampon (pH 4.6, 10mM): 5/95, akış hızı: 0.8 mL/dk, sıcaklık: 10°C, enjeksiyon hacmi: 5µL, dalga boyu: 275 nm.

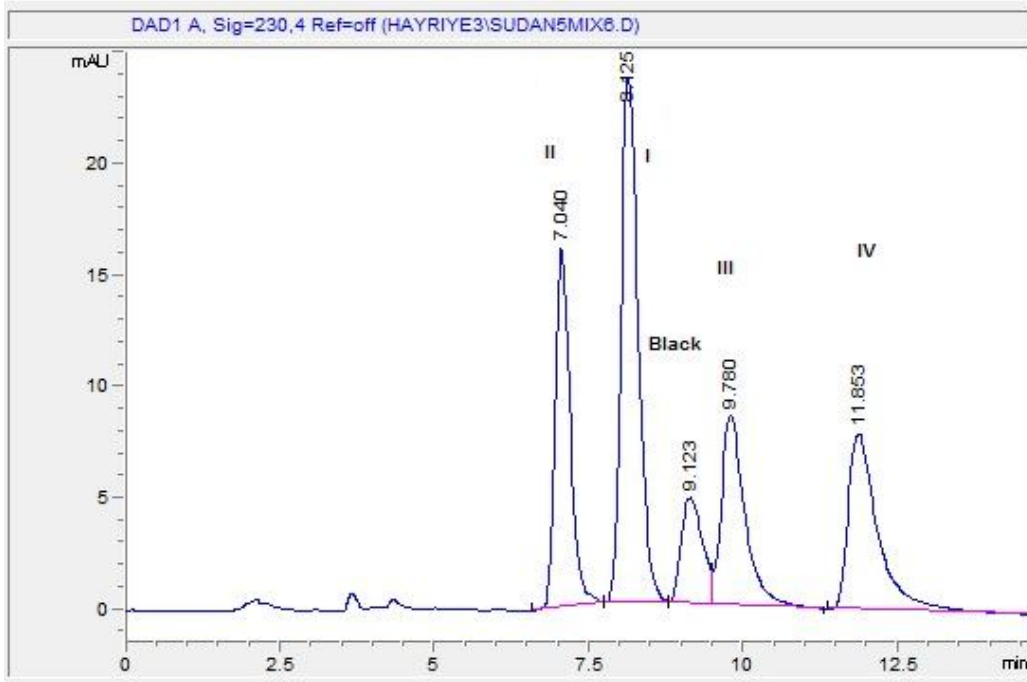


Şekil 4.26. SP1 Dolgu Maddesi ile Anilinlerin Ayrılmasına pH'nın Etkisi. % ACN/Tampon (pH 3.25, 10 mM fosfat tamponu): 0-7 dk; % 30, 7-10 dk; % 30-45, 10-20 dk; % 45, akış hızı: 1 mL/dk, sıcaklık: 10 °C, enjeksiyon hacmi: 10 µL, dalga boyu: 275 nm.

4.6. Sudan Boyalarının Ayrılması

Gıdaların boyanması doğal ya da sentetik renklendiriciler kullanılarak elde edilir. Gıda üretim işlemlerinde, sentetik renklendiriciler temel olarak bir maddeyi istenilen renge dönüştürmek için kullanılır. Çünkü doğal renklendiriciler gıda üretim koşulları altında sentetik renklendiricilerden daha az kararlıdır (Lindsay 1986). Maalesef, birçok sentetik renklendirici Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği maksimum oranın üzerinde tüketilirse tüketicinin sağlığını büyük oranda tehdit eder (Downham ve Collins, 2000).

Sudan I-IV kanserojen madde olarak sınıflandırılan sentetik renklendiricilerin bir grubudur (Ahlstrom ve ark. 2005). Avrupa Komisyonu gıda maddelerinde kullanımlarını yasaklamasına rağmen (Zacharis ve ark. 2011) bazı Asya Ülkeleri'nde, bu boyalar baharatlarda kırmızı-turuncu rengini belirgin hale getirmek için halâ kullanılmaktadır. Bundan dolayı, bu boyar maddelerin kromatografik ayrımı ve kantitatif tayini için uygun bir analitik metod geliştirmeye ihtiyaç vardır (Zacharis ve ark. 2011).



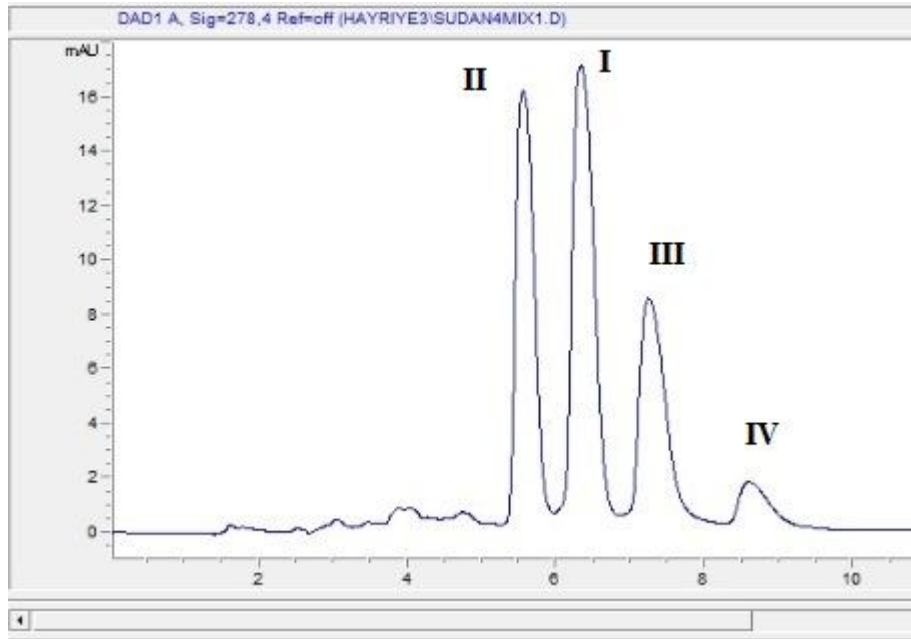
Şekil 4.27. SP1 Dolgu Maddesi ile 5'li Sudan Boyaları Karışımının Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 59/41, akış hızı: 0.9mL/dk, sıcaklık: 25⁰C, enjeksiyon hacmi: 3µL, dalga boyu: 230 nm.

Tablo 4.2. Sudan I-IV'ün HPLC ayırımı için literatüre genel bir bakış

Teknik	Kolon	Kolon Özellikleri	Elüsyon Türü	Akış Hızı (mL/dk)	Analiz süresi (dk)
HPLC-UV	C18 Lichrospher ODS	200 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	İzokratik	1.0	7
HPLC-UV	C18, Spheri 5	250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	İzokratik	2	-
HPLC-UV	RP-C18 Phenomenex Gemini	150 mm x 3 mm i.d., 5 µm	Gradient	0.6	13
HPLC-UV	ACE C18	250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	İzokratik	1	8.8
HPLC-UV	Agilent Eclipse XDB-C18	150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	Gradient	0.8	23
UPLC-UV	Acquity UPLC BEH C18	50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm	Gradient	0.4	5.6
HPLC- PDA	Cosmosil 5C 18-AR	150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	Gradient	1	-
HPLC- PDA	RP-C18 Varian Microsorb-MV	150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	İzokratik	1	22.3
HPLC- PDA	Lichrospher C18	150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	Gradient	1	20.9
HPLC-CL	Nucleosil SP-C18	250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	İzokratik	1	25.5
HPLC-EC	İnertsil ODS-3	-	İzokratik	1	23
LC-MS	Nova-Pak	150 mm x 3.9 mm i.d., 4 µm	İzokratik	0.15	16.92
LC-MS	Varian C18	50 mm x 2.0 mm i.d., -	Gradient	0.25	10
LC-MS	Purospher Star RP- 18	125 mm x 3 mm i.d., 5 µm	Gradient	0.5	13.5
LS-MS	ODS-3	250 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm	Gradient	0.3	30.8
LC-MS	Phenomenex Luna C18	150 mm x 2.0 mm i.d., 3 µm	izokratik	0.2	17
LC-MS	Spkerigel C18	250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm	Gradient	1	30.29
Mikro-LC- MS	Symmetry C18 capillary column	150 mm x 0.32 mm i.d., 5 µm	Gradient	0.005	26.82

UPLC-MS	Acquity BEH C18	100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m	Gradient	-	4.19
UPLC-MS	Acquity BEH C18	50 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m	İzokratik	0.35	2.98
HPLC-UV	FastGradient RP monolithic column	50 mm x 2.0 mm i.d.	İzokratik	1.5	3.9

Literatürde, piyasada mevcut olan çeşitli kolonlar ile Sudan I-IV'ün HPLC ile ayrımı ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Tablo 4.2 bu çalışmaları ve bunlara ilişkin sonuçları göstermektedir. Bu tablodan görüldüğü gibi Sudan I-IV karışımının ayrımı genellikle on dakikalık analiz süresini geçmektedir. On dakikadan daha kısa sürede yapılan ayırmalar genellikle 2 μ m'nin altındaki parçacık boyutlu dolgu maddeleri kullanıldığında gerçekleşmektedir (Zacharis ve ark. 2011).



Şekil 4.28. SP1 Dolgu Maddesi ile 4'lü Sudan Boyaları Karışımının Ayrılması. İzokratik elüsyon: ACN/SU: 62/38, akış hızı: 1 mL/min, Sıcaklık : 30 $^{\circ}$ C, enjeksiyon hacmi : 5 μ L, dalga boyu: 230 nm

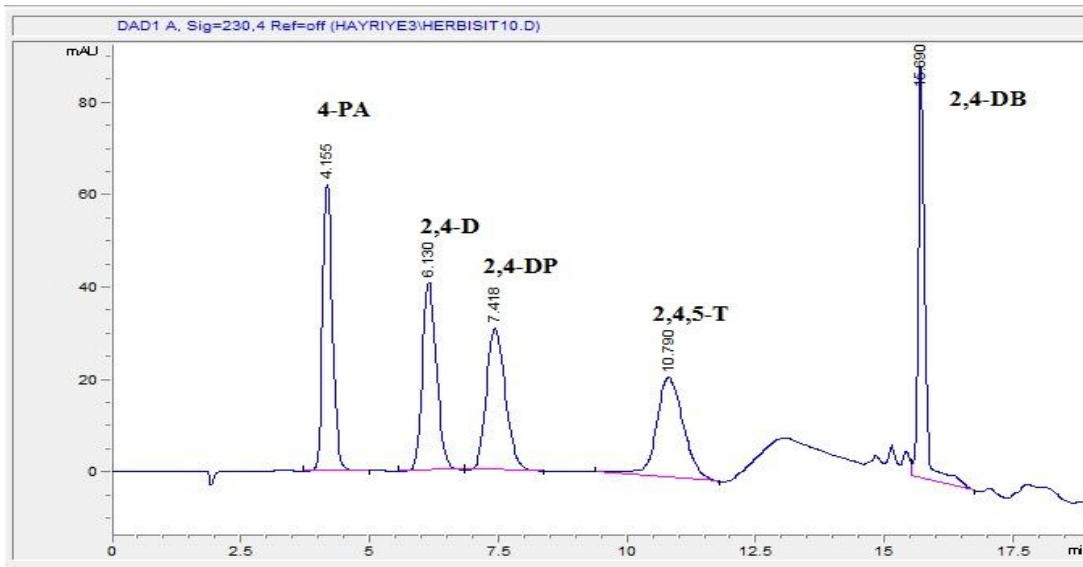
Şekil 4.27 Sudan I-IV ve Sudan black, şekil 4.28'de Sudan I-IV'ün SP1 dolgu fazı ile ayrımını göstermektedir. Genellikle Sudan I-IV karışımı daha çok tayin edildiğinden dolayı, Sudan black'i karışımdan çıkararak dördü karışım halinde ayırmaya çalıştık. Böylece beşli karışım için 13 dakika olan analiz süresi dördü karışım için 9 dakikaya indiği şekil 4.24'de görülmektedir. SP1 dolgu fazı bu analitlere karşı da

beklendiği gibi tam bir ters-faz özellik göstermiştir. SP2 dolgu fazı ise bu apolar yapıdaki analitleri ayıramadığından buna ait bir kromatogram verilmedi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'deki literatür sonuçları ile kıyaslandığında SP1 dolgu maddesinin Sudan boyalarına karşı piyasadaki mevcut kolonlar arasında en etkili birkaç kolondan biri olduğu anlaşılmaktadır.

4.7. Herbisitlerin Ayrılması

Klorofenoksiasetik asit türevleri auxin türü bitki büyüme düzenleyicileri olmakla beraber herbisit olarak da bilinirler. Bunlar bitki büyüme hormonları ile beraber analiz edilmelerinin yanı sıra çoğu zaman ayrı bir grup olarak çalışılırlar. Bu nedenle bu grubun tek başına ayrılması da büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki kromatogramda görüldüğü gibi beş tane herbisit SP1 dolgu maddesi ile 16 dakika gibi kısa bir analiz süresinde ayrıldı (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. SP1 Dolgu Maddesi ile Optimum Şartlarda Herbisitlerin Ayrılması. Gradient elüsyon: % ACN/Tampon (pH 5.63, 10 mM amonyum asetat tamponu): 0-10 dk; % 17, 10-15 dk; % 17-40, akış hızı: 1.2 mL/dk, sıcaklık: 30 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL, dalga boyu: 230 nm.

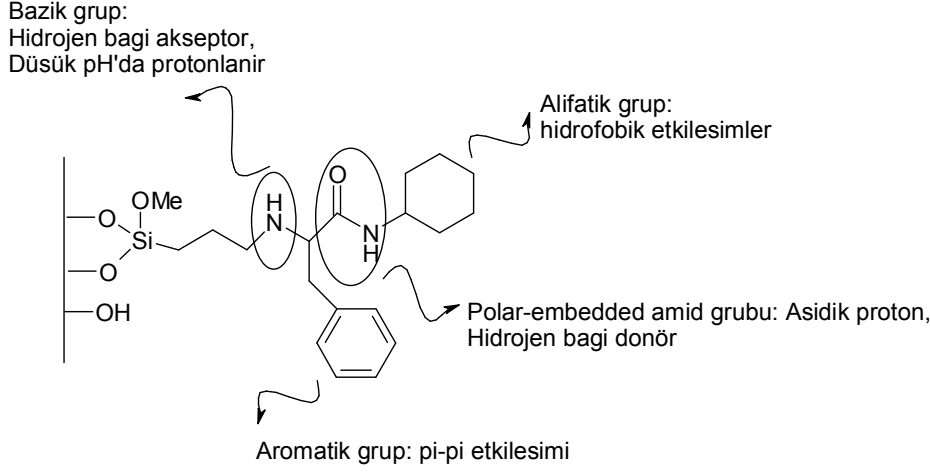
5. SONUÇ VE ÖNERİLER

N-Boc-Fenilalanin ve N-Boc-Glutamin aminoasitlerinden yola çıkılarak dört adet yeni amid bileşiği (1, 2, 4, 5) sentezlendi. Daha sonra 2 ve 5 numaralı amid bileşiklerini silika jele bağlanarak SP1 ve SP2 olmak üzere farklı polariteye sahip iki adet yeni dolgu maddesi sentezlendi.

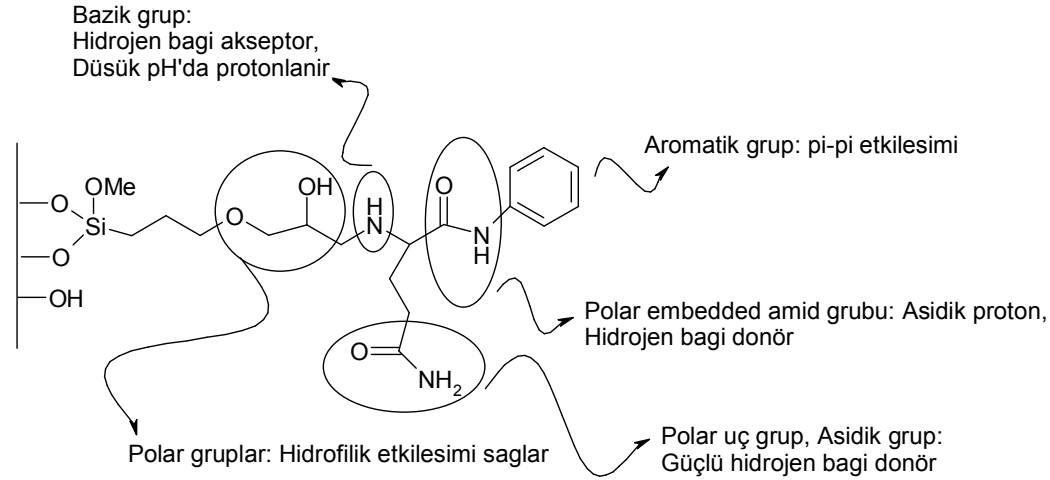
Dolgu maddelerinden SP1 apolar yapıdaki alifatik sikloheksil ve aromatik fenil gruplarını içermesinin yanı sıra polar amid ve amin gruplarını içeren polar gömülü yapıda bir dolgu maddesidir. SP2 ise uç kısmında serbest amid grubu, diğer bir uç kısmında ise fenil grubuna gömülü amid grubunun yanı sıra amin ve hidroksil gruplarını içermektedir (Şekil 5.1 ve 5.2). Dolayısıyla SP1 ile kıyaslandığında SP2 çok daha polar bir yapıya sahiptir. Nitekim kromatografik ayırma sonuçları da bunu kanıtlamaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin ayrılmasında SP1 ile SP2'yi kıyaslayacak olursak; SP1 dolgu maddesi 26 dakikada on iki tane analiti ayırırken SP2 dolgu maddesi 13 dakikada on bir tane analiti ayırabilmektedir. Ayrılan analit sayısına göre SP1 dolgu maddesi daha iyi gibi görünse de on bir analiti 13 dakika gibi çok kısa bir sürede ayırabilmesinden dolayı SP2 dolgu maddesinin daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz. Hareketli fazın pH değeri bitki büyüme düzenleyicilerinin ayrılmasında önemli bir etkiye sahiptir. Bitki büyüme düzenleyicileri arasında herbisit olarak bilinen klorlu asitler hareketli fazın asitliğinin artmasıyla alıkonma süreleri artmış, sitokininler olarak bilinen BAP, Z ve K'nin alıkonma süreleri azalmıştır. IAA, IPA ve IBA gibi indol türevi analitler hem asidik ve hem de bazik gruplar içerdiklerinden kolonu klorlu asitler ile sitokininler arasında bir yerde terk etmiştir. Aynı analit sınıfı içerisinde polar olmayan analitler genellikle kolonu daha geç terk etse de, farklı sınıflar arasında kolonu terk etme süresi karmaşıktır. Aynı analit sınıfında yer alan IAA, IBA ve IPA arasında en apolar olan IBA kolonu en geç terk ederken apolarlığı daha düşük olan IAA kolonu daha erken terk etmiştir. Aynı şekilde sitokininler arasında en bazik olan Z kolonu en erken terk ederken bazikliği daha düşük olan BAP kolonu daha geç terk etmiştir. Her iki durumda da, üç bileşik de aynı polar gruplar fakat farklı apolar gruplar içerir. Bundan dolayı daha apolar bileşik kolonu daha geç terk eder. Ayrıca, optimum pH'da en bazik olan Z'nin kolonu en geç terk etmesi beklenirken bunun aksine kolonu diğer sitokininlere göre daha erken terk etmiştir. Bu da burada sitokininlerin kolonu terk etme sırasının polaritelerine bağlı olduğunu gösterir. Zaten şekil 4.2'de görüldüğü gibi

sitokininler arasında en polar olan Z kolonu en önce polarlığı en düşük olan BAP ise kolonu en geç terk etmiştir.



Şekil 5.1. SP1 Dolgu maddesinin yapısı



Şekil 5.2. SP2 Dolgu maddesinin yapısı

Optimum pH'da herbisit olarak bilinen klorlu asitlerin kolonu terk etme sırasına bakıldığında 4-PA klorlu asitler arasında en polar olmasından dolayı kolonu en erken terk etmiştir. Daha sonra 2,4-D ve 2,4-DP kolonu terk etmektedir. 2,4-D ile 2,4-DP'nin asitlikleri birbirine oldukça yakın olup yapısal olarak 2,4-DP'nin yapısında fazladan bir metil grubu bulunmakta ve dolayısıyla 2,4-D'ye göre daha apolar karakterlidir. Bundan dolayı 2,4-DP kolonu 2,4-D'den daha geç terk etmiştir. 2,4,5-T ise 2,4-DP'den sonra kolonu terk etmiştir. Çünkü 2,4,5-T'nin yapısında üç tane klor atomu bulunmaktadır ve

klor atomları yapıya apolar karakter kazandırmıştır. Bundan dolayı da klorlu asitler arasında kolonu dördüncü sırada terk etmiştir. 2,4-DB ise bu asitler arasında en apolar karakterli olandır. Bundan dolayı da kolonu en geç terk eden analittir.

Yüksek polariteye ve bazlık gücüne sahip nükleotit ve nükleozitler genellikle HILIC koşulları altında ayrılabilir. C₁₈ gibi apolar kolonlar bu bileşiklerin ayrılmasında başarısız olmaktadır. Bunların ayrılması için yüksek polarlığa sahip dolgu maddelerine ihtiyaç vardır. Apolar özelliği ağır basan polar-gömülü yapıdaki **SP1** dolgu maddesi ile HILIC şartları altında bazı nükleotit ve nükleozitler ayrılabilir. Ancak polar yapıdaki **SP2** bu bileşiklerin ayrılması için çok daha ideal bir dolgu maddesidir. Elde edilen sonuçlar bu dolgu maddesinin nükleotit ve nükleozitlerin ayrılması için ticari olarak mevcut en önemli HILIC kolonlar ile yarışabilecek düzeyde olduğunu göstermektedir. HILIC modda genel olarak polar olan analitler kolonu geç terk eder. Nükleozitlerin kolonu terk etme sırasına bakıldığında pirimidin halkasına sahip timidin, üridin ve sitidin arasında timidin>üridin>sitidin şeklindedir. Bunda hem bazlık gücünün hem de analitlerin polaritelerinin etkili olduğu görülmektedir. Şöyle ki K_{b1} değeri 7.10⁻² olan timidin kolonu K_{b1} değeri 3.10⁻² olan üridinden daha önce terk etmiştir. Optimum pH'nın asidik bir değerde olması bazlık gücü daha yüksek olan timidin kolonu daha önce terk etmesini doğrulamaktadır. Ayrıca timidindeki fazladan bir metil grubunun varlığı yapıya apolarlık kazandırmıştır. Bu yüzden timidin kolonu üridinden daha önce terk etmiştir. Bu da HILIC modda beklenen bir durumdur. Kolonu daha sonra pürin halkasına sahip olan adenozin terk etmiştir. Çünkü pürin halkası birbirine kaynaşmış olan imidazol ve pirimidin halkasından yani iki aromatik halkadan oluşmaktadır. Fazla aromatik halka yapıya ekstradan bir apolarite katmaktadır. Bundan dolayı adenozin kolonu üçüncü sırada terk etmiştir. Guanozinde ise adenozine göre bir tane fazladan karbonil grubu mevcut olması guanozinin daha polar olmasını sağlar. Böylece guanozin kolonu adenozinden sonra terk eder. Tüm nükleozitler arasında kolonu en geç sitidin terk etmiştir. Bu da sitidinin en polar analit olmasından kaynaklanır. Nitekim bu durum HILIC ayırma mekanizmasına da uymaktadır.

Fenolik bileşiklerin ayrılmasında her iki dolgu maddesi ile de analitlerin kolonu terk etme sırası ters-faz modu ile tamamen uyuşmaktadır. En polar olan gallik asit kolonu ilk sırada terk etmiştir. Diğer bileşiklerin de apolaritesi arttıkça alıkonma süreleri de artmıştır. Burada üzerinde durulması gereken nokta o-kumarik asit ile p-

kumarik asitin kolonu terk etme sırasındır. O-kumarik asit dipol momentini daha yüksek olmasına karşın kolonu daha geç terk etmiştir. Ancak çalışılan pH'da fenolik OH grubu muhtemelen protonlanmış formda olduğu için OH grubu elektron salıcı değil elektron çekici duruma geçmiştir. Bu nedenle p-kumarik asit o-kumarik asitten daha polardır (dipol momentini daha yüksektir). Alıkonma süreleri de bu düşünceyi güçlendirmektedir. Flavanoitleri kendi arasında kıyasladığımızda ters-faz mantığı burada da geçerlidir. Yani en polar olan katesin kolonu en erken terk ederken en apolar olan quavasetin kolonu en geç terk etmiştir.

Süstitüe anilinler her iki dolgu maddesi ile de asidik tampon içeren hareketli fazla ayrılmıştır. Bundan dolayı asidik şartlarda tüm anilinler protonlanmış formda bulunur. Normalde elektron salıcı $-NH_2$ grubu NH_3^+ formuna dönüştüğü için elektron çekici konumuna gelir. Böylece, p-toluidin o-toluidinden daha polar özellik gösterdiği için kolonu daha erken terk etmiştir. P-aminoanilin kolonu en erken terk ettiği görülmektedir. Dipol momentine bakılırsa sıfır, yani apolar karakterlidir. Ancak iki tane amonyum grubu sudaki çözünürlüğünü arttırmıştır. Şöyle ki hareketli faz ile iyon-dipol ve hidrojen bağı etkileşiminden dolayı kolonu en erken terk eder. Kısacası analitlerin polariteleri hareketli fazdaki çözünürlüklerini etkilediğinden alıkonma süresini değiştirir. Dolgu maddesi ile olan baskın etkileşim pi-pi etkileşimi (hidrofobik etkileşim) olmalıdır. Ancak, 7-10 numaralı anilinlerde elektron çekici süstitüentler bulunduğundan amin grubunun bazlığını ciddi oranda azaltır. Bu da çalışılan pH'da aminin protonlanmasını azaltır. Nitekim 7'nin 8'den daha erken kolonu terk etmesi bunların protonlanmamış formda bulunduğunu gösterir. Şayet bunlar protonlanmış olsaydı 8 nolu anilin 7'den daha polar olacaktı. Ama bu şekilde olmadığı şekil 4.24 ve 4.25'te görülmektedir. 10 nolu analit 7, 8 ve 9'dan daha polardır. Çünkü nitro grubu klora göre daha güçlü elektron çekici olduğu için net dipol momentini daha çok artırır. Böylece 10 daha polar olduğundan kolonu 7, 8 ve 9'a göre daha erken terk etmesi beklenen bir durumdur. 9 ise en apolar karakterli olduğundan kolonu en geç terk eden analittir.

Genel olarak sudan boyalarında apolar olan kolonu en geç terk etmiştir. Ancak burada durum daha karmaşıktır. Çünkü asetonitril bakımından daha yüksek oranda hareketli faz kullanılmıştır. Dolayısıyla kısmen, apolar olanın kolonu daha erken terk etmesi de beklenebilir. Nitekim bu karmaşık durum kromatograma da yansımıştır.

Sudan-II sudan-I'den daha apolar olmasına karşın kolonu daha erken terk ederken daha yüksek apolariteye sahip sudan-III ve sudan-IV ters-faz mantığına uygun bir şekilde kolonu daha geç terk etmiştir. Katyonik amin grubuna sahip sudan-black polarite kazandığından dolayı orta sıralarda kolonu terk etmesi de normal bir durumdur. Sudan boyalarının ayrılmasında **SP1** çok iyi bir sonuç gösterirken **SP2** ile herhangi bir ayırma yapılamamıştır. Sudan boyaları oldukça yüksek apolariteye sahip bileşiklerdir. **SP2** ise oldukça polar yapıda bir dolgu maddesidir. Bundan dolayı Sudan boyaları gibi yüksek apolariteye sahip bileşiklerin ayrılmasına uygun bir dolgu maddesi değildir. **SP1** dolgu maddesinin Sudan boyalarına karşı piyasada mevcut olan kolonlar arasında en etkin birkaç kolondan biri olduğunu söyleyebiliriz.

Genel bir değerlendirme yapacak olursak; orta derecede bir polarlığa sahip olan polar gömülü özellikteki **SP1** dolgu maddesi orta polarlıktaki analitlere karşı yüksek selektivite göstermektedir. Bununla beraber çok yüksek polarlıktaki analitleri de ayırabilmektedir. Yüksek apolariteye sahip Sudan boyalarına karşı da oldukça yüksek bir selektivite göstermiştir. Son birkaç yılda, Ma ve çalışma arkadaşlarının(2008) RP-C₁₈ kolon kullanarak LC-MS ile dört grup bitki büyüme düzenleyicisinin ayrımını 50 dakikalık analiz süresinde yapması ve tablo 4.2'de sudan boyalarının çeşitli kolonlarla ayrımını ifade eden çalışma (Zacharis ve ark. 2011) **SP1** dolgu maddesinin apolar ve orta polarlıktaki analitlerin ayrımı ve analizi için ideal bir kolon olduğunu ve piyasadaki mevcut kolonlarla yarışabilecek etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. **SP2** dolgu maddesi ise yüksek polariteye sahip olup HILIC özellik gösteren ve kısmen de apolaritesi olan bir kolon özelliği göstermektedir. Bu dolgu maddesi yüksek polariteye ve bazlığa sahip bileşiklerin ayrılmasında çok ideal olup orta polarlıktaki bazik ve asidik analitleri de ayırabilmektedir. Nitekim şekil 4.10'da nükleotit ve nükleozitlerin çeşitli ticari HILIC kolonlarla ayrımını gösteren kromatogramlar **SP2** dolgu maddesinin bu kolonlarla yarışabilecek nitelikte olduğunu göstermektedir. Ancak **SP2** dolgu maddesi çok yüksek apolariteye sahip bileşiklerin ayrılması için uygun değildir.

Bu iki dolgu maddesi piyasadaki polar gömülü ve HILIC kolonlara iyi birer alternatif sunmaktadır. Bu kolonlar kullanılarak monosakkaritler, çeşitli peptidler, çeşitli polar ilaçlar ve bunun gibi daha pek çok analit sınıfının başarı ile ayrılacağı kanısındayız. Bundan sonraki çalışmalarımız hazırlanan kolonlar ile yukarıda bahsi geçen analit sınıflarına uygulanabilirliğini araştırmak olacaktır. Ayrıca bu dolgu

maddeleri bu çalışma kapsamında ayrılması sağlanan model analitlerin çeşitli doğal numunelerdeki kantitatif tayininde kullanılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Ahlstrom, L.H., Eskilsson, C.S., Bjorklund, E. 2005. Determination of banned azo dyes in consumer goods. *Trends Anal. Chem.* 24: 49.
- Ali, M.S., Rafiuddin, S., Al-Jawi, D.A., Al-Hetari, Y., Ghori, M.U.H., Khatri, A.R. 2008. Stability-indicating assay of sodium cromoglicate in ophthalmic solution using mixed-mode hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 31: 1645.
- Alpert, A.J. 1983. Cation-exchange high-performance liquid chromatography of proteins on poly(aspartic acid)—silica. *J. Chromatogr. A*, 266: 23-37
- Alpert, A.J., Andrews, P.C. 1988. Cation-exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica. *J. Chromatogr. A*, 443: 85-96
- Alpert, A.J. 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A*, 499: 177-196
- Alpert, A.J., Shukla, M., Shukla, A.K., Zieske, L.R., Yuen, S.W., Ferguson, M.A.J., Mehlert, A., Pauly, M., Orlando, R. 1994. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *J. Chromatogr. A*, 676: 191-202
- Arabacı, T. 2008. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi İçin Moleküler Zincir İçeren Kolon Materyallerinin Sentezi ve Nükleotid Ayırımında Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 15-20.
- Armstrong, D.W., Jin, H.L. 1989. Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *J. Chromatogr. A*, 462: 219-232.
- Ascah, T.L., Feibush, B. 1990. Novel, highly deactivated reversed-phase for basic compounds. *J. Chromatogr. A*, 506: 357.
- Ascah, T.L., Kallury, K.M.L., Szafranski, C.A., Corman, S.D., Lui, F. 1996. Characterization and High Performance Liquid Chromatographic Evaluation of a New Amide-Functionalized Reversed Phase Column. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19: 3049-3073.
- Bidlingmeyer, B.A., Del Rios, J.K., Korpi, J. 1982. Separation of organic amine compounds on silica gel with reversed-phase eluents *Anal. Chem.* 54: 442-447.
- Berthod, A., Chang, S.S.C., Kullman, J.P.S., Armstrong, D.W. 1998. Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase. *Talanta*, 47: 1001-1012.

- Bicker, W., Wu, J.Y., Lammerhofer, M., Lindner, W. 2008. Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica-based packings with noncharged polar bondings. *J. Sep. Sci.*, 31: 2971.
- Blahova, E., Jandera, P., Cacciola, F., Mondello, L. 2006. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns. *J. Sep. Sci.*, 29: 555.
- Boersma, P.J., Divecha, N., Heck, A.J.R., Mohammed, S. 2007. Evaluation and Optimization of ZIC-HILIC-RP as an Alternative MudPIT Strategy. *J. Proteome Res.*, 6: 937.
- Buckenmaier, S.M.C., McCalley, D.V., Euerby, M.R. 2004. Rationalisation of unusual changes in efficiency and retention with temperature shown for bases in reversed-phase high-performance liquid chromatography at intermediate pH. *J. Chromatogr. A*, 1060: 117-126.
- Buszewski, B., Noga, S. 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402:231-247.
- Chen, M.H., Horvath, C. 1997. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. *J. Chromatogr. A*, 788: 51-61.
- Cooke, N.H.C., Olsen, K. 1980. Some Modern Concepts in Reversed-Phase Liquid Chromatography on Chemically Bonded Alkyl Stationary Phases. *J. Chromatogr. Sci.*, 18: 512-524.
- Cox, G.B., Stout, R.W. 1987. Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under "pseudo-reversed-phase" conditions. *J. Chromatogr. A*, 384: 315-336.
- Cox, G.B. 1993. The influence of silica structure on reversed-phase retention. *J. Chromatogr. A*, 656: 353-367.
- Chamarro, J., Ostin, A., Sandberg, G. 2001. Metabolism of indole-3-acetic acid by orange (*Citrus sinensis*) flavedo tissue during fruit development. *Phytochemistry*, 57: 179-187.
- Chiwocha, S.D.S., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Loewen, M., Ross, A.R.S., Kermod, A.R. 2003. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35: 405-417.
- Curren, M.S., King, J.W. 2002. New sample preparation technique for the determination of avoparcin in pressurized hot water extracts from kidney samples. *J. Chromatogr. A*, 954: 41-49.

Dallet, P., Labat, L., Kummer, E., Dubost, J.P. 2000. Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B*, 742: 447.

Daunoravicius, Z.,Juknaite, I., Naujalis, E., Padarauskas, A. 2006. Simple and Rapid Determination of Denaturants in Alcohol Formulations by Hydrophilic Interaction Chromatography. *Chromatographia*, 63: 373.

Dejaegher, B.,Mangelins, D., VanderHeyden, Y. 2008. Method development for HILIC assays . *J. Sep. Sci.*, 31: 1438.

Dell'Aversan, C., Eaglesham, G.K., Quilliam, M.A. 2004. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1028: 155.

Dobrev, P.I., Kamínek, M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J.Chromatogr. A*, 950: 21-29.

Dobrev, P.I., Havlíček, L., Vágner, M., Malbeck, J., Kamínek, M. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 1075: 159-166.

Dorsey, J.G., Cooper, W.T. 1994. Retention mechanisms of bonded phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 66:857A-866A.

dosSantosPereira, A.,JimenezGiron, A., Admasu, E., Sandra, P. 2010. Green hydrophilic interaction chromatography using ethanol–water–carbon dioxide mixtures . *J. Sep. Sci.*, 33: 834.

Downham, A., Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35: 5.

Engelhardt, H.,Mathes, D. 1977. Chemically bonded stationary phases for aqueous high-performance exclusion chromatography. *J.Chromatogr. A*, 142: 311-320.

Engelhardt, H.,Mathes, D. 1979. High-performance exclusion chromatography of water- soluble polymers with chemically bonded stationary phases. *J.Chromatogr. A*, 185: 305-319

Engelhardt, H.,Ahr, G., Hearn, M.T.W. 1981. Experimental Studies with a Bonded N-acetylaminopropylsilica Stationary Phase for the Aqueous High Performance Exclusion Chromatography of Polypeptides and Proteins. *J.Liq.Chromatogr.*, 4: 1361.

Erdemir, S., Yılmaz, M. 2010. Preparation of a new 1,3-alternate-calix[4]arene-bonded HPLC stationary phase for the separation of phenols, aromatic amines and drugs. *Talanta*, 82: 1240-1260.

- Euerby, M.R., Petersson, P. 2005. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis. *J.Chromatogr.A*, 1088: 1-15
- Euerby, M.R., Petersson, P., Campbell, W., Roe, W. 2007. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis. *J. Chromatogr. A*, 1154: 138-151.
- Fountain, K.J., Xu, J., Diehl, D.M., Morrison, D. 2010. Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 33: 740.
- Garbis, S.D., Melse-Boonstra, A., West, C.E., van Breemen, R.B. 2001. Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 73: 5358.
- Gezici, O., Tabakci, M., Kara, H., Yilmaz, M. 2006. Synthesis of p - tert - Butylcalix[4]arene Dinitrile Bonded Aminopropyl Silica and Investigating Its Usability as a Stationary Phase in HPLC. *J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem.*, 43: 221.
- Gezici, O., Kara, H. 2011. Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and HILIC behavior. *Talanta*, 85: 1472-1482.
- Gomez-Cadenaz, A., Pozo, O.J., Garcia-Augustin, P., Sancho, J.V. 2002. Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography—electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, 13: 228-234.
- Gotmar, G., Fornstedt, T., Guiochon, G. 1999. Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography: Dependence on the column length and the linear velocity of the mobile phase. *J. Chromatogr. A*, 831: 17-35.
- Guinebault, P., Broquaire, M. 1981. Large-volume injection of samples dissolved in a non-eluting solvent : Application to the determination of antipyrine using normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 217: 509-522
- Guo, Y., Gaiki, S. 2011. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr.A*, 1218: 5920-5938.
- Guo, Y., Gaiki, S. 2005. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A*, 1074: 71.

Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S. 2007. Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment. *Chromatographia*, 66: 223.

Grumbach, E.S., Diehl, D.M., Neue, U.D. 2008. The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 31: 1511.

Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C.R.K., Seth, A., Jha, B. 2011. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiol and Biochem*, 49: 1259-1263.

Gritti, F., Guiochon, G. 2004. Effect of the ionic strength of the solution and the nature of its ions on the adsorption mechanism of ionic species in RPLC: III. Equilibrium isotherms and overloaded band profiles on Kromasil-C₁₈. *J. Chromatogr. A*, 1047: 33-48.

Gritti, F., Guiochon, G. 2005. Effect of the endcapping of reversed-phase high-performance liquid chromatography adsorbents on the adsorption isotherm. *J. Chromatogr. A*, 1098: 82-94.

Gritti, F., Guiochon, G. 2005. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1099: 1-42.

Gritti, F., Guiochon, G. 2006. A chromatographic estimate of the degree of surface heterogeneity of reversed-phase liquid chromatography packing materials: II-Endcapped monomeric C₁₈-bonded stationary phase. *J. Chromatogr. A*, 1103: 57-68.

Gritti, F., Guiochon, G. 2006. A chromatographic estimate of the degree of surface heterogeneity of RPLC packing materials: III. Endcapped amido-embedded reversed phase. *J. Chromatogr. A*, 1103: 69-82.

Hao, Z.G., Xiao, B.M., Weng, N.D. 2008. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J. Sep. Sci.*, 31: 1449-1464.

Hartmann, E., Chen, Y., Mant, C.T., Jungbauer, A., Hodges, R.S. 2003. Comparison of reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for the separation of amphipathic α -helical peptides with L- and D-amino acid substitutions in the hydrophilic face. *J. Chromatogr. A*, 1009: 61-71.

Idborg, H., Zamani, L., Edlund, P.O., Schuppe-Koistinen, I., Jacobsson, S.P. 2005. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 828: 9.

- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N. 2008. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1184: 474.
- Jandera, P. 2008. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J. Sep. Sci.*, 31: 1421.
- Jandera, P., Hajek, T. 2009. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J. Sep. Sci.*, 32: 3603.
- Jandera, P., Hajek, T., Skeşrikova, V., Soukup, J. 2010. Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *J. Sep. Sci.*, 33: 841.
- Jandera P. 2011. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692: 1-25.
- Jaroniec, C.P., Gilpin, R.K., Jaroniec, M. 1998. Comparative studies of chromatographic properties of silica-based amide-bonded phases under hydro-organic conditions. *J. Chromatogr. A*, 797: 103.
- Jian, W., Edom, R.W., Xu, Y., Weng, N. 2010. Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *J. Sep. Sci.*, 33: 681.
- Jiang, W., Irgum, K. 1999. Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions. *Anal. Chem.*, 71: 333-344.
- Jiang, W., Irgum, K. 2002. Tentacle-Type Zwitterionic Stationary Phase Prepared by Surface-Initiated Graft Polymerization of 3-[*N,N*-Dimethyl-*N*-(Methacryloyloxyethyl)-ammonium] Propanesulfonate through Peroxide Groups Tethered on Porous Silica. *Anal. Chem.*, 74: 4682-4687.
- Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H. 2005. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A*, 1092: 246-249
- Kawachi, Y., Ikeami, T., Takubo, H., Ikeami Y., Miyamoto, M., Tanaka, N. 2011. Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *J. Chromatogr. A*, 1218: 5903-5919.

Kayillo, S., Dennis, G.R., Shalliker, R.A. 2006. An assessment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C18 and phenyl-type surfaces. *J. Chromatogr. A*, 1126: 283-297.

Kelen, M., Demiralay, E.C., Şen, S., Ozkan, G. 2004. Separation of Abscisic acid, Indole -3- acetic acid, Gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose oil (*Rosa Damascena* mill.) by reversed phase liquid chromatography. *Turk. J. Chem.*, 28: 603-610.

Kimura, T., Nakagawa, K., Saito, Y., Yamagishi, K., Suzuki, M., Yamaki, K., Shinmoto, H., Miyazawa, T. 2004. Determination of 1-Deoxyojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1415.

Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Farlee, R.D. 1989. Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings. *Anal. Chem.* 61: 2-11.

Kirkland, J.J., vanStraten, M.A., Claessens, H.A. 1995. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*, 691: 3-19.

Kirkland, J.J., Henderson, J.W., DeStefano, J.J., vanStraten, M.A., Claessens, H.A. 1997. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 762: 97-112.

Kirkland, J.J., vanStraten, M.A., Claessens, H.A. 1998. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A*, 797: 111-120.

Kirkland, J.J., Adams Jr., J.B., vanStraten, M.A., Claessens, H.A. 1998. Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography *Anal. Chem.*, 70: 4344

Kirkland, J.J., Truszkowski, F.A., Ricker, R.D. 2002. Atypical silica-based column packings for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 965: 25-34.

Kirkland, J.J. 2004. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr. A*, 1060: 9-21.

Kobayashi, S., Tanaka, I., Shirota, O., Kanda, T., Ohtsu, Y. 1998. Synthesis and characterization of a polymer-coated C₁₈ stationary phase with high carbon content for liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 828: 75-81.

- Kowalska, S., Krupczynska, K., Buszewski, B. 2006. Some remarks on characterization and application of stationary phases for RP-HPLC determination of biologically important compounds. *Biomed.Chromatogr.*, 20: 4.
- Kučera, R., Kovaříková, Klivický, M., Klimeš, J. 2011. The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions. *J.Chromatogr.A*, 1218: 6981-6986.
- Layne, J., Farcas, T., Rustamov, I., Ahmed, F. 2001. Volume-load capacity in fast-gradient liquid chromatography: Effect of sample solvent composition and injection volume on chromatographic performance. *J. Chromatogr. A*, 913: 233-242.
- Layne, J. 2002. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-encapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases. *J.Chromatogr. A*, 957: 149-164.
- Lämmerhofer, M., Nogueira, R., Lindner, W. 2011. 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.*, 400:2517-2530.
- Li, J.W., Carr, P.W. 1997. Effect of Temperature on the Thermodynamic Properties, Kinetic Performance, and Stability of Polybutadiene-Coated Zirconia. *Anal.Chem.*, 69: 837-843.
- Li, J.W., Carr, P.W. 1997. Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene-Coated Zirconia. *Anal.Chem.*, 69: 2202-2206.
- Li, R., Huang, J. 2004. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1041: 163.
- Lindsay, D.G. 1986. Estimation of the dietary intake of chemicals in food. *Food Addit. Contam.*, 3: 71.
- Liu, X., Bordunov, A.V., Pohl, C.A. 2006. Preparation and evaluation of a hydrolytically stable amide-embedded stationary phase. *J.Chromatogr.A*, 1119: 128-134.
- Liu, M., Chen, E.X., Ji, R., Semin, D. 2008. Stability indicating hydrophilic interaction liquid chromatography method for highly polar and basic compounds. *J.Chromatogr.A*, 1188: 255-263.
- Liu, Y., Xue, X., Guo, Z., Xu, Q., Zhang, F., Liang, X. 2008. Novel two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, an excellent orthogonal system for practical analysis. *J. Chromatogr. A*, 1208: 133-140.
- Loeser, E., Drumm, P. 2006. Using strong injection solvents with 100% aqueous mobile phase in RP-LC. *J. Sep. Sci.*, 29: 2847.

Ma, Z., Ge, L., Lee, A.S.Y., Yong, J.W.H., Tan, S.N., Ong, E.S. 2008. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta*, 610: 274-281.

Mao, Y., Carr, P.W. 2001. Separation of Selected Basic Pharmaceuticals by Reversed-Phase and Ion-Exchange Chromatography Using Thermally Tuned Tandem Columns. *Anal.Chem.* 73: 4478-4485.

Marclay, F., Saugy, M. 2010. Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry: Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players. *J. Chromatogr. A*, 1217: 7528-7538.

Marrubini, G., Castillo-Mendoza, B.E., Massolini, G. 2010. Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 33: 803

McCalley, D.V. 1999. Comparison of the performance of conventional C₁₈ phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 844: 23-38.

McCalley, D.V. 2000. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *J. Chromatogr. A* 902: 311-321

McCalley, D.V. 2007. Is hydrophilic interaction chromatography with silicacolumns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?. *J.Chromatogr.A*,1171:46-55

McCalley, D.V. 2010. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *J.Chromatogr.A*, 1217:858-880.

McClintic, C., Remick, D.M., Peterson, J.A., Risley, D.S. 2003. Novel Method for the Determination of Piperazine in Pharmaceutical Drug Substances Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection. *J.Liq.Chromatogr. Relat. Tech.* 26: 3093.

Merchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Snyder, L.R. 2005. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VII. Cyanopropyl columns. *J. Chromatogr. A*, 1062: 57-64.

Méndez, A., Bosch, E., Rosés, M., Neue, U.D. 2003. Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A*, 986: 33-44.

Moni, L., Ciogli, A., Acquarica, I.D., Dondoni, A., Gasparrini, F., Marra, A. 2010. Synthesis of Sugar-Based Silica Gels by Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition via a Single-Step Azido-Activated Silica Intermediate and the Use of the Gels in Hydrophilic Interaction Chromatography. *Chem.Eur. J.*, 16: 5712.

Nahum, A., Horváth, C. 1981. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases : I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A*, 203: 53-63.

Nawrocki, J. 1997. The silanol group and its role in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 779: 29-71.

Nawrocki, J., Dunlap, C., McCormick, A., Carr, P.W. 2004. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, 1028: 1-30.

Nawrocki, J. 1997. The silanol group and its role in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 779: 29-71.

Neue, U.D., Alden, B.A., Walter, T.H. 1999. Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: II. Classification of reversed-phase packings. *J. Chromatogr. A*, 849: 101-116

Neue, U.D., Cheng, Y.F., Lu, Z., Alden, B.A., Iraneta, P.C., Phoebe, C.H., Van Tran, K. 2001. Properties of reversed phase packings with an embedded polar group. *Chromatographia*, 54: 169.

Neue, U.D., Hudalla, C.J., Iraneta, P.C. 2010. Influence of pressure on the retention of sugars in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, 33: 838.

Nguyen, H.P., Yang, S.H., Wigginton, J.G., Simpkins, J.W., Schug, K.A. 2010. Retention behavior of estrogen metabolites on hydrophilic interaction chromatography stationary phases. *J. Sep. Sci.*, 33: 793.

Oertel, R., Renner, U., Kirch, W. 2004. Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35: 633.

Oertel, R., Renner, U., Kirch, W. 2004. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J. Chromatogr. A*, 1058: 197-201.

O'Gara, J., Alden, B., Walter, T., Petersen, J., Niederlander, C., Neue, U. 1995. Simple preparation of a C8 HPLC stationary phase with an internal polar functional group. *Anal. Chem.*, 67: 3809-3813.

Olsen, B.A. 2001. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, 913: 113

Oyler, A.R., Armstrong, B.L., Cha, J.Y., Zhou, M.X., Yang, Q., Robinson, R.I., Dunphy, R., Burinsky, D.J. 1996. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *J. Chromatogr. A*, 724: 378-383.

Papp, E., Vigh, G. 1983. Role of buffer cations in the reversed-phase high-performance liquid chromatography of aromatic amines : I. Methanol-rich eluents. *J. Chromatogr. A*, 259: 49-58.

Pesek, J.J., Matyska, M.T., Yu, R.J. 2002. Synthesis and characterization of endcapped C₁₈ stationary phases using a silica hydride intermediate. *J. Chromatogr. A*, 947: 195-203.

Qiu, H., Liang, X., Sun, M., Jiang, S. 2011. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.*, 399:3307-3322.

Quach, V. 2009. Evaluation of Polar-Embedded Reversed-Phase Liquid Chromatography Columns and the Temperature Dependence of the Phase Ratio. Doktora tezi, Florida State University, Department of Chemistry and Biochemistry, 2-8, 12-18, 50.

Quiming, N.S., Denola, N.L., Soliev, A.B., Saito, Y., Jinno, K. 2007. Retention behavior of ginsenosides on a poly(vinyl alcohol)-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 1477.

Regnier, F.E., Noel, R. 1976. Glycerolpropylsilane Bonded Phases in the Steric Exclusion Chromatography of Biological Macromolecules. *J. Chromatogr. Sci.*, 14: 316-320.

Reta, M., Carr, P.W. 1999. Comparative study of divalent metals and amines as silanol-blocking agents in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 855: 121-127.

Rimmer, C.A., Sander, L.C., Wise, S.A., Dorsey, J.G. 2003. Synthesis and characterization of C₁₃ to C₁₈ stationary phases by monomeric, solution polymerized, and surface polymerized approaches. *J. Chromatogr. A*, 1007:11-20.

Risley, D.S., Stregge, M.A. 2000. Chiral Separations of Polar Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *Anal. Chem.*, 72: 1736-1739.

Ruderisch, A., Iwanek, W., Pfeiffer, J., Fischer, G., Albert, K., Schurig, V. 2005. Synthesis and characterization of a novel resorcinarene-based stationary phase bearing polar head groups for use in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1095: 40-49.

Sagliano, J.N., Floyd, T.R., Hartwick, R.A., Dibussolo, J.M., Miller, N.T. 1988. Studies on the stabilization of reversed phases for liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, 443: 155-172.

Sander, L.C., Wise, S.A. 1987. Recent Advances in Bonded Phases for Liquid chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 18: p.300.

Sander, L.C., Wise, S.A. 1987. Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase liquid chromatography *Anal. Chem.* 59: 2309-2313.

Sandi, A., Szepeszy, L. 1998. Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship: I. Evaluation based on retention factors. *J.Chromatogr. A*, 818:1-17

Sandi, A., Szepeszy, L. 1999. Evaluation and modulation of selectivity in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 845: 113-131.

Sandoval, J.E. 1999. Equation for calculating surface coverage from end-capping of chromatographic bonded phases. *J. Chromatogr. A*, 852: 375-381.

Schlichtherle-Cerny, H., Affloter, M., Cerny, C. 2003. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. *Anal. Chem.*, 75: 2349.

Shen, S., Lee, H., McCaffrey, J., Yee, N., Senanayake, C., Grinberg, N., Clark, J. 2012. High Temperature High Performance Liquid Chromatography of Substitued Anilines using a C₁₈ Hybrid Stationary Phase. *J.Liq.Chromatogr. Relat. Tech.*, 29: 19, 2823-2834.

Sitbon, F., Ostin, A., Sundberg, B., Olsson, O., Sandberg, G. 1993. Conjugation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Wild-Type and IAA-Overproducing Transgenic Tobacco Plants, and Identification of the Main Conjugates by Frit-Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Plant Physiol*, 101: 313-320.

Škeřikova, V., Jandera, P. 2010. Effects of the operation parameters on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns. *J. Chromatogr. A*, 1217: 7981.

Song, X., Budde, W.L. 1998. Determination of chlorinated acid herbicides and related compounds in water by capillary electrophoresis–electrospray negative ion mass spectrometry. *J.Chromatogr. A*, 829: 327-340.

Strege, M.A. 1998. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Anal. Chem.*, 70: 2439.

- Strege, M.A., Stevenson, S., Lawrence, S.M. 2000. Mixed-Mode Anion–Cation Exchange/Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry as an Alternative to Reversed Phase for Small Molecule Drug Discovery. *Anal. Chem.*, 72: 4629.
- Sunseri, J.D., Cooper, W.T., Dorsey, J.G. 2003. Reducing residual silanol interactions in reversed-phase liquid chromatography: Thermal treatment of silica before derivatization. *J. Chromatogr. A*, 1011: 23-29.
- Szeman, J.,Csabai, K., Kekesi, K., Szente, L., Varga, G. 2006. Novel stationary phases for high-performance liquid chromatography analysis of cyclodextrin derivatives. *J.Chromatogr.A*, 1116: 76-82.
- Takegawa, Y.,Deguchi, K., Keira, T., Ito, H., Nakagawa, H., Nishimura, S. 2006. Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized *N*-glycans and *N*-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1113: 177-181.
- Tolstikov, V.V.,Fiehn, O. 2002. Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, 301: 298.
- Trammell, B.C.,Boissel, C.A., Carignan, C., O’Shea, D.J., Hudalla, C.J., Neue, U.D., Iraneta, P.C. 2004. Development of an accelerated low-pH reversed-phase liquid chromatography column stability test. *J. Chromatogr. A*, 1060: 153-163.
- Unger, K.K.,Becker, N., Roumeliotis, P. 1976. Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 125: 115-127.
- Urban, J.,Škeřikova, V., Jandera, P., Kubičková, R., Pospíšilova, M. 2009. Preparation and characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds. *J. Sep. Sci.*, 32: 2530.
- Ünsal, E. 2006. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Farklı Polaritelere Sahip, Fonksiyonel Gruplu Dolgu Materyallerinin Sentezi ve Kromatografik Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 31-33.
- Vervoort, R.J.M., Maris, F.A., Hindriks, H. 1992. Comparison of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of basic drugs. *J. Chromatogr. A*, 623: 207-220.
- Viklund, C.,Irgum, K. 2000. Synthesis of Porous Zwitterionic Sulfobetaine Monoliths and Characterization of Their Interaction with Proteins. *Macromolecules*, 33: 2539.

- Vukmanic, D., Chiba, M. 1989. Effect of organic solvents in sample solutions and injection volumes on chromatographic peak profiles of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 483: 189-196.
- Wade, K.L., Garard, I.J., Fahey, J.W. 2007. Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *J. Chromatogr. A*, 1154: 469.
- Walter, T.H., Iraneta, P., Capparella, M. 2005. Mechanism of retention loss when C₈ and C₁₈ HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases. *J. Chromatogr. A*, 1075: 177-183.
- Wang, X., Li, W., Rasmussen, H.T. 2005. Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, 1083: 58-62
- Weber, G., von Wiren, N., Hayen, H. 2008. Hydrophilic interaction chromatography of small metal species in plants using sulfobetaine- and phosphorylcholine-type zwitterionic stationary phases. *J. Sep. Sci.*, 31: 1615.
- Welch, C.J., DaSilva, J.O., Nti-Gyabaah, J., Antina, F., Goklen, K., Boyd, R. 2005. Preparation and evaluation of novel stationary phases for improved chromatographic purification of pneumocandin B₀. *J. Chromatogr. A*, 1101: 204-213.
- Wikberg, E., Verhage, J.J., Viklund, C., Irgum, K. 2009. Grafting of silica with sulfobetaine polymers *via* aqueous reversible addition fragmentation chain transfer polymerization and its use as a stationary phase in HILIC. *J. Sep. Sci.*, 32: 2008.
- Wilson, N.S., Gilroy, J., Dolan, J.W., Synder, L.R. 2004. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VI. Columns with embedded or end-capping polar groups. *J. Chromatogr. A*, 1026: 91-100.
- Wirth, M.J., Fatunmbi, H.O. 1993. Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica. 2. Application to chromatographic silica gel. *Anal. Chem.*, 65: 822-826.
- Wirth, M.J., Ludes, M.D., Swinton, D.J. 1999. Spectroscopic Observation of Adsorption to Active Silanols. *Anal. Chem.*, 71: 3911-3917.
- Wu, J.Y., Bicker, W., Lindner, W. 2008. Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *J. Sep. Sci.*, 31: 1492.
- Wurst, M., Prikryl, Z., Vančura, V. 1980. High-performance liquid chromatography of plant hormones : I. Separation of plant hormones of the indole type. *J. Chromatogr. A*, 191: 129-136.

Wyndham, K.D., O'Gara, J.E., Walter, T.H., Glose, K.H., Lawrence, N.L., Alden, B.A., Izzo, G.S., Hudalla, C.J., Iraneta, P.C. 2003. Characterization and Evaluation of C₁₈ HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal.Chem.*, 75: 6781-6788.

Ye, j., Wu, J., Liu, W. 2009. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography *Trends Anal Chem* 28:1148-1163.

Yoshida, T. 1997. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography *Anal. Chem.*, 69: 3038-3043.

Yoshida, T., Okada, T. 1999. Peptide separation in normal-phase liquid chromatography: Study of selectivity and mobile phase effects on various columns. *J. Chromatogr. A*, 840: 1-9.

Zacharis, C.K., Kika, F.S., Tzanavaras, P.D., Rigas, Pantelis, Kyranas, E.R. 2011. Development and validation of rapid HPLC method for the determination of five banned fat-soluble colorants in spices using a narrow-bore monolithic column. *Talanta*, 84: 480-486.

Zhang, W. 2008. Fluorinated Stationary Phases for HPLC Applications. *J. FluorineChem.* 129: 910-919.

Zhang, H., Guo, Z., Zhang, F., Xu, Q., Liang, X. 2008. HILIC for separation of co-eluted flavonoids under RP-HPLC mode. *J. Sep. Sci.*, 31: 1623.

Zhang, Y., Yao, S., Zeng, H., Song, H. 2010. Chiral Separation of Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography *CurrPharm Anal* 6:114-130.

Zhou, R., Squires, T.M., Ambrose, S.J., Abrams, S.R., Ross, A.R.S., Cutler, A.J. 2003. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. A*, 1010: 75-85.

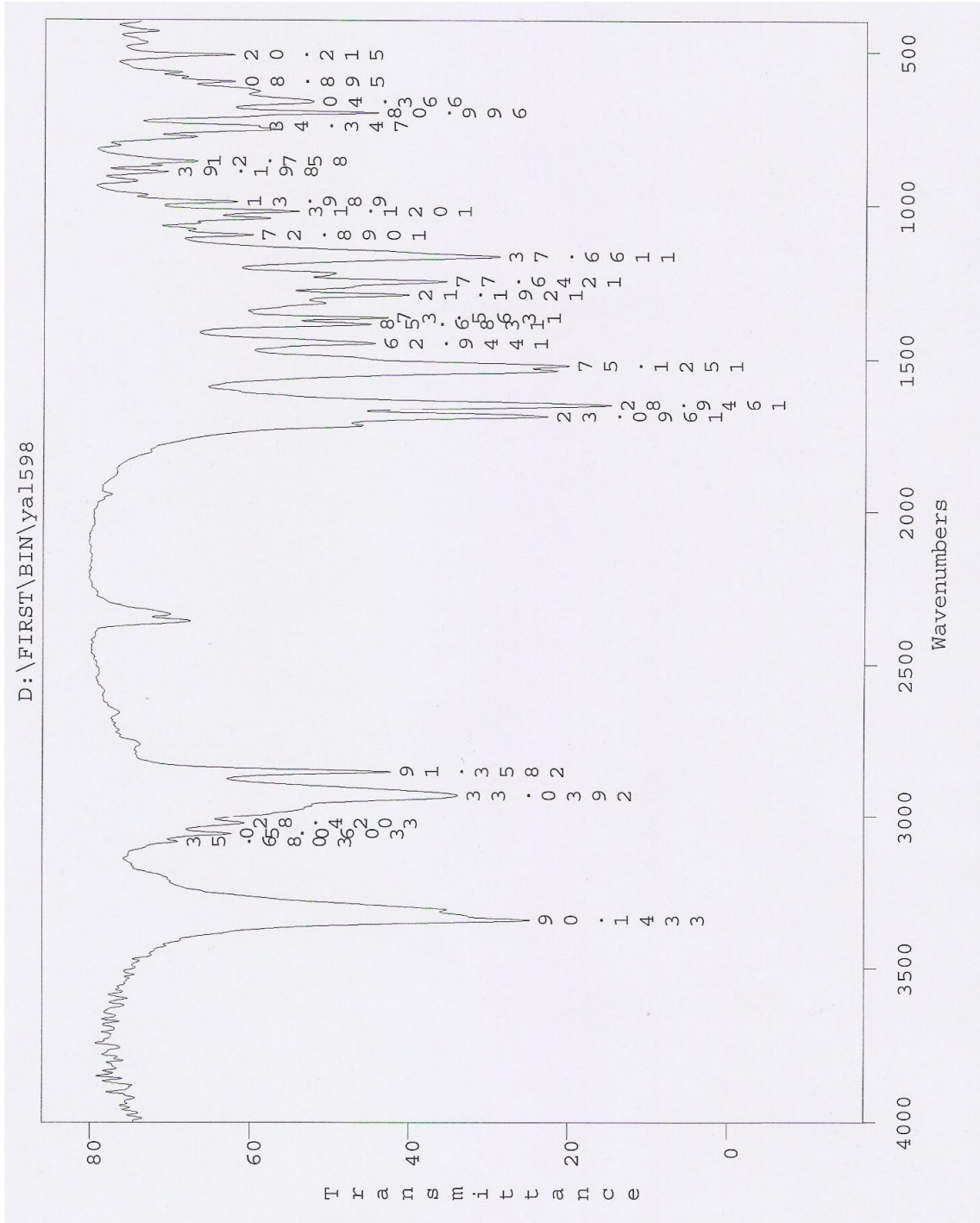
Zhou, L., Welch, C., Lee, C., Gong, X., Antonucci, V., Ge, Z. 2009. Development of LC chiral methods for neutral pharmaceutical related compounds using reversed phase and normal phase liquid chromatography with different types of polysaccharide stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 964-969.

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

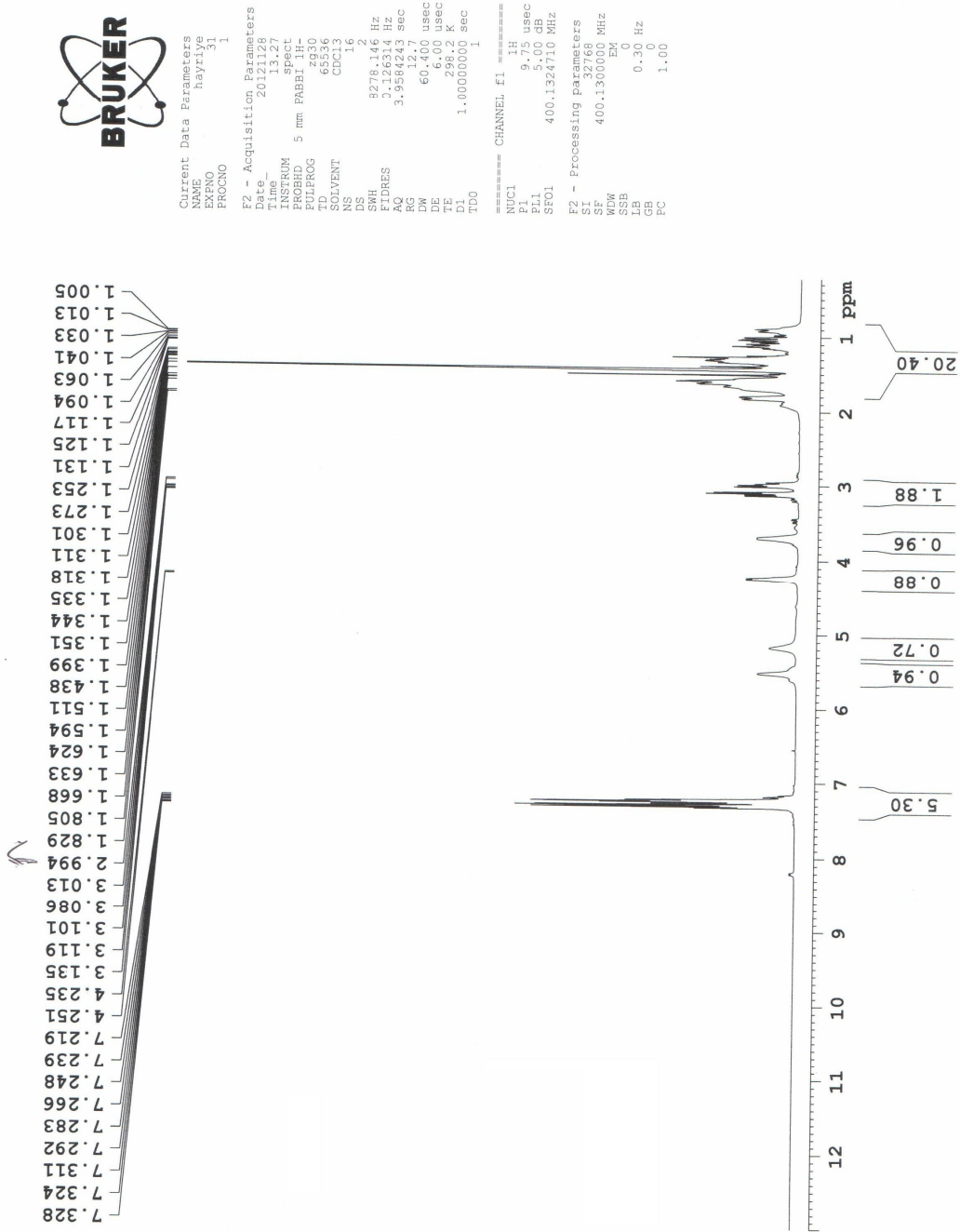
Zhu, P.L., Dolan, J.W., Snyder, L.R., Hill, D.W., Van Heukelem, L., Waeghe, T.J. 1996. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution III. Selectivity for ionizable samples as a function of sample type and pH. *J.Chromatogr. A*, 756: 51-62.

EKLER

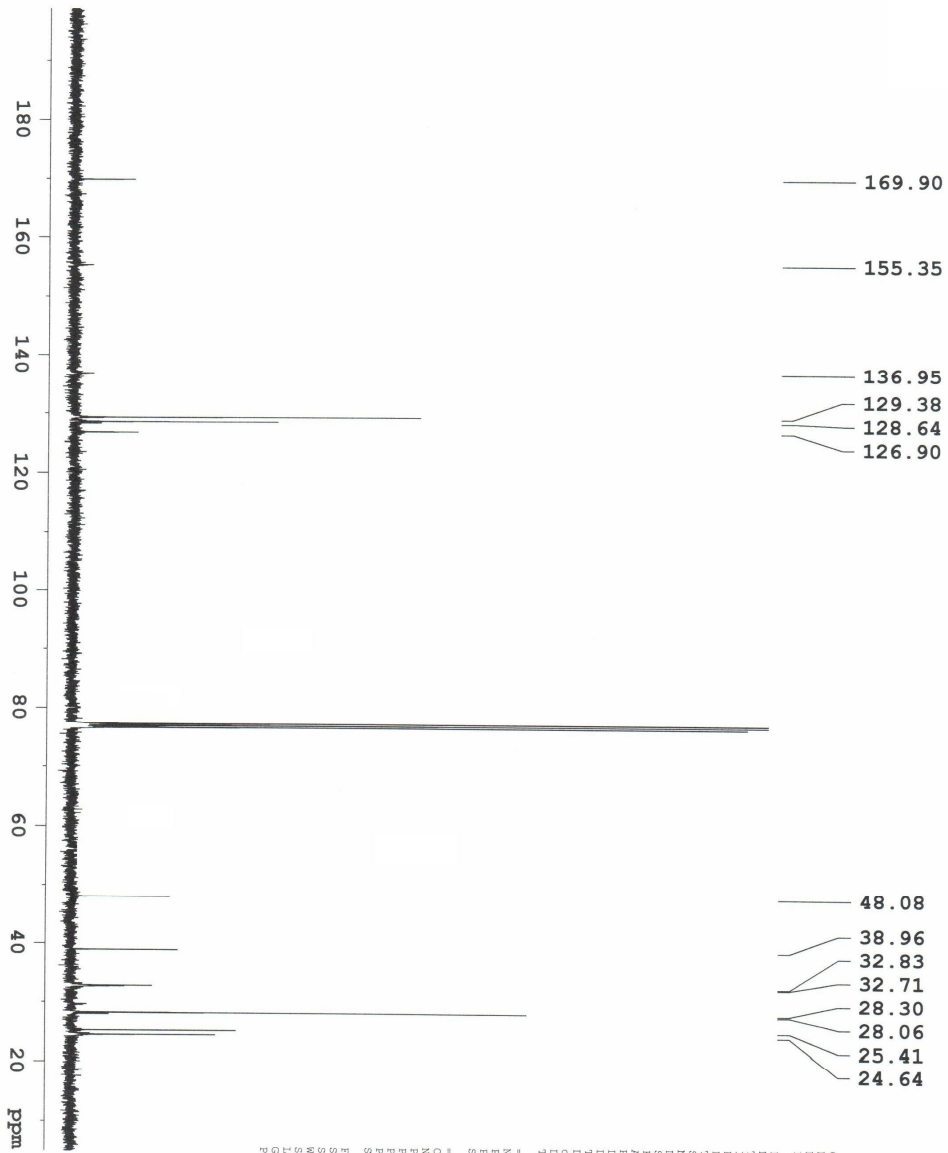
EK 1. N-boc-N'-sikloheksilfenilalanamid'in IR spektrumu



EK 2. N-boc-N'-sikloheksilfenilalanamid'in ¹H NMR Spektrumu



EK 3. N-boc-N'-sikloheksilfenilalanamid'in ¹³C NMR Spektrumu



Current Data Parameters
 NAME Hayriye
 EXPNO 32
 PROCNO 1

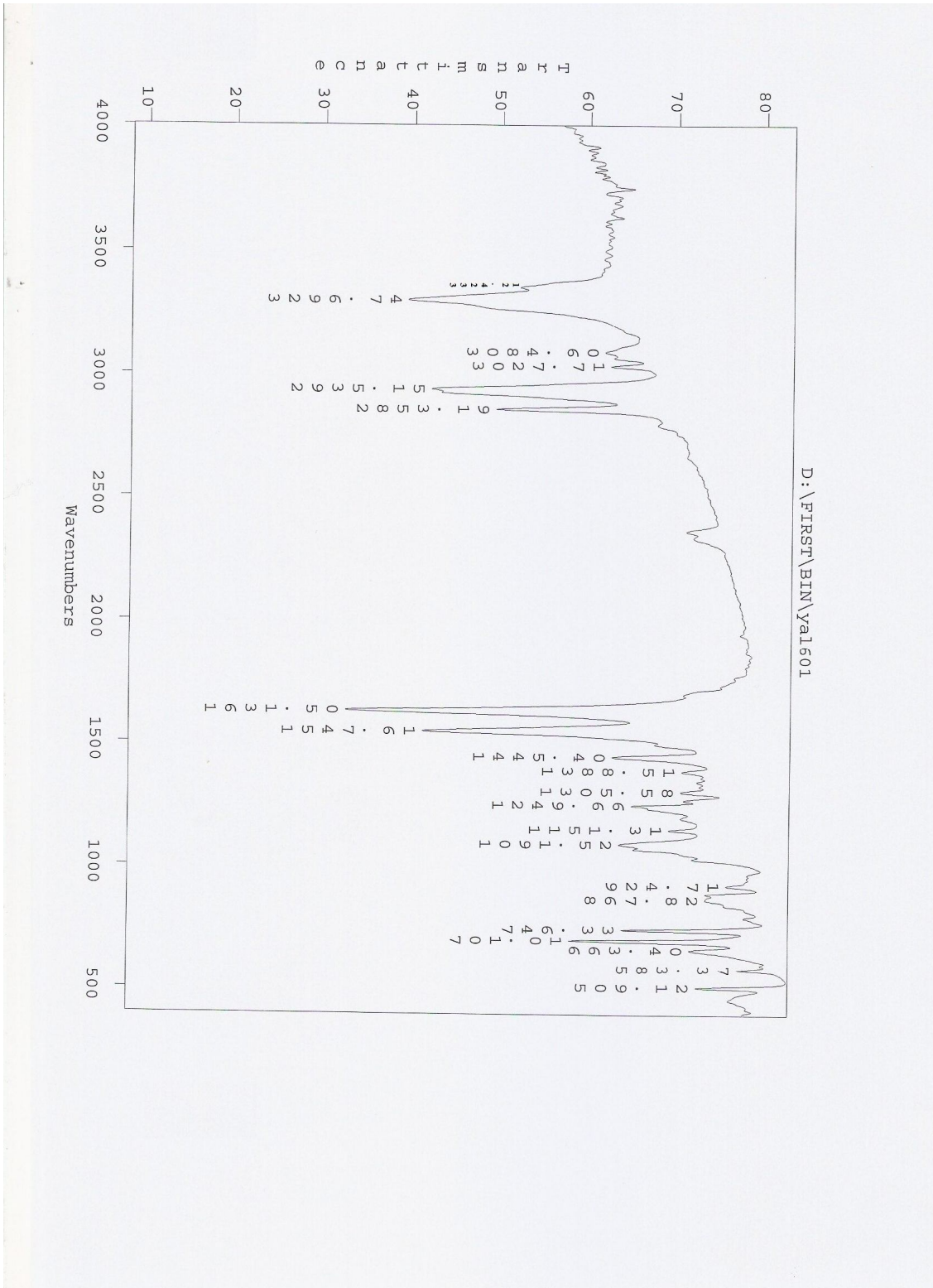
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20111130
 Time 11:39
 INSTRUM spect
 PROBRD 5 mm PABBI 1H
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SFO1 400.136093
 SOLVENT CDCl3
 NS 1024
 DS 4
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.369945 sec
 RG 327.5
 IN 20.850 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.2 K
 D1 2.0000000 sec
 d11 0.0300000 sec
 DELTA 1.8999999 sec
 TD 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 13.00 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 100.6282898 MHz

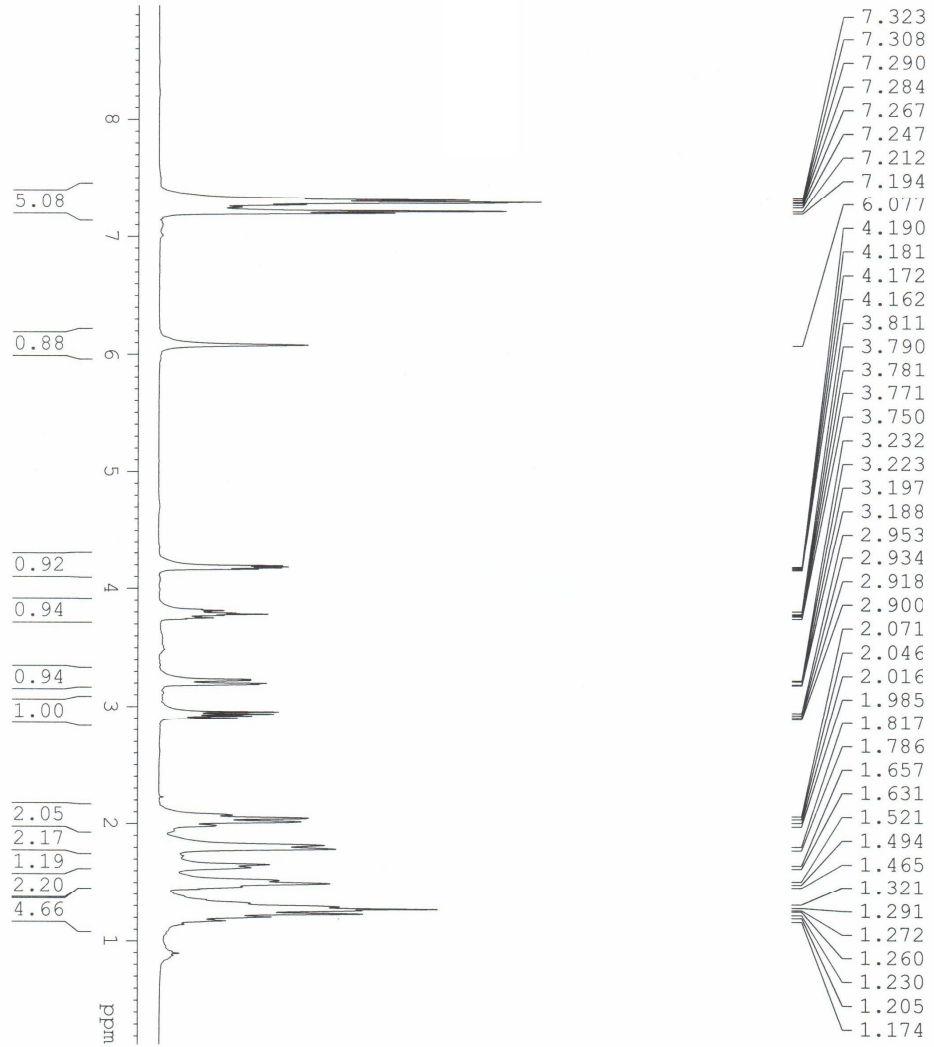
===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P2 100.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 25.22 dB
 PL13 27.00 dB
 SFO2 400.136093 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6127666 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 GB 1.00 Hz
 PC 1.40

EK 4. N-sikloheksilfenilalanamid'in IR Spektrumu



EK 5. N-sikloheksilfenilalanamid'in ¹H NMR Spektrumu



Current Data Parameters
 NAME hayriye
 EXPNO 23
 PROCNO 1



F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20121123
 Time 15.36

INSTRUM spect
 NS0000 5 mm PABBI
 PULPROG zg30
 CD 65536
 SOLVENT CDCl3

DS 16
 SS 2
 HYRES 8278.146 Hz
 AQ 0.126314 sec
 RG 3.9584243 sec
 DE 14.3
 DW 60.400 usec
 TE 297.5 K
 FID 1
 TD 1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUCL 1H
 P1 9.75 usec
 PL1 2.00 dB
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 400.130000 MHz
 SF 32768
 WDW EM
 SSB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

EK 6. N-sikloheksilfenilalanamid'in ¹³C NMR Spektrumu



Current Data Parameters
 ExpNO 4
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20121212
 Time 12.42
 INSTRUM spect
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CLC13
 DS 1024
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.262718 Hz
 AQ 1.366715 sec
 RG 11024
 DN 20.850 usec
 TE 298.00 K
 DE 60.00 usec
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999991 sec
 TD0

===== CHANNEL F1 =====
 NUC1 13C
 P1 13.30 usec
 PL1 -6.00 dB
 SF01 100.6228298 MHz

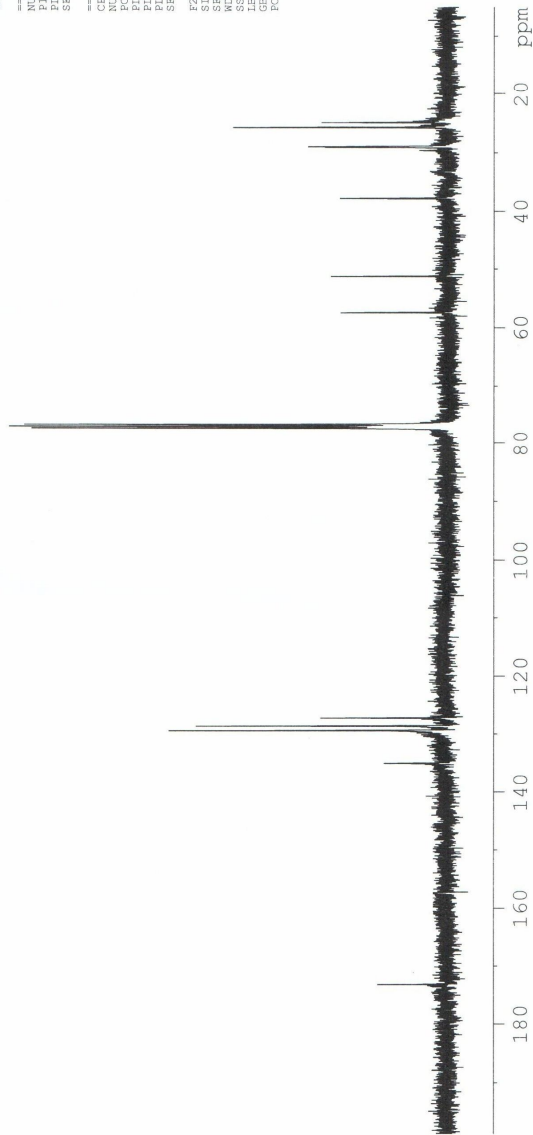
===== CHANNEL F2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 P2 100.00 usec
 PL2 5.00 dB
 PL12 25.00 dB
 SF02 400.1316605 MHz

F2 - Processing parameters
 SF 100.6127690 MHz
 EQ
 GB 1.00 Hz
 GB 1.00 Hz
 EC 1.40

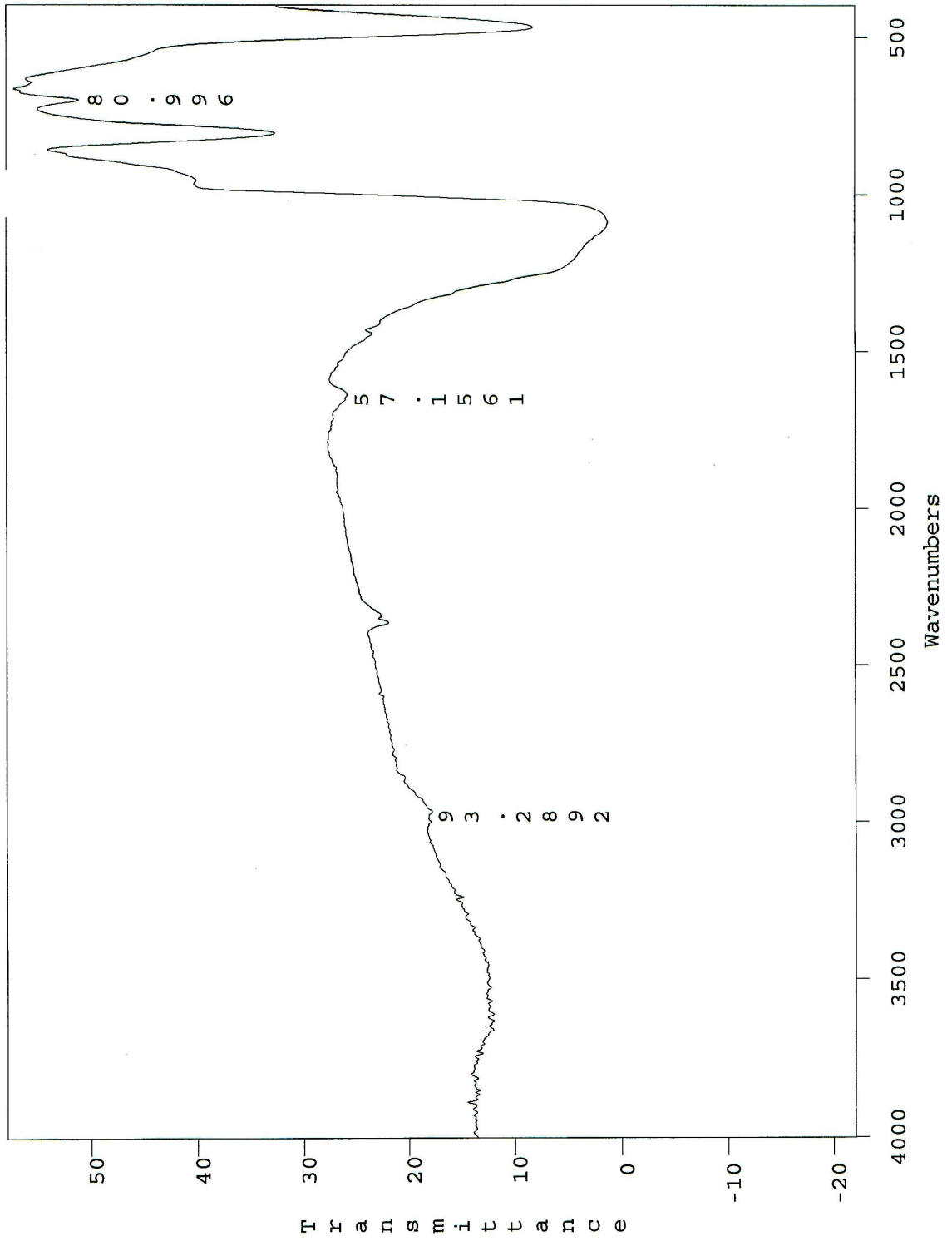
24.94
 25.77
 28.99
 29.11
 37.78
 51.29
 57.44

127.28
 128.66
 129.44
 134.97

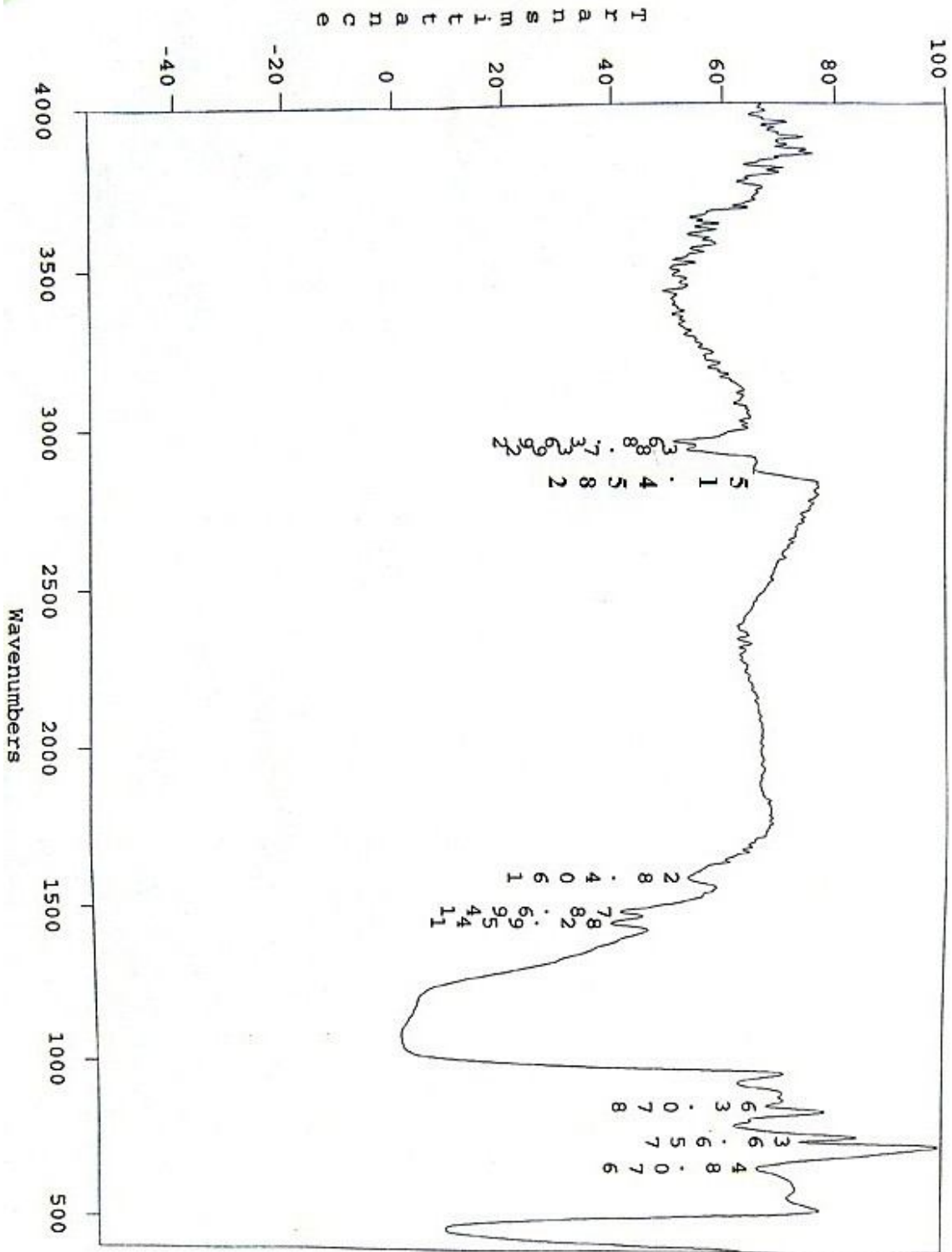
173.17



EK 7. CP-Si'nin IR Spektrumu

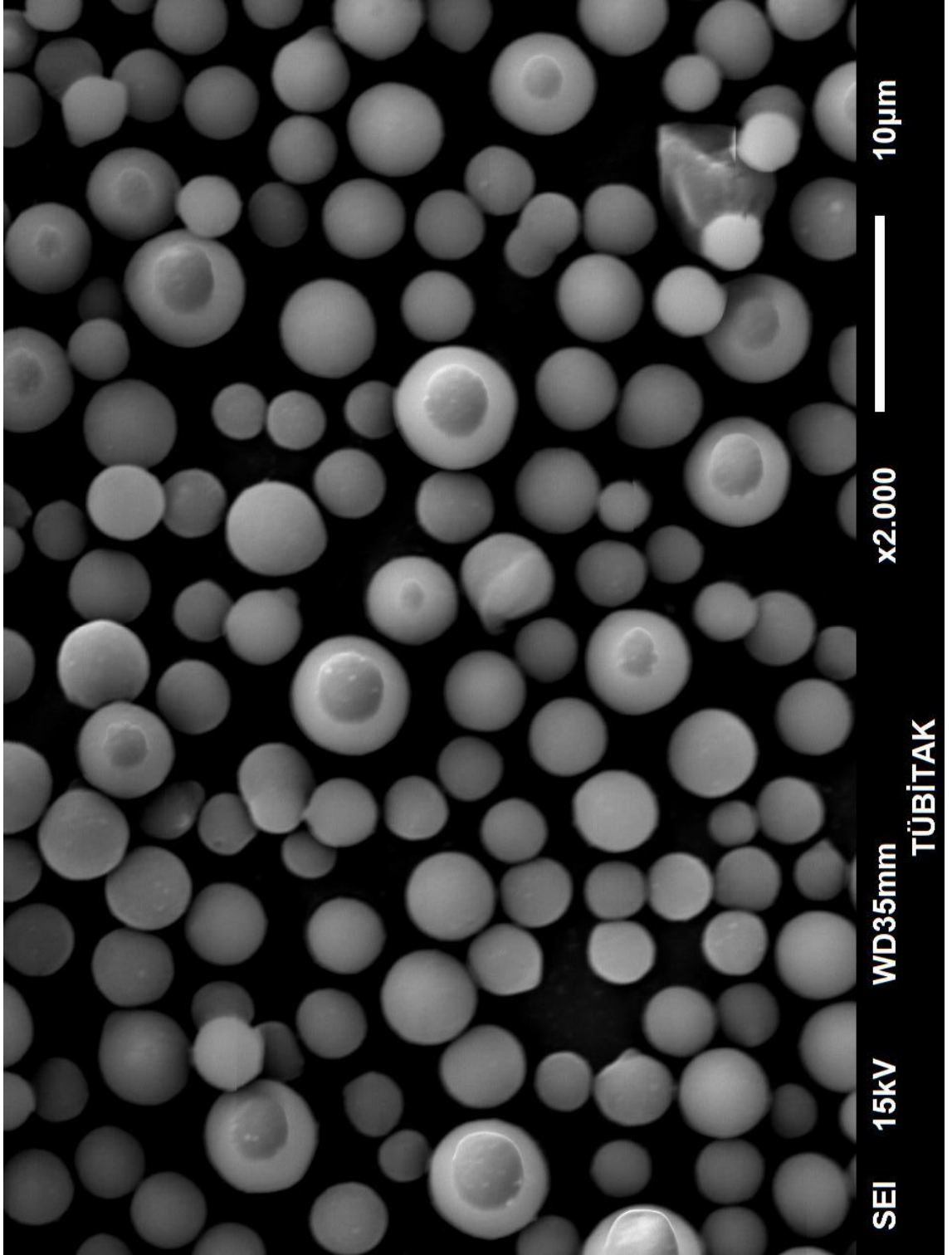


EK 8. SP1 Dolgu Maddesinin IR Spektrumu

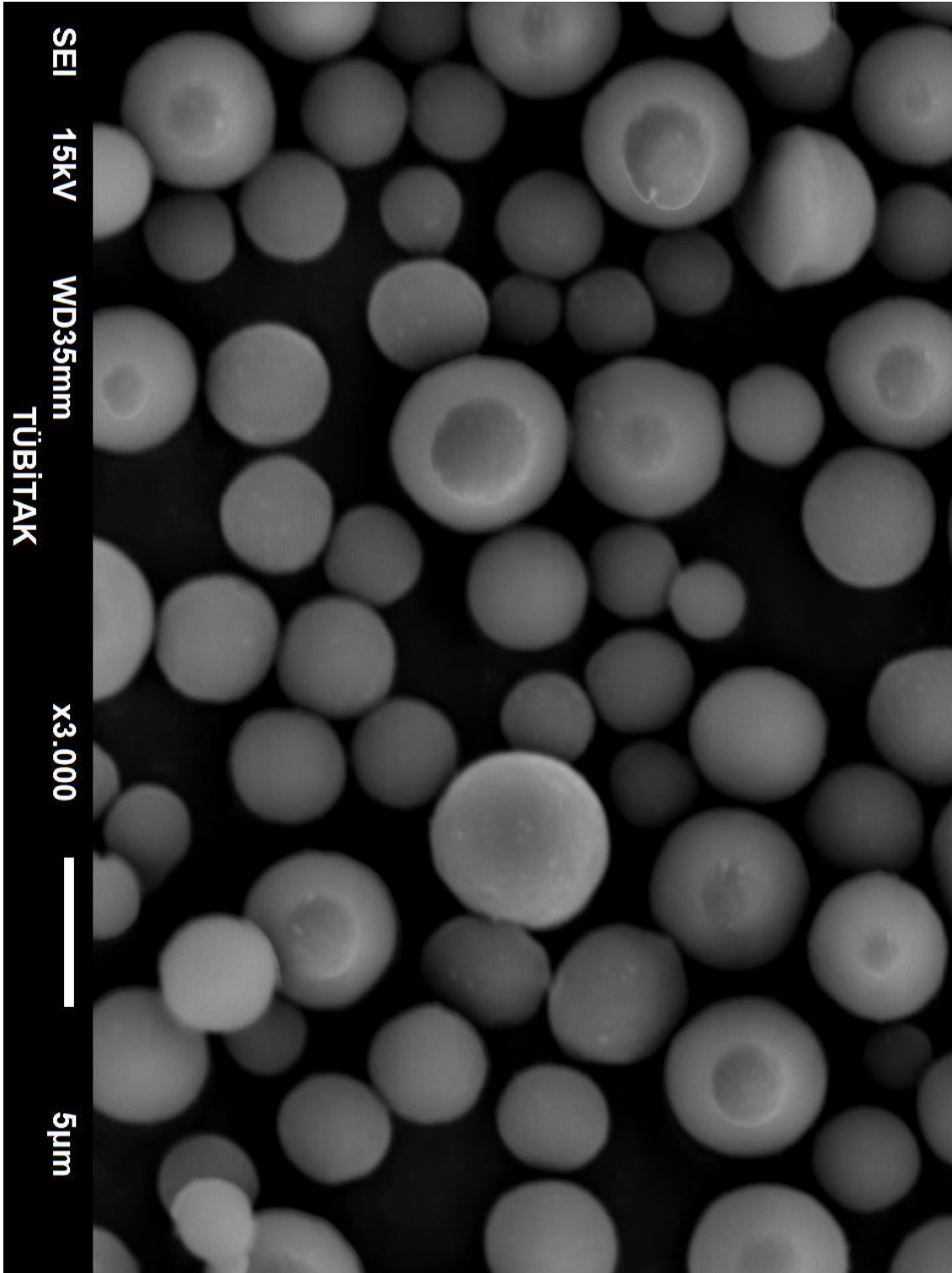


EK 9. Serbest Silika jelin SEM Spektrumları

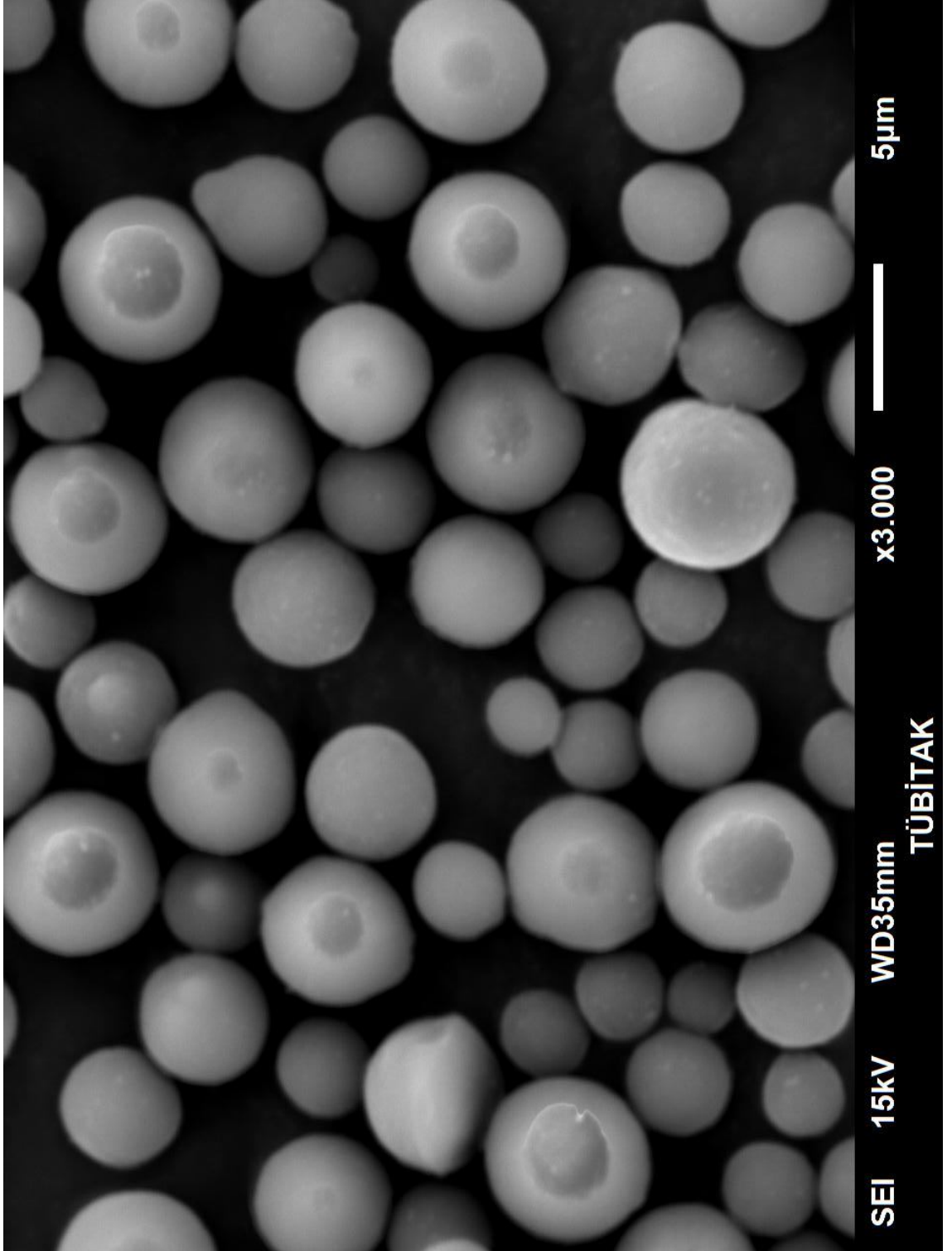
EK 9.1



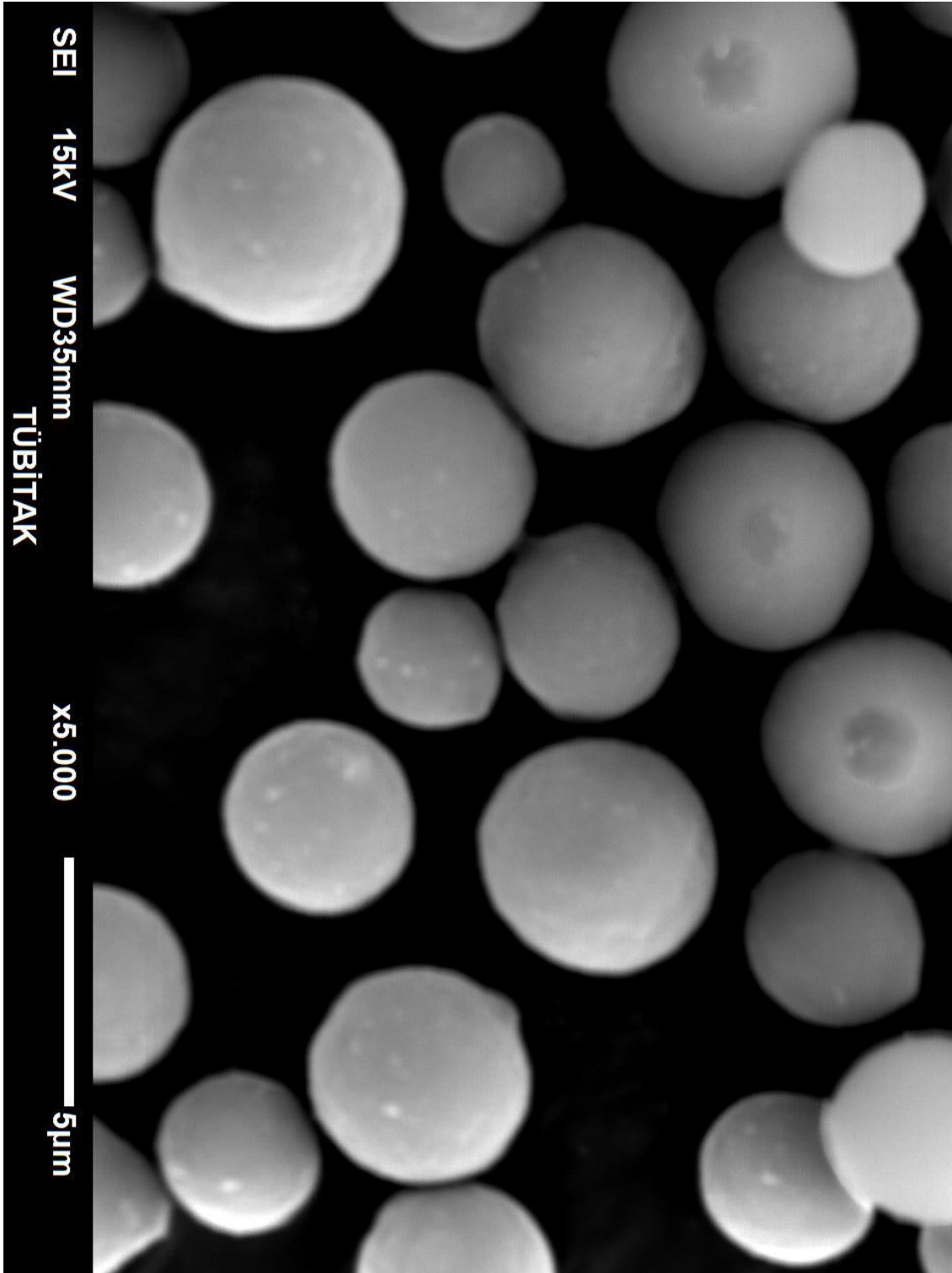
EK 9.2



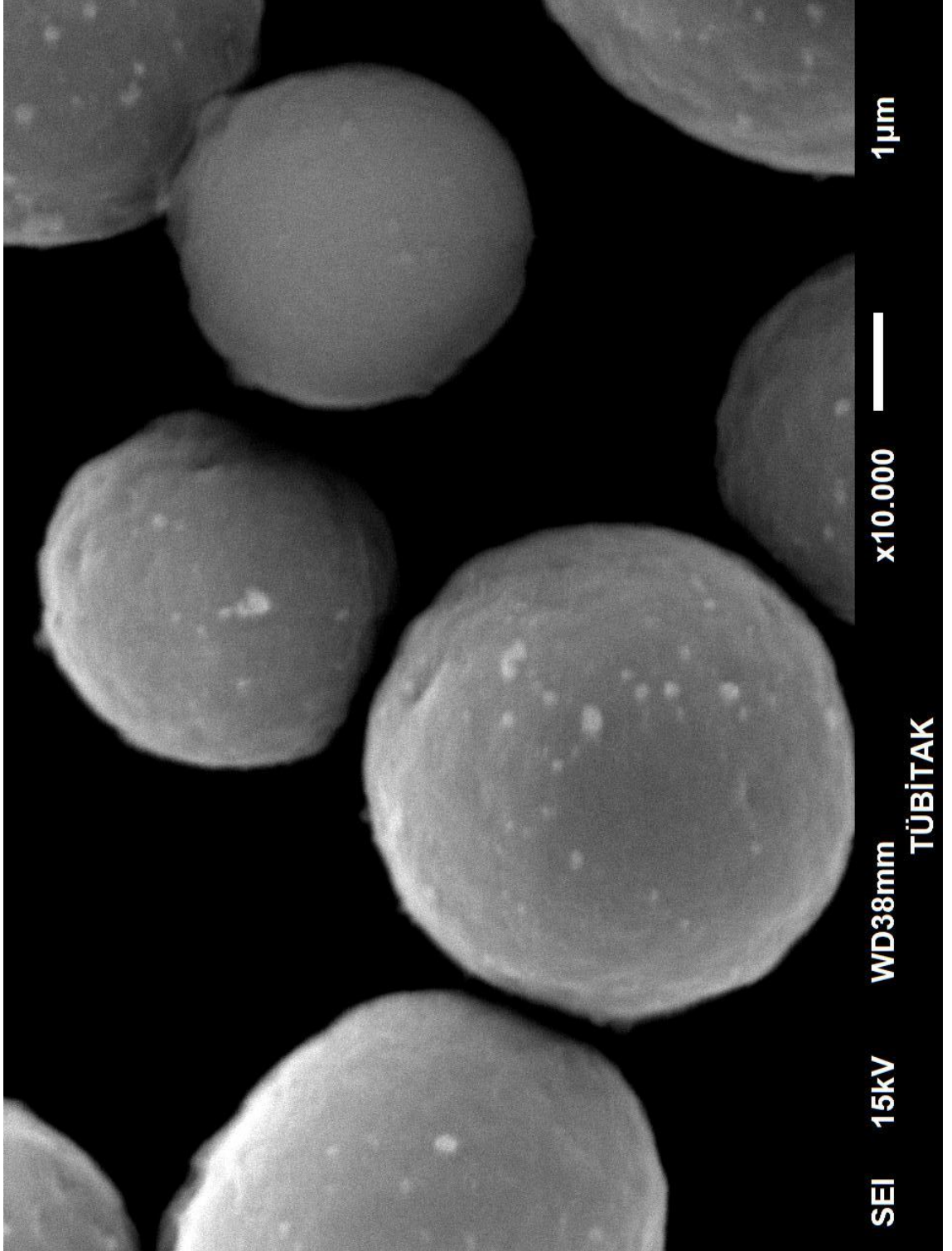
EK 9.3



EK 9.4

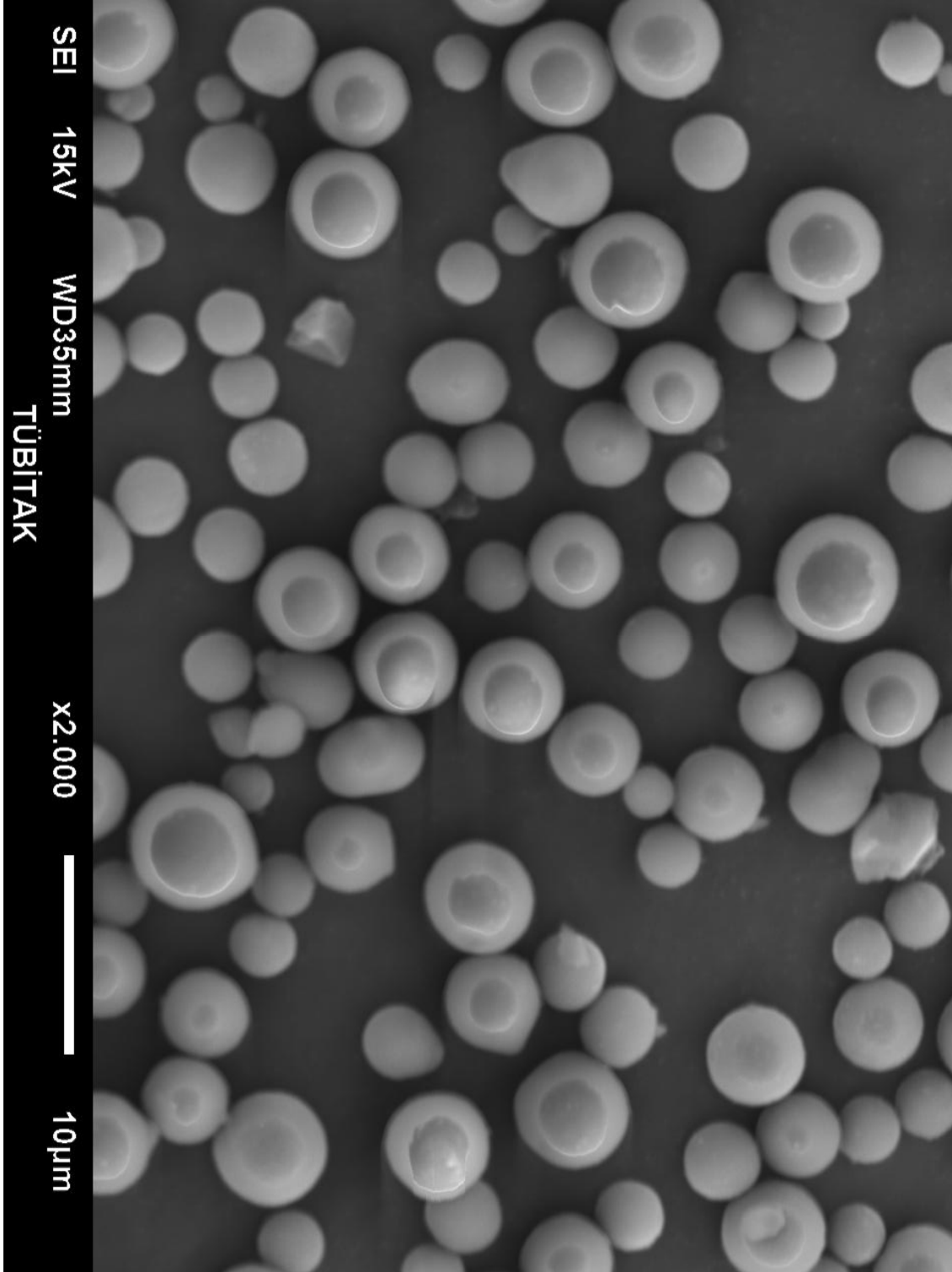


EK 9.5

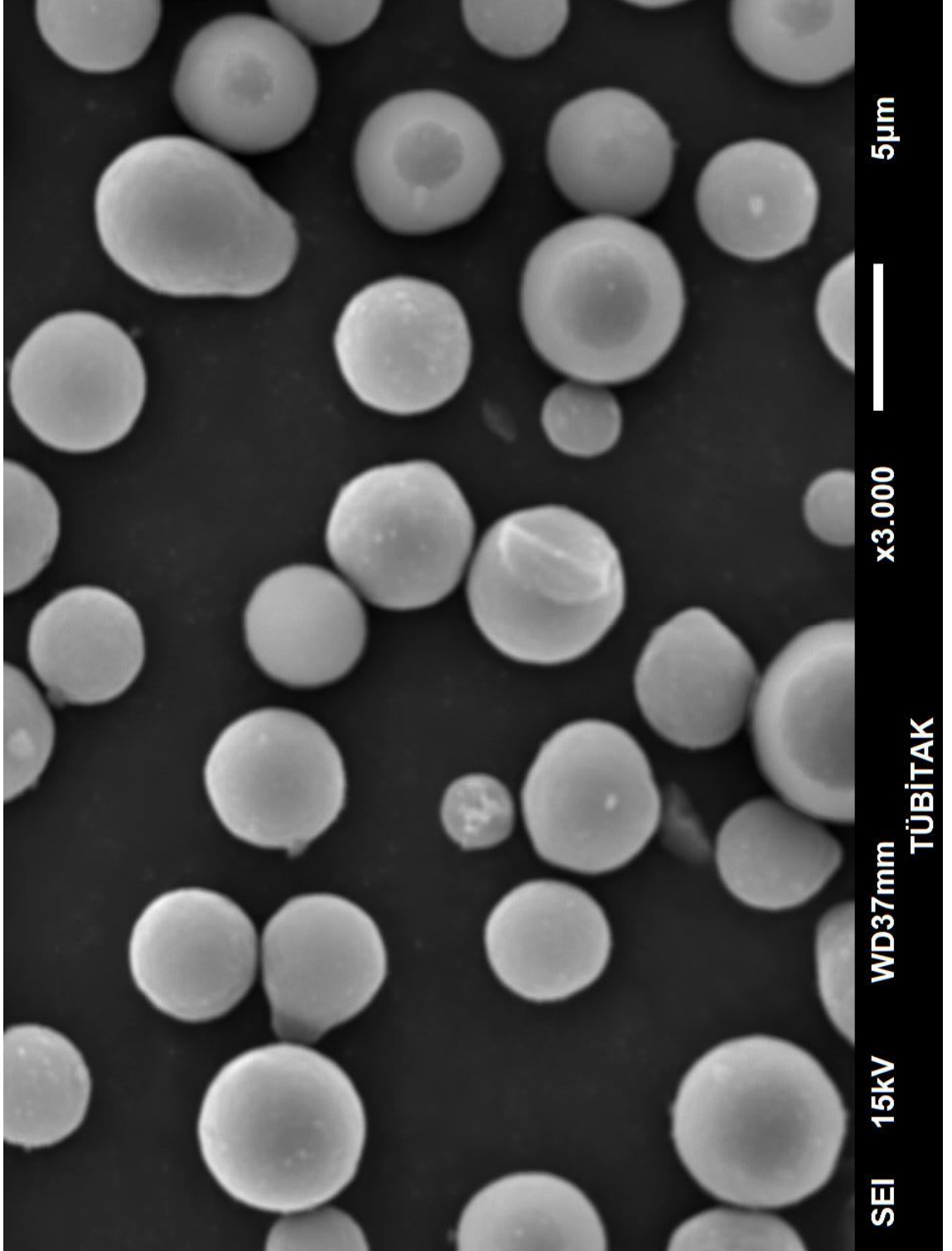


EK 10. CP-Si'nin SEM Spektrumları

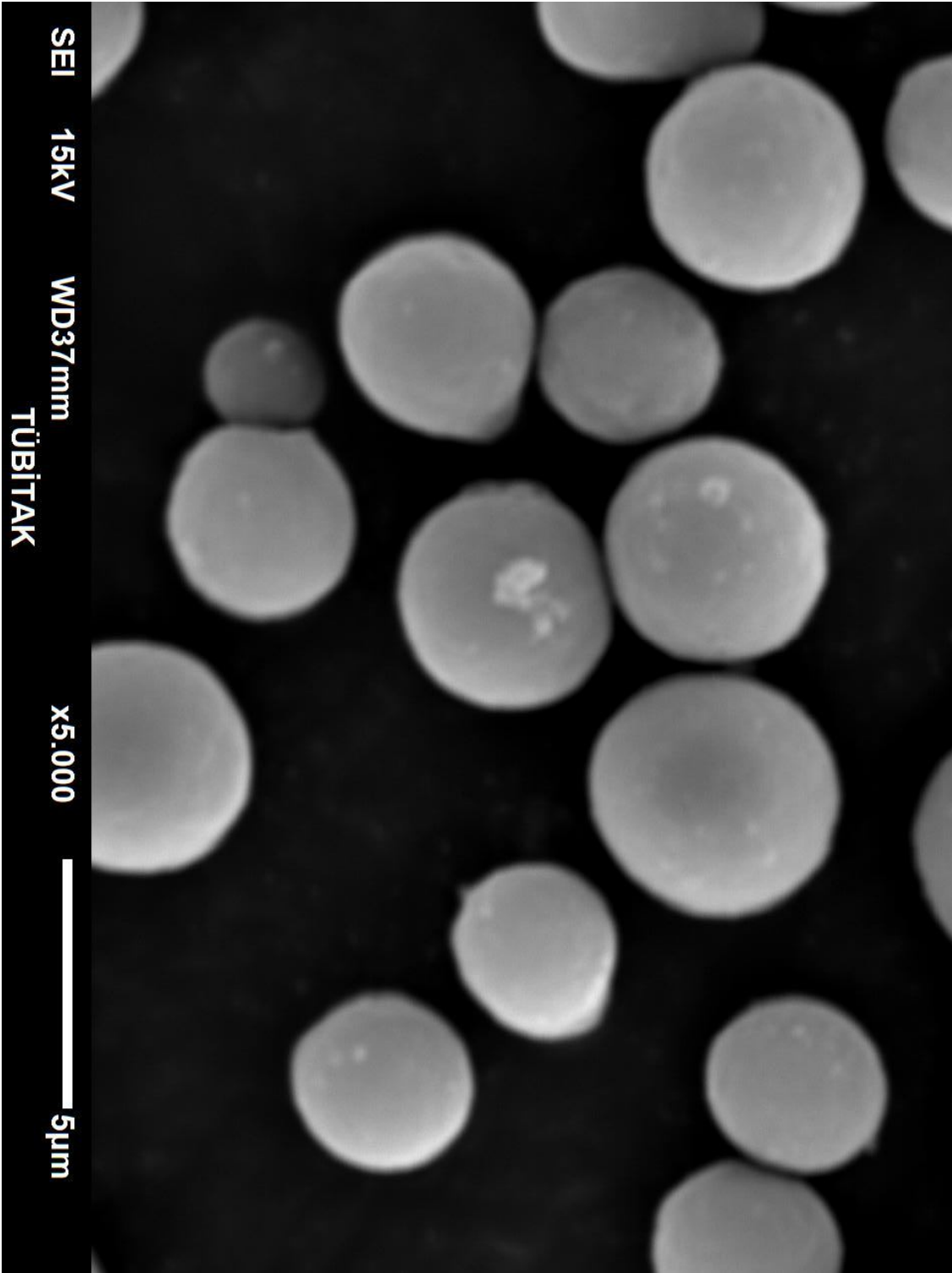
EK 10.1



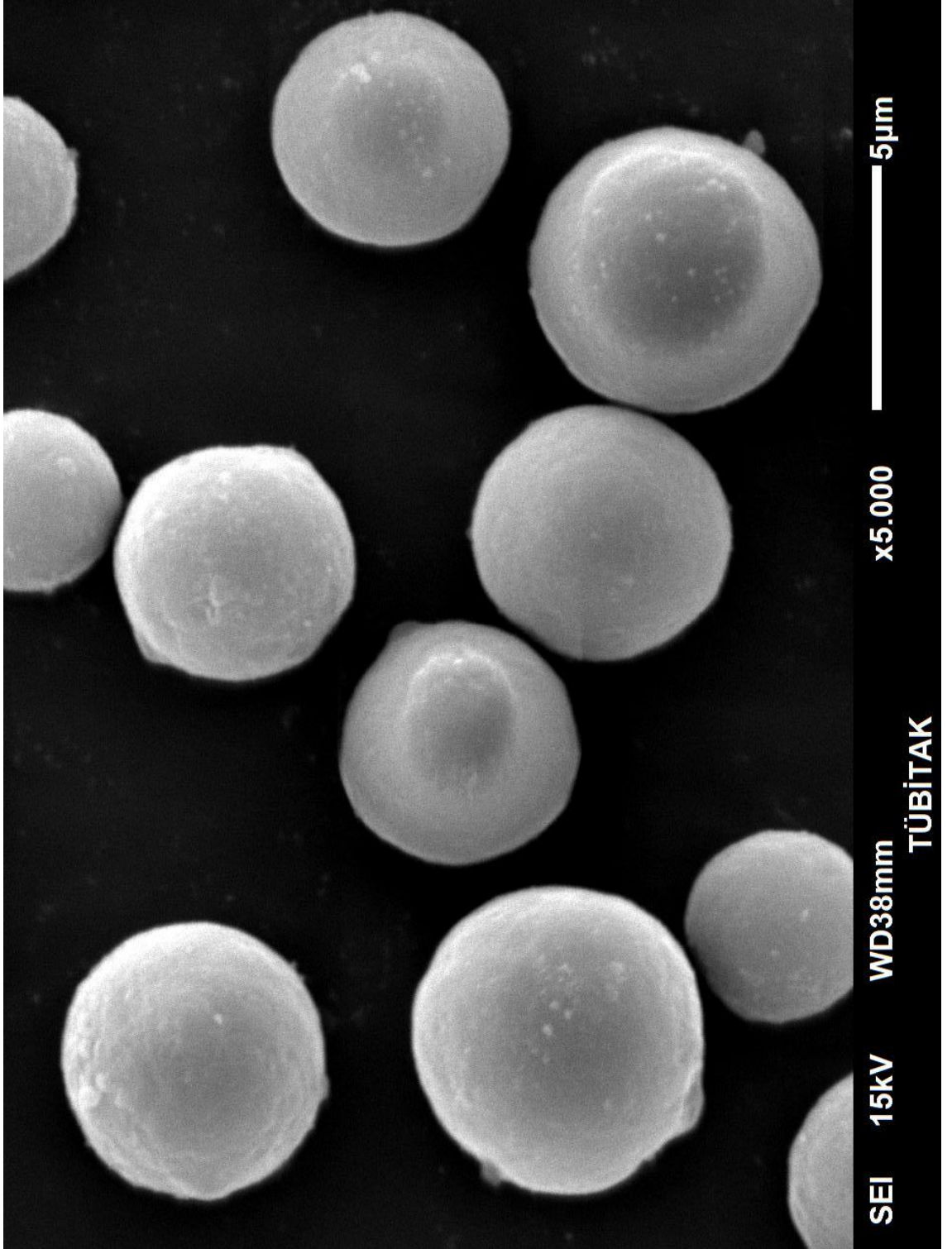
EK 10.2



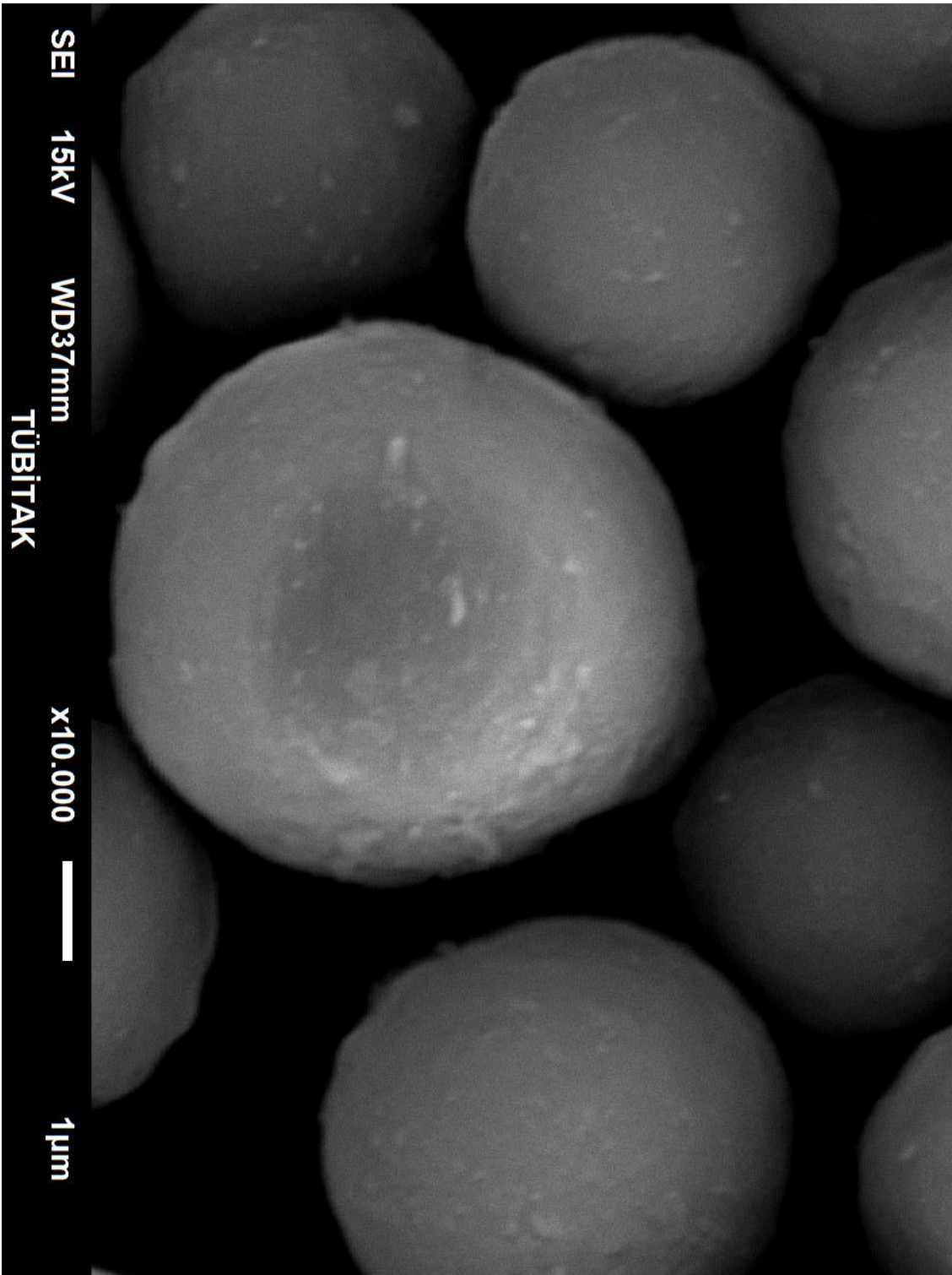
EK 10.3



EK 10.4

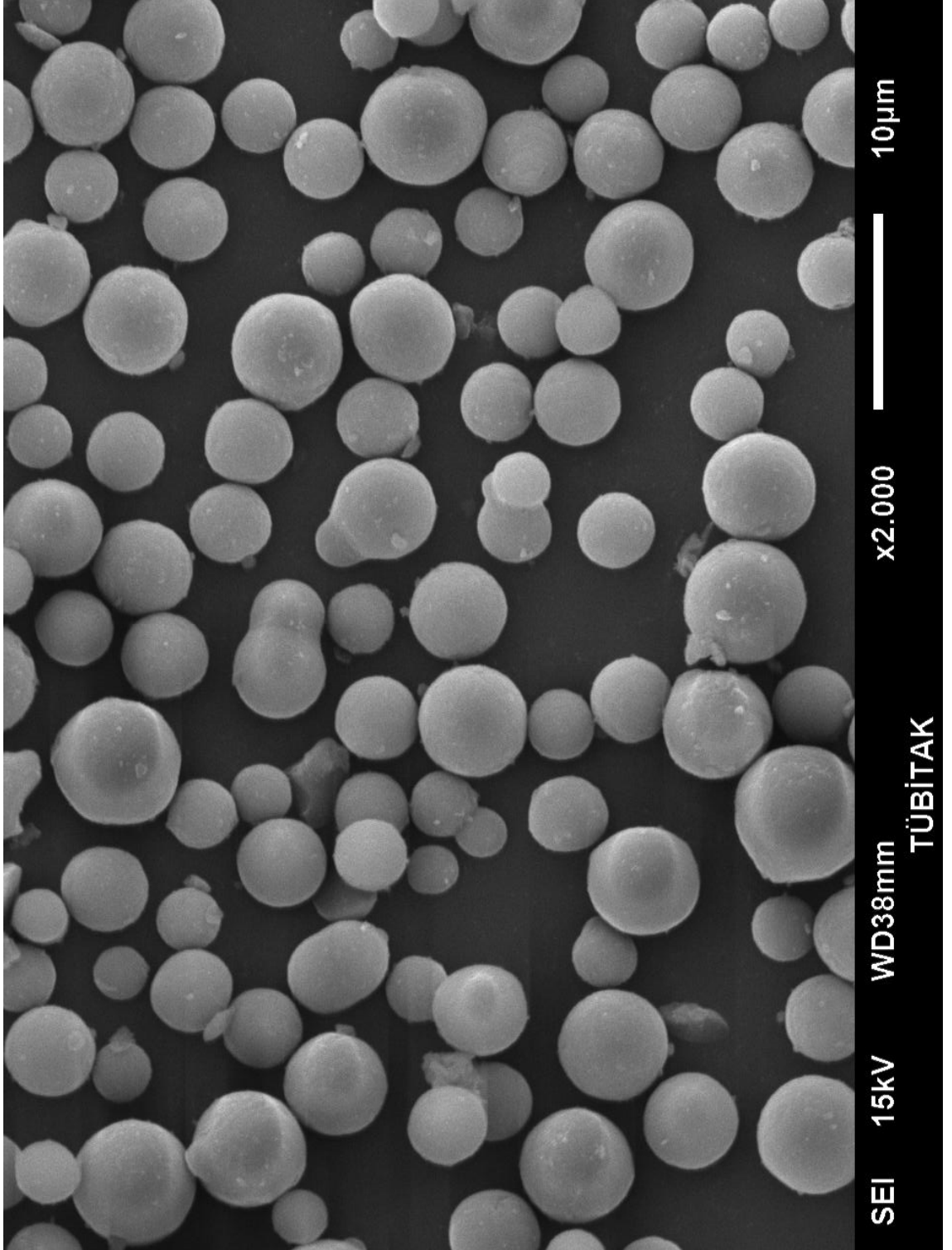


EK 10.5

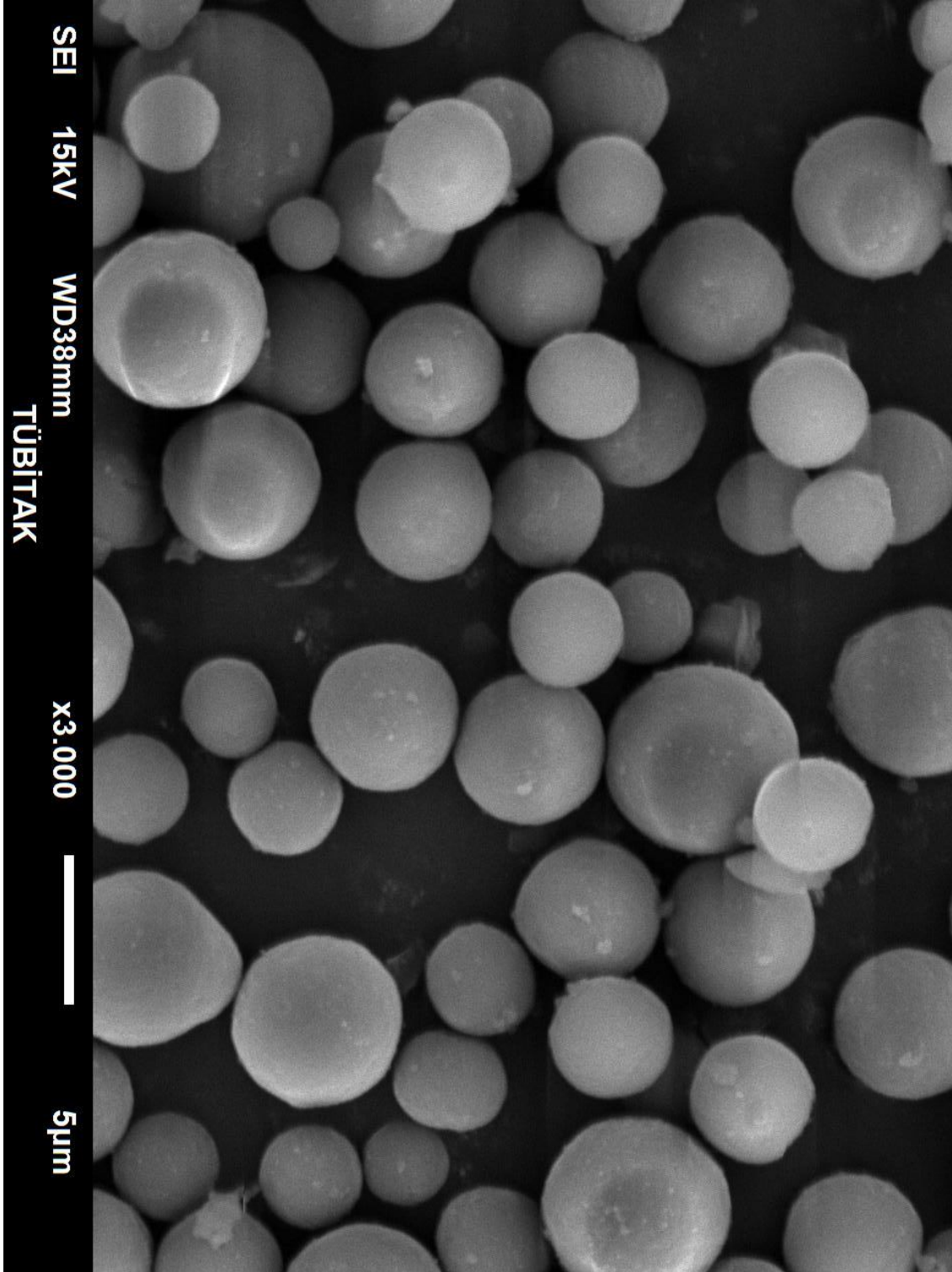


EK 11. SP1 Dolgu Maddesinin SEM Spektrumları

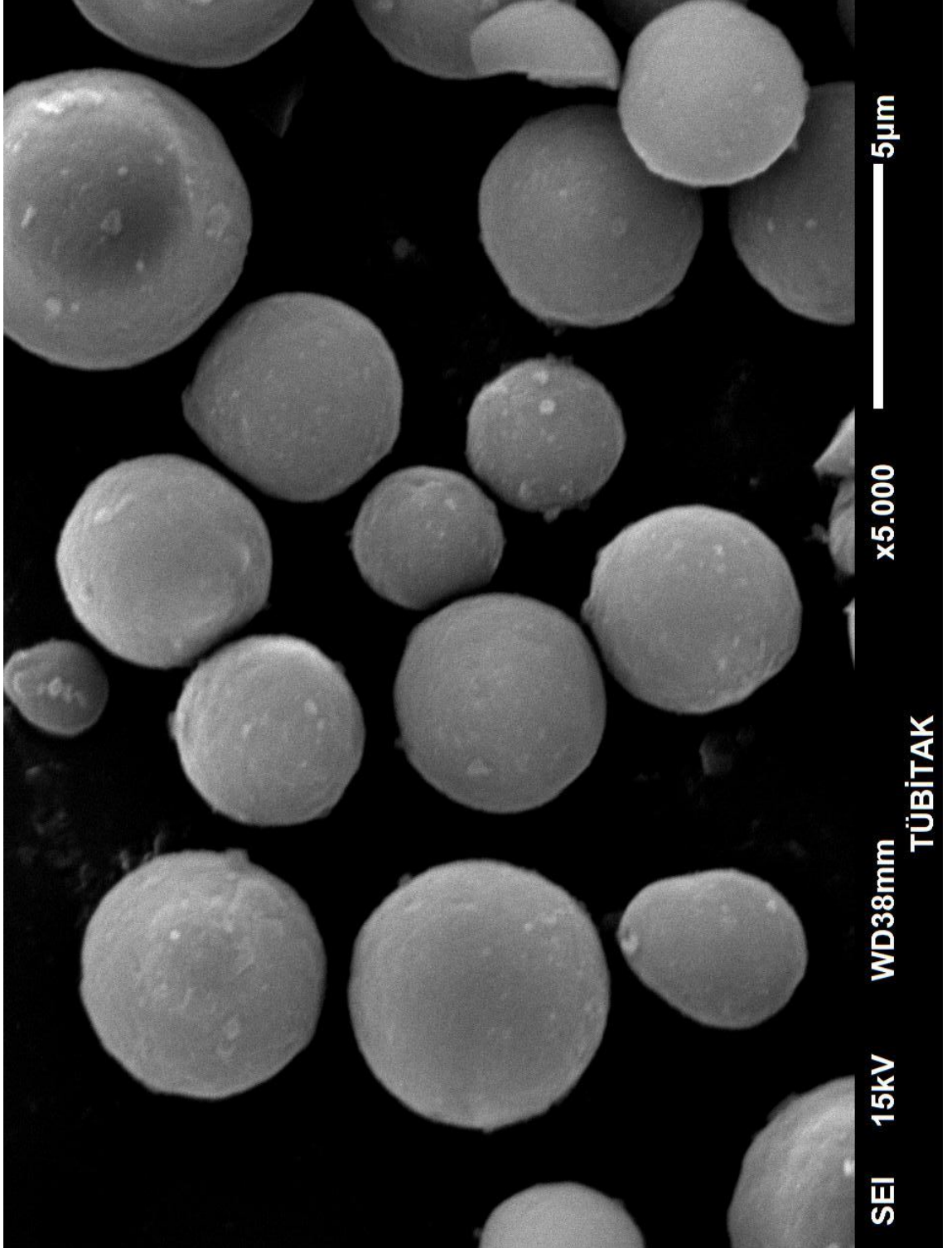
EK 11.1



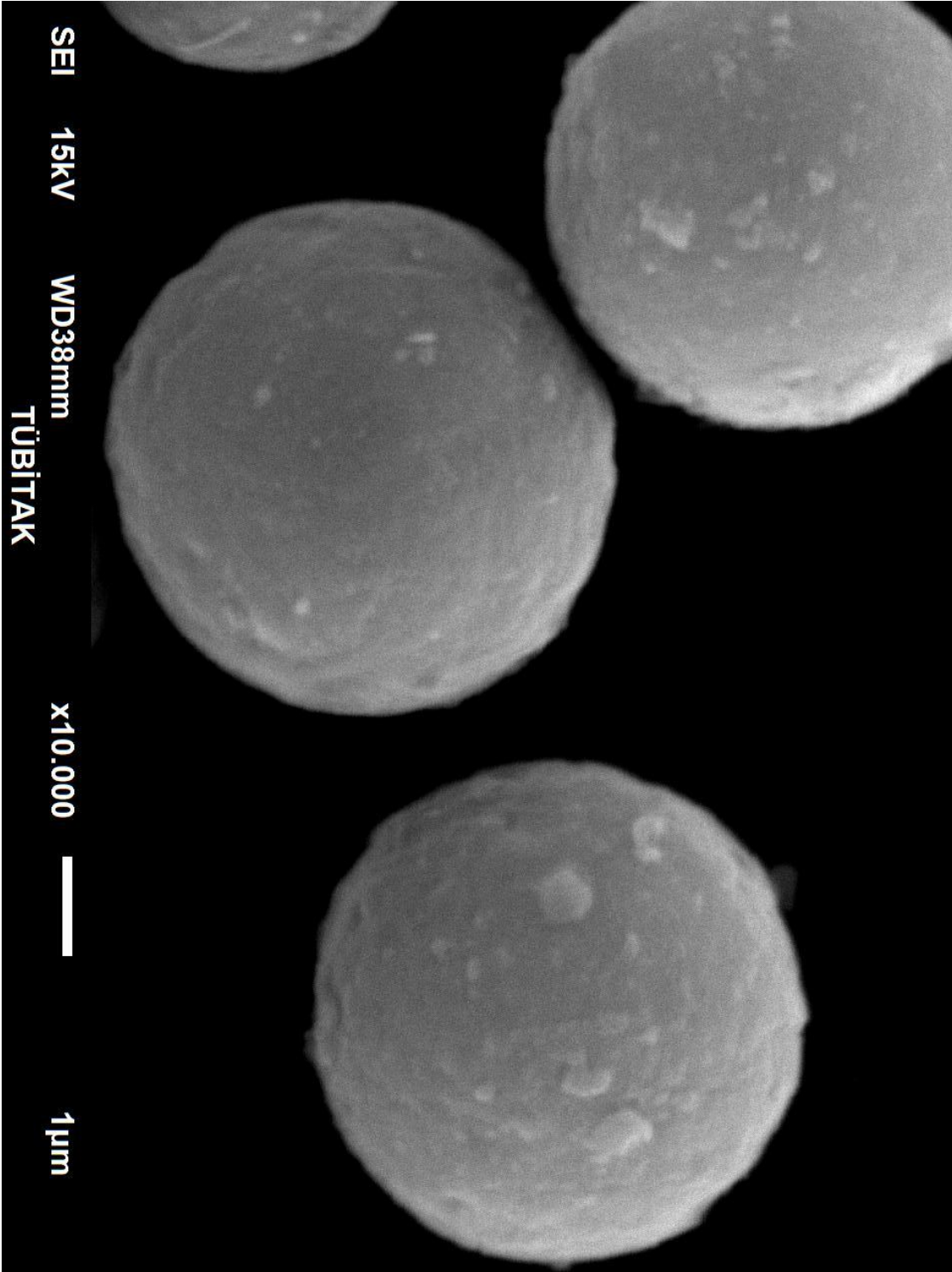
EK 11.2



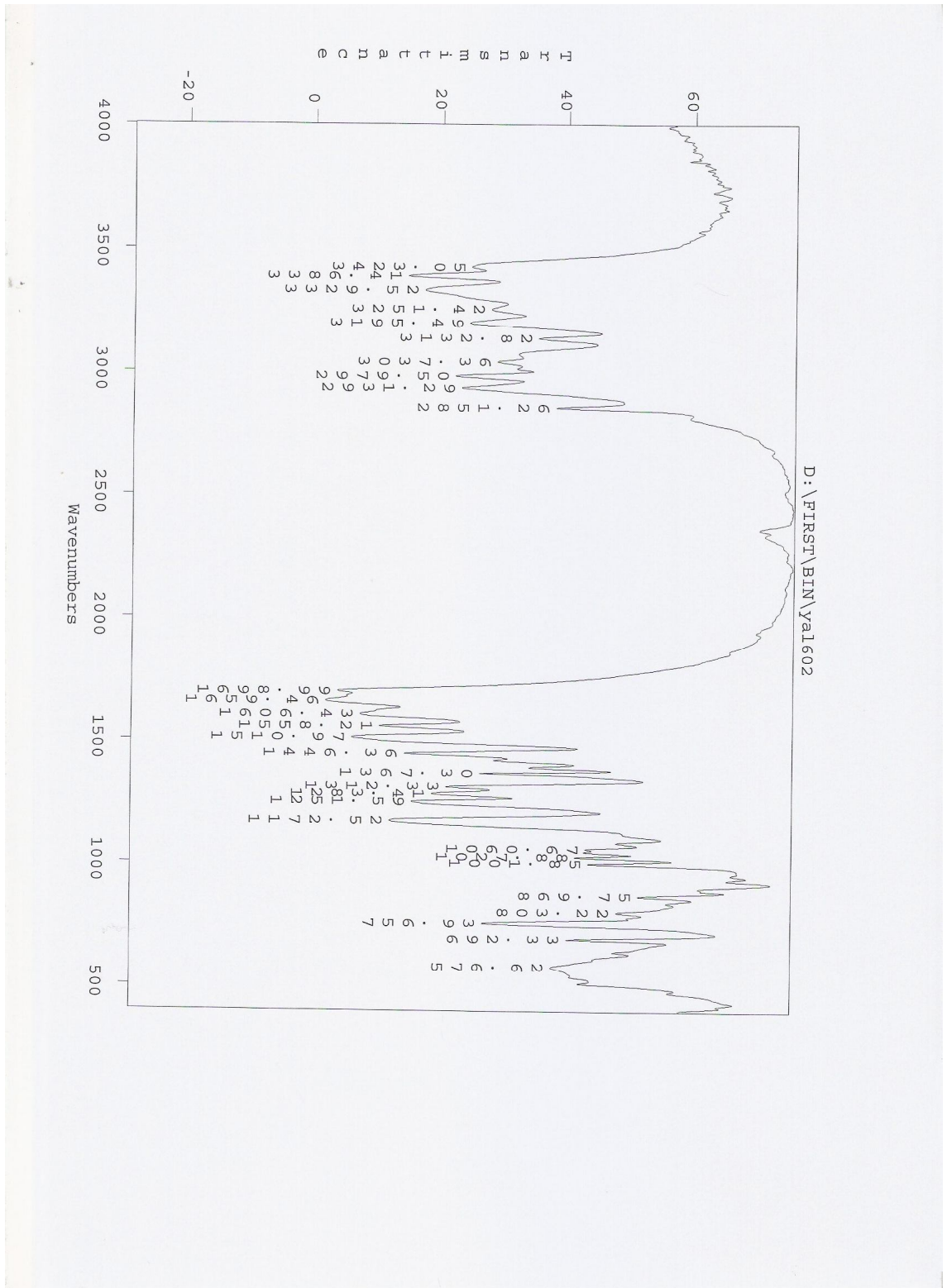
EK 11.3



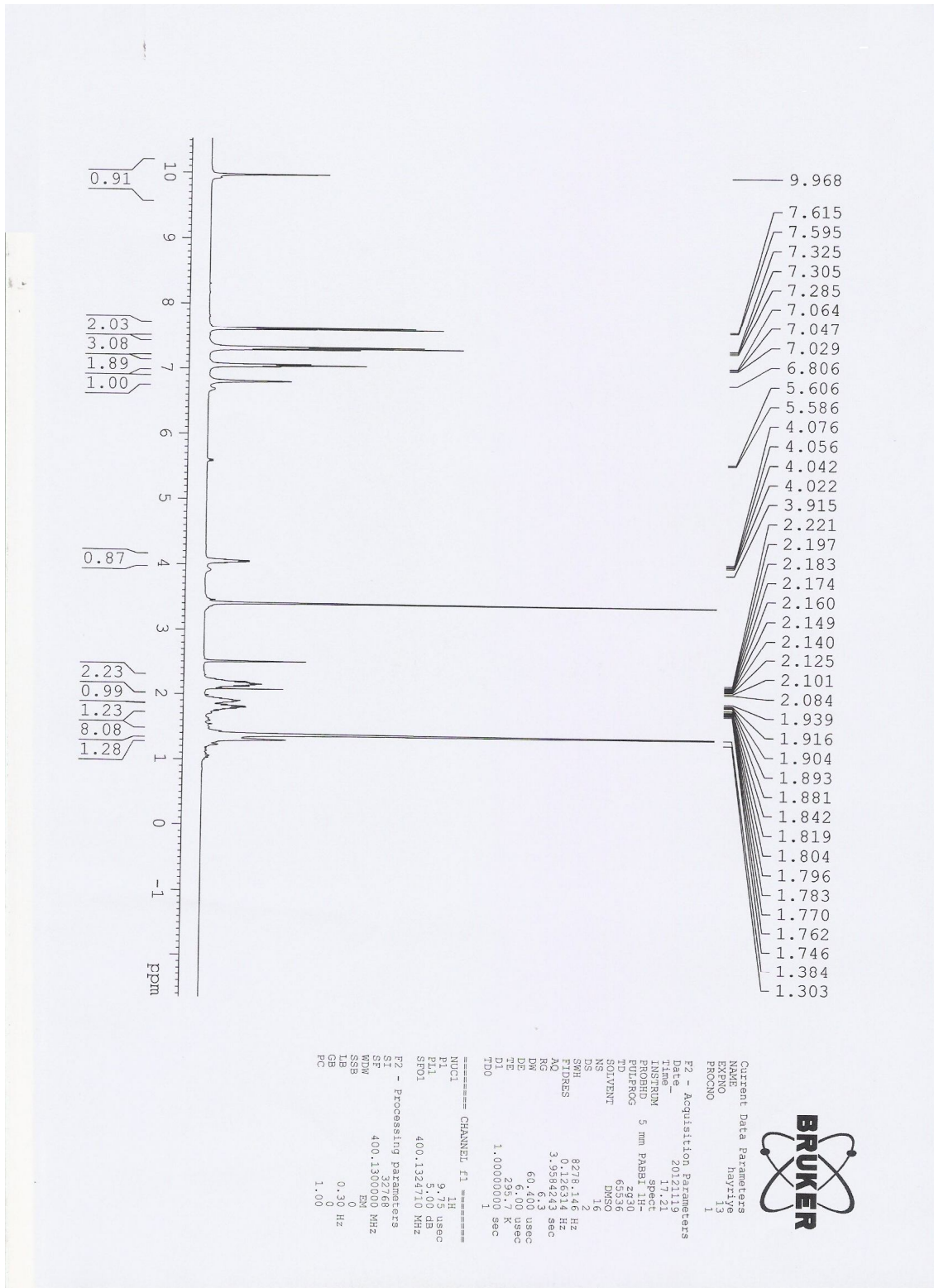
EK 11.4



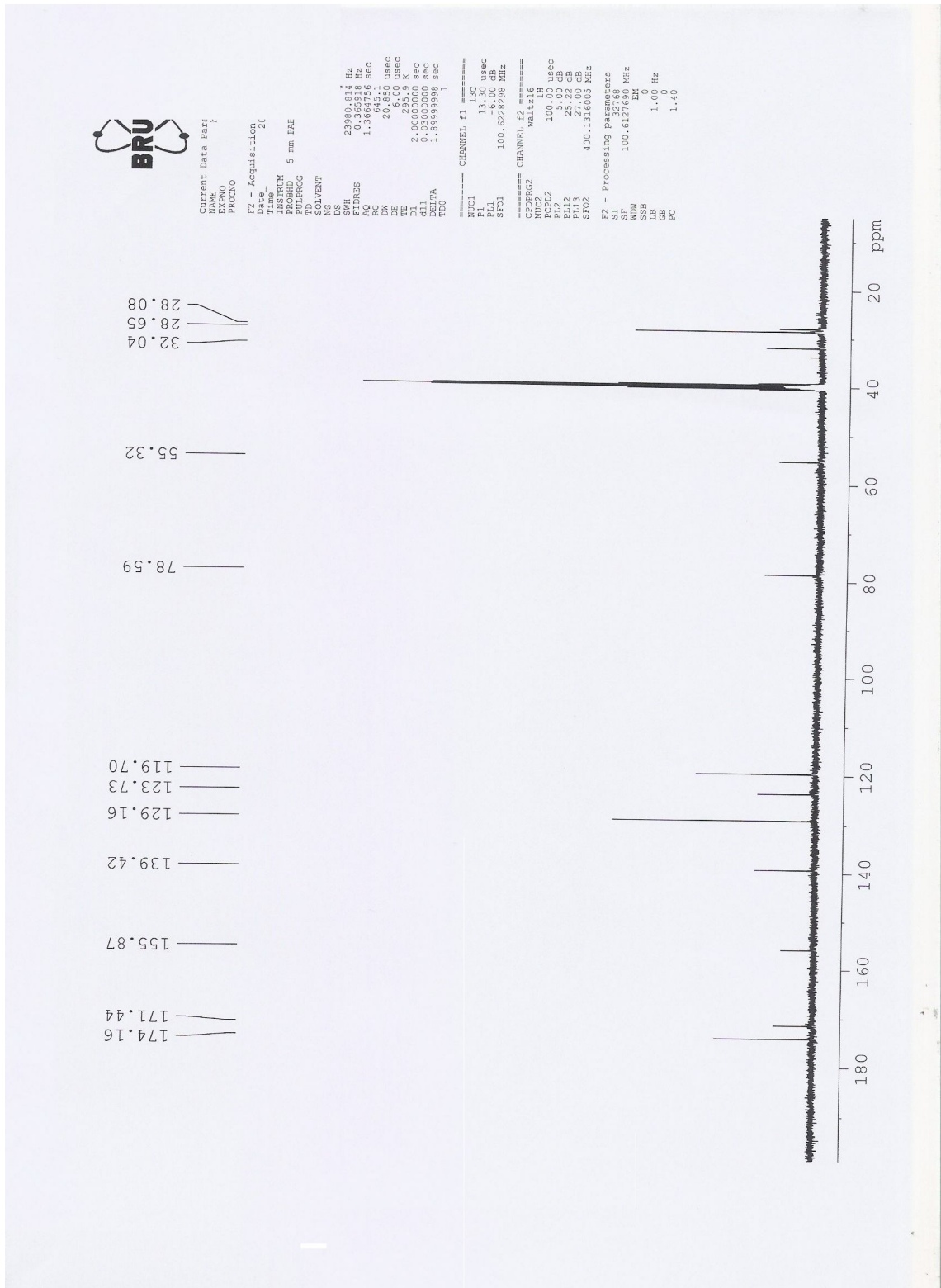
EK 12. N-boc-N'-fenil-glutamid'in IR Spektrumu



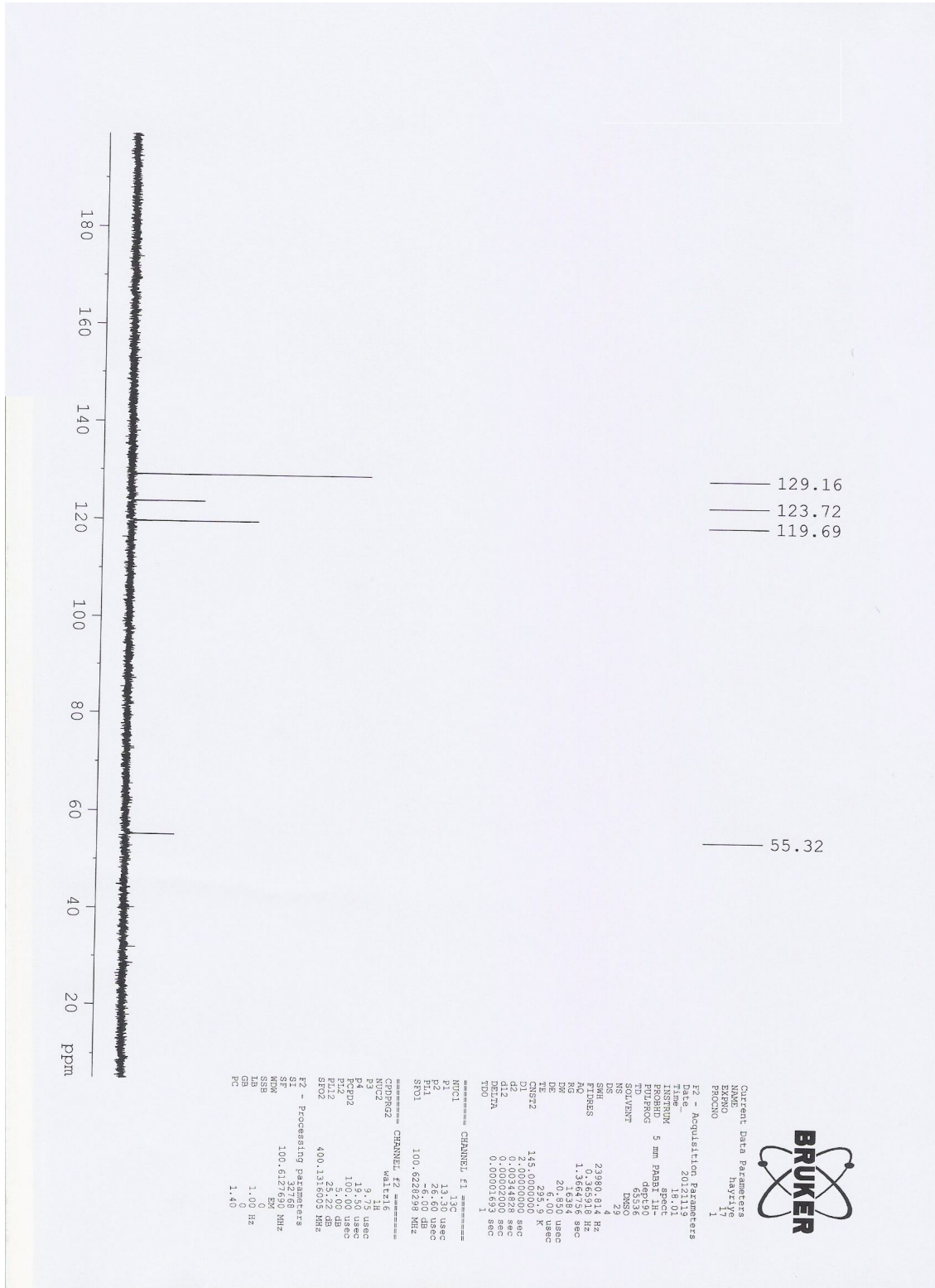
EK 13. N-boc-N'-fenil-glutamid'in ¹H NMR Spektrumu



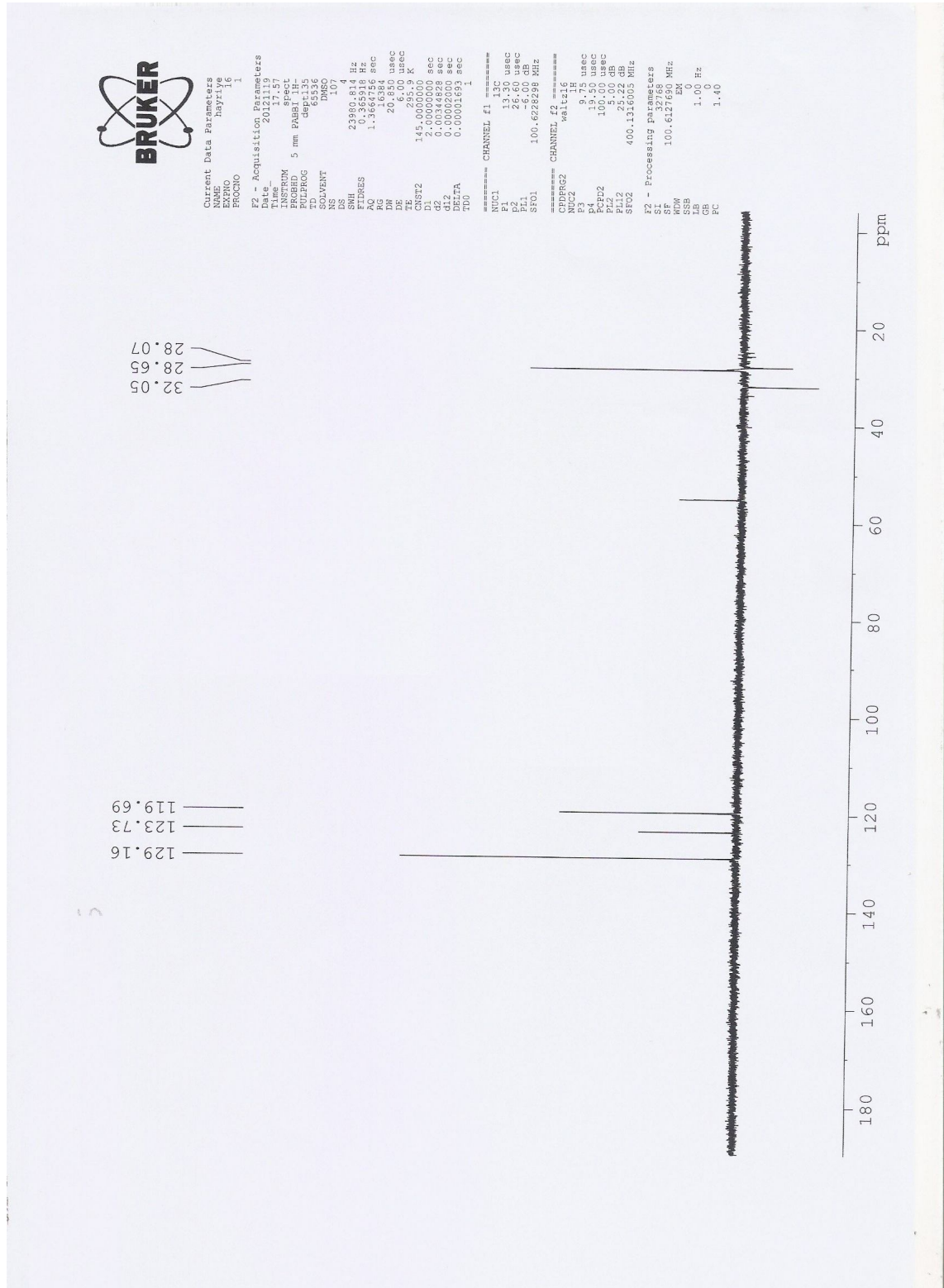
EK 14. N-boc-N'-fenil-glutamid'in ¹³C NMR Spektrumu



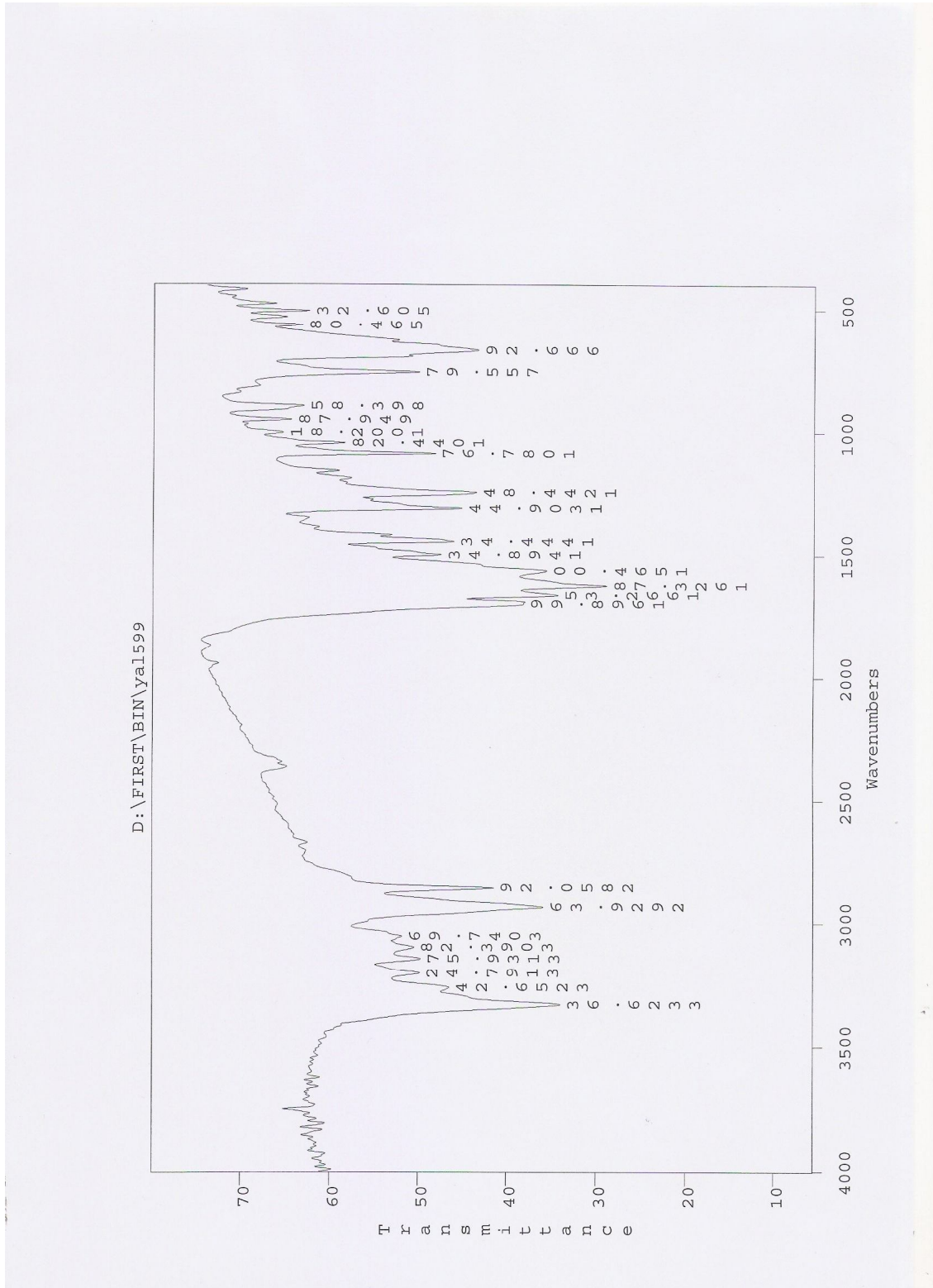
EK 15. N-boc-N'-fenil-glutamid'in DEPT 90 Spektrumu



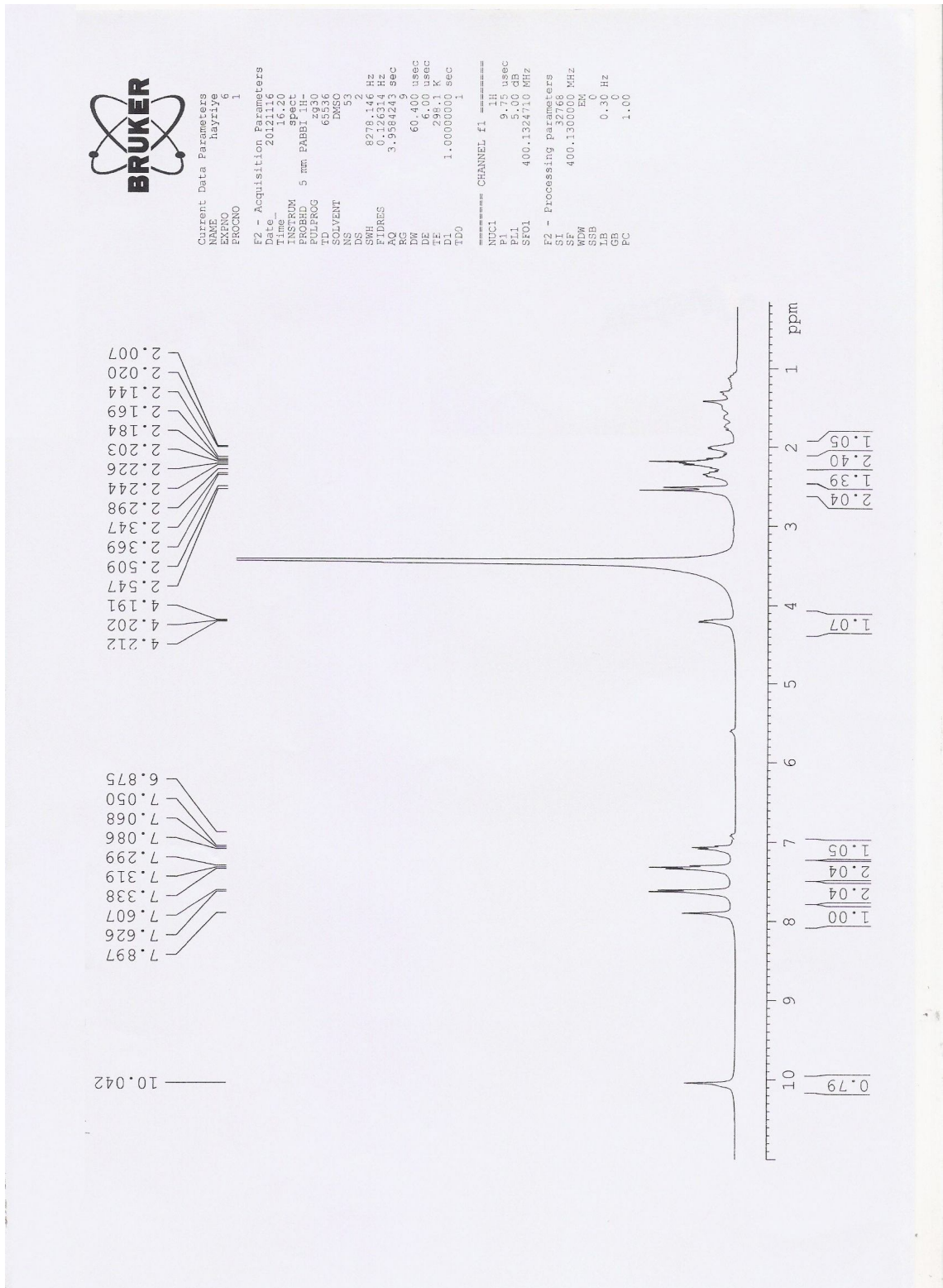
EK 16. N-boc-N'-fenil-glutamid'in DEPT 135 Spektrumu



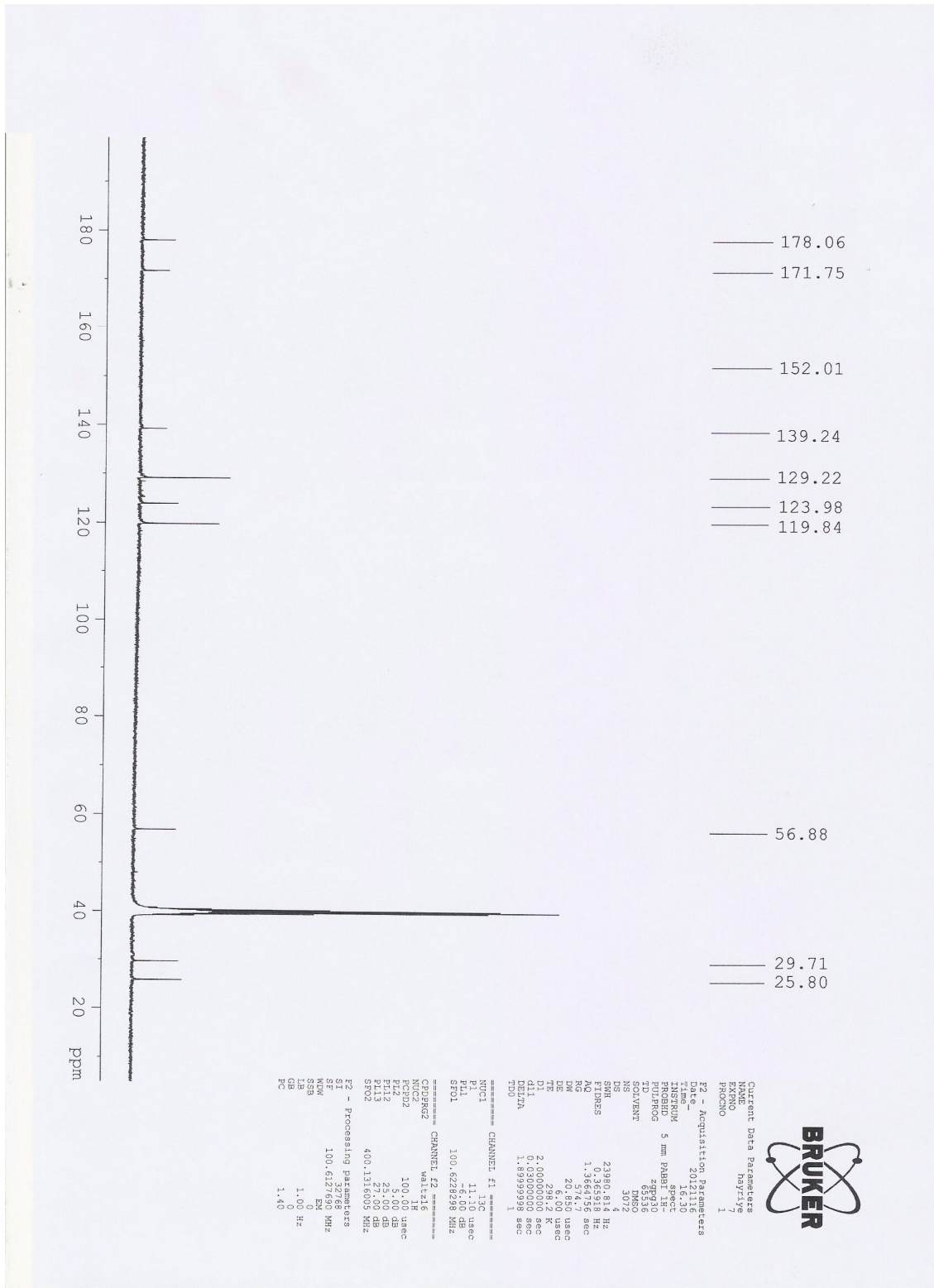
EK 17. N'-fenil-glutamid'in IR Spektrumu



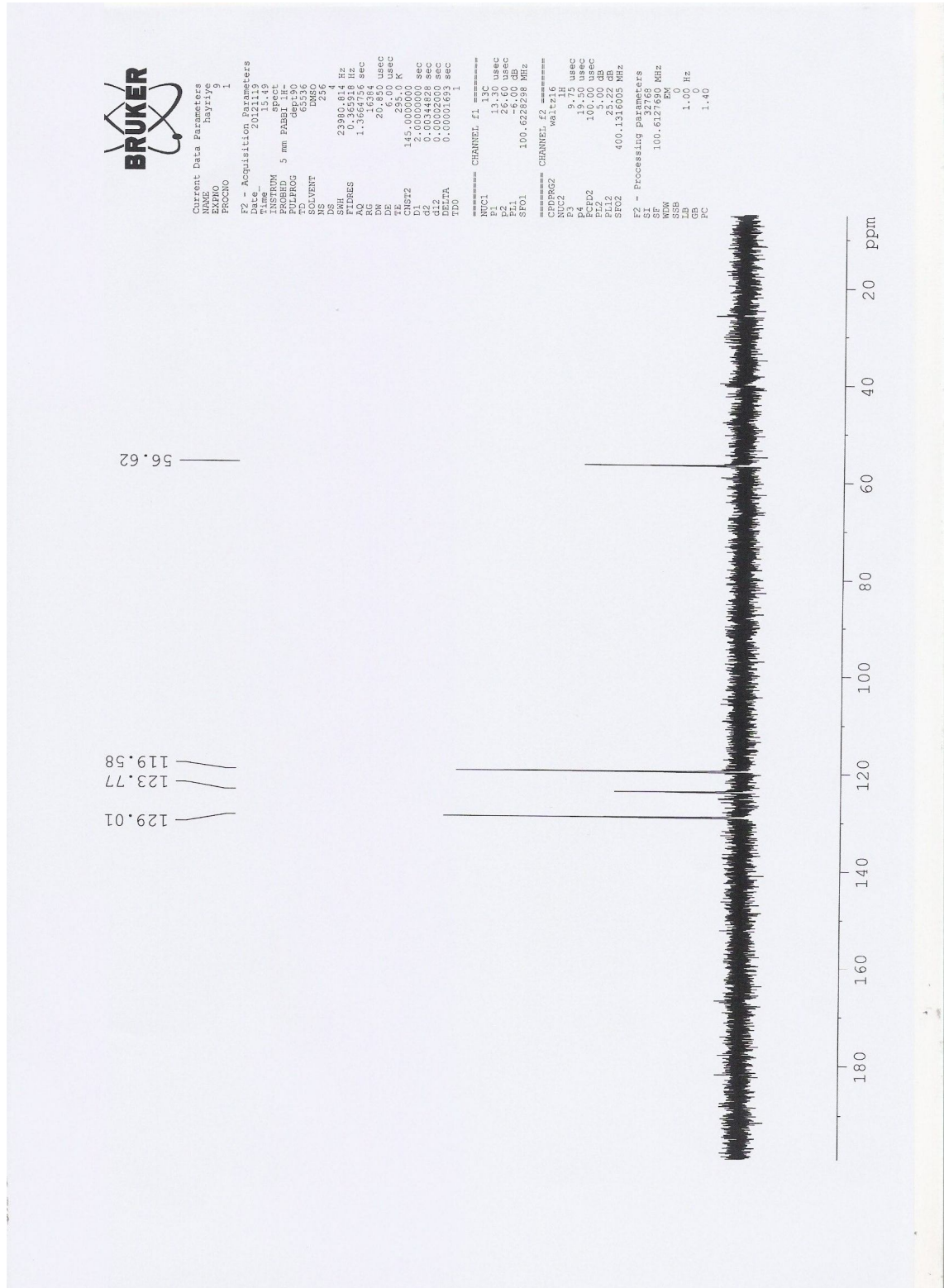
EK 18. N'-fenil-glutamid'in ¹H NMR Spektrumu



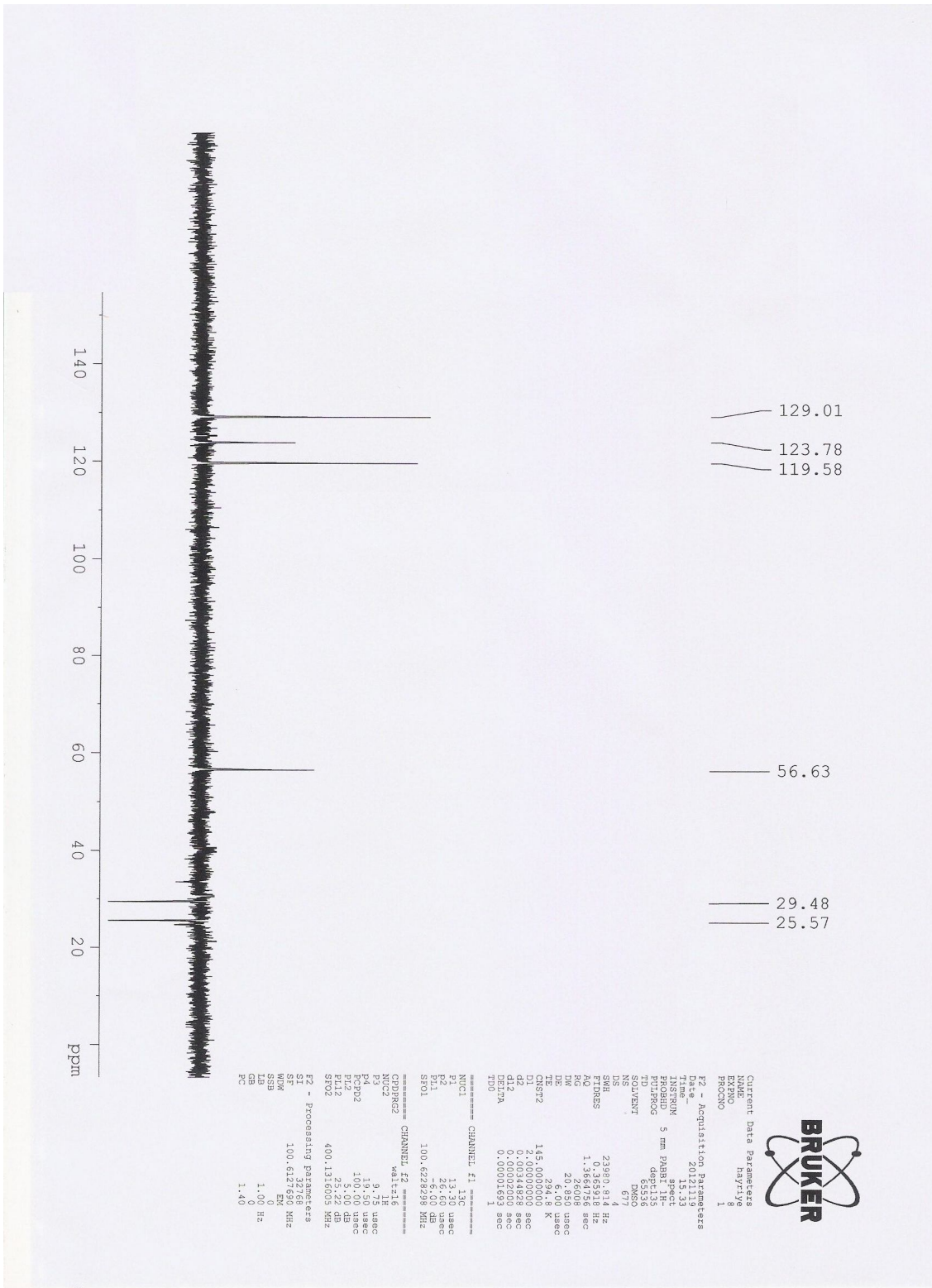
EK 19. N'-fenil-glutamid'in ¹³C NMR Spektrumu



EK 20. N'-fenil-glutamid'in DEPT 90 Spektrumu

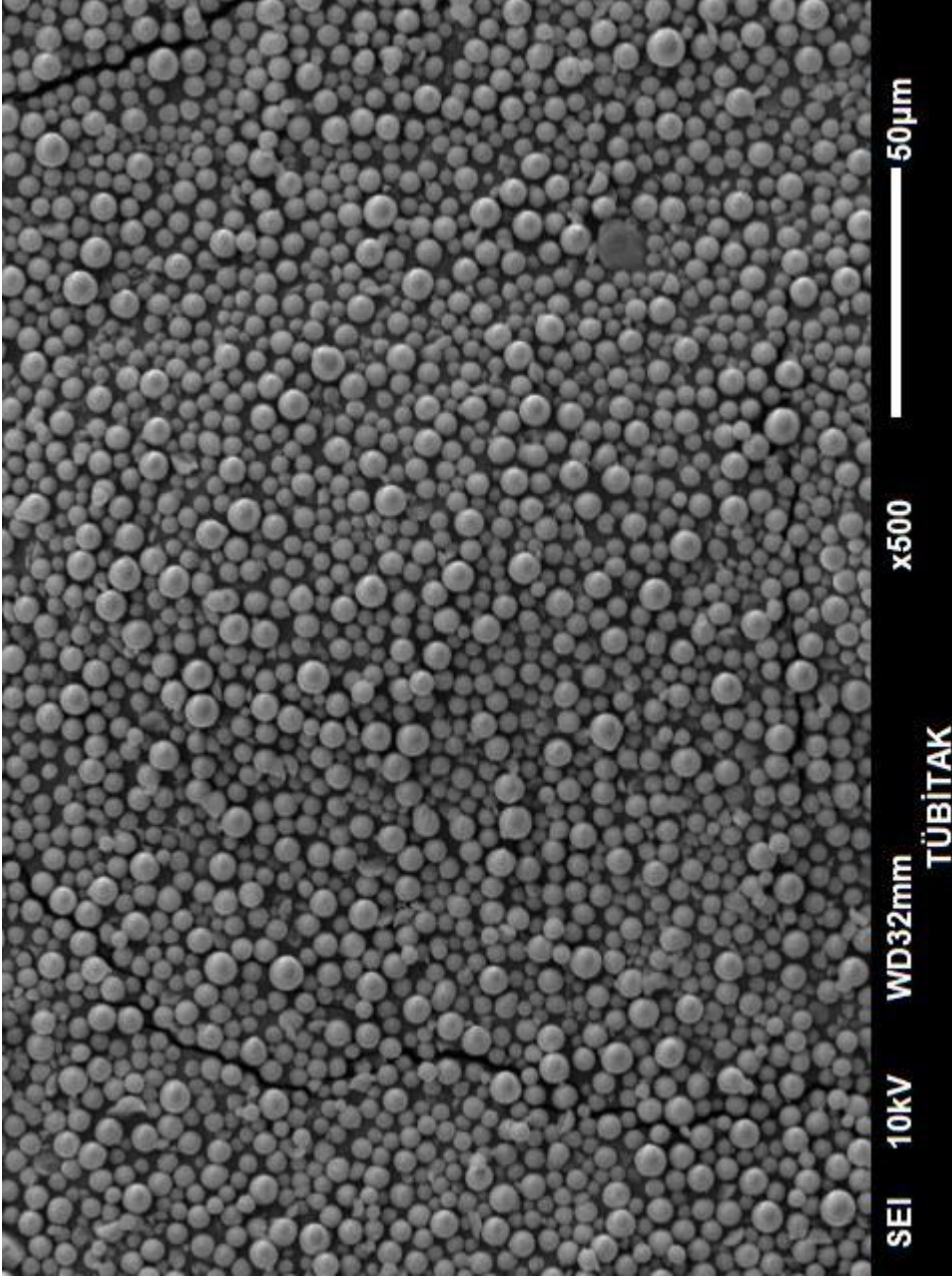


EK 21. N'-fenil-glutamid'in DEPT 135 Spektrumu

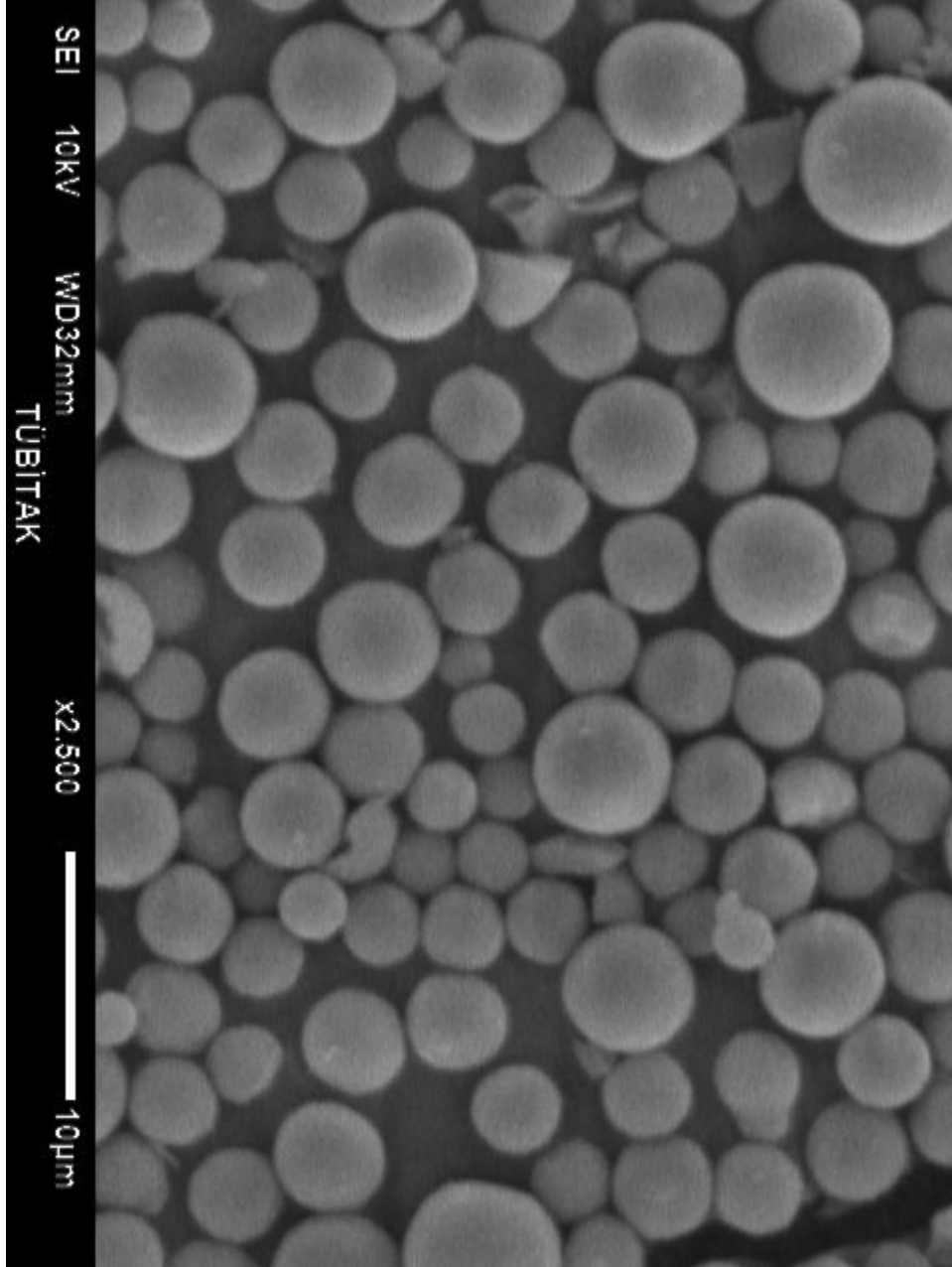


EK 23. SP2 Dolgu Maddesinin SEM Spektrumları

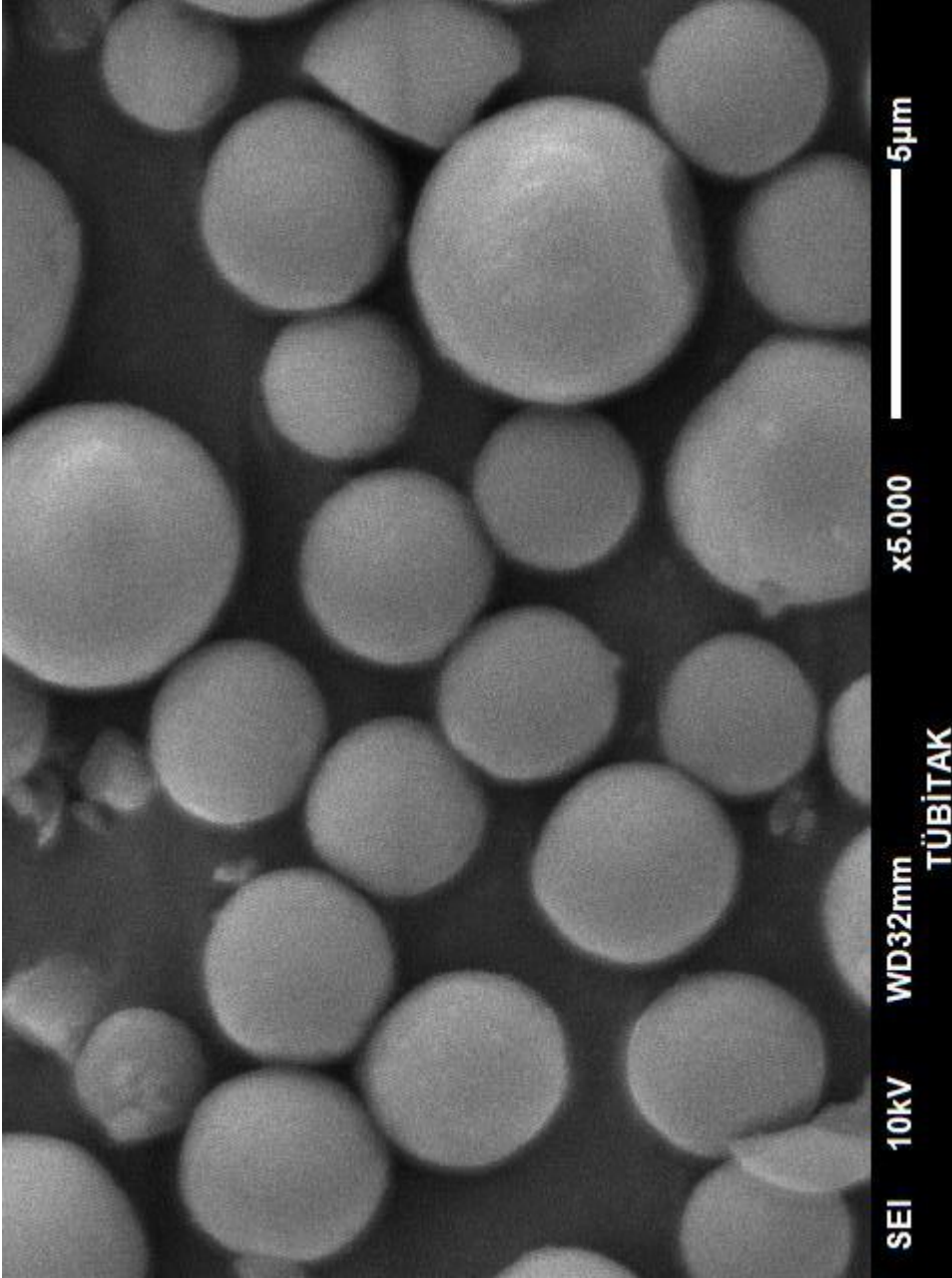
EK 23.1



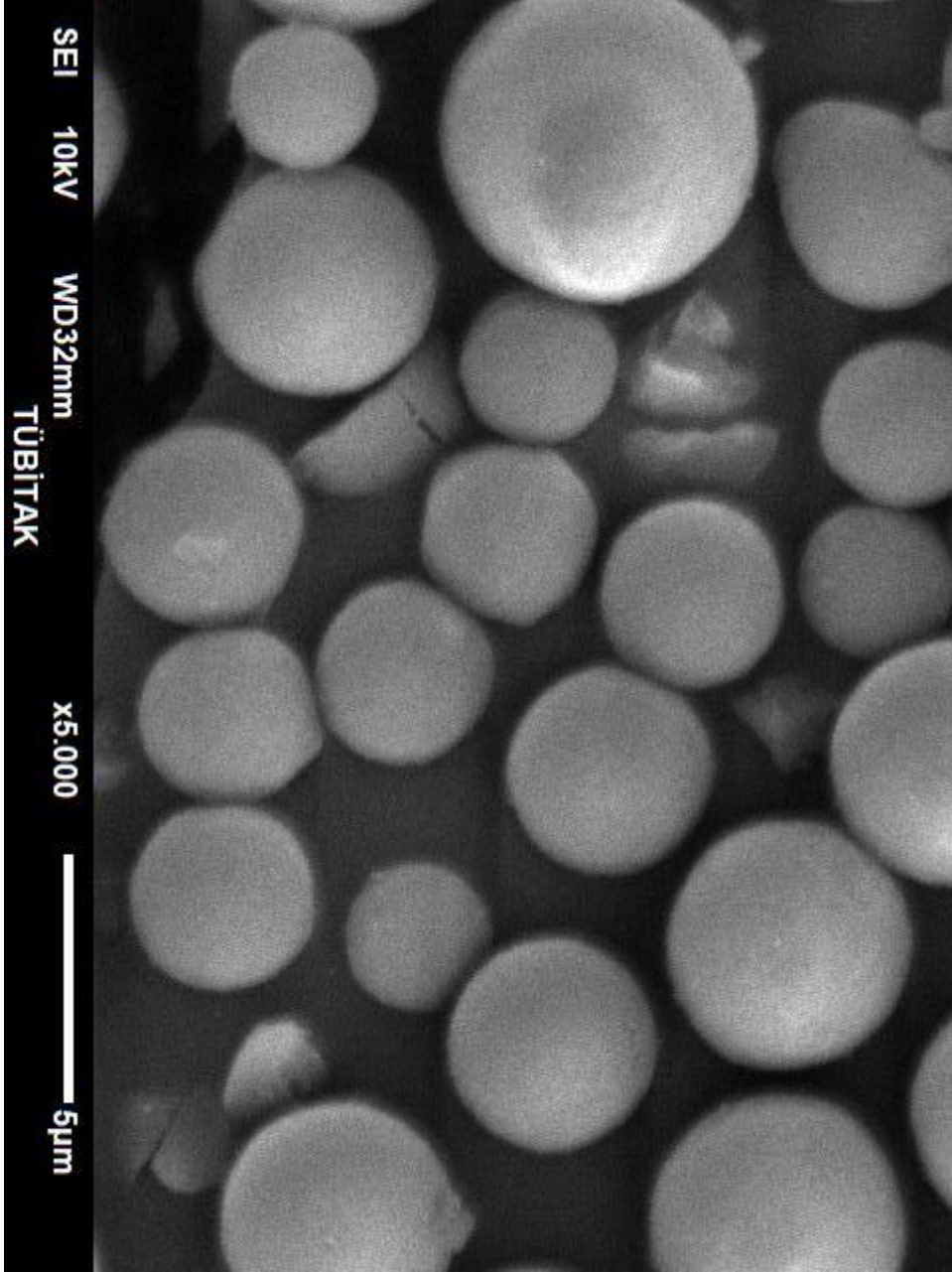
EK 23.2



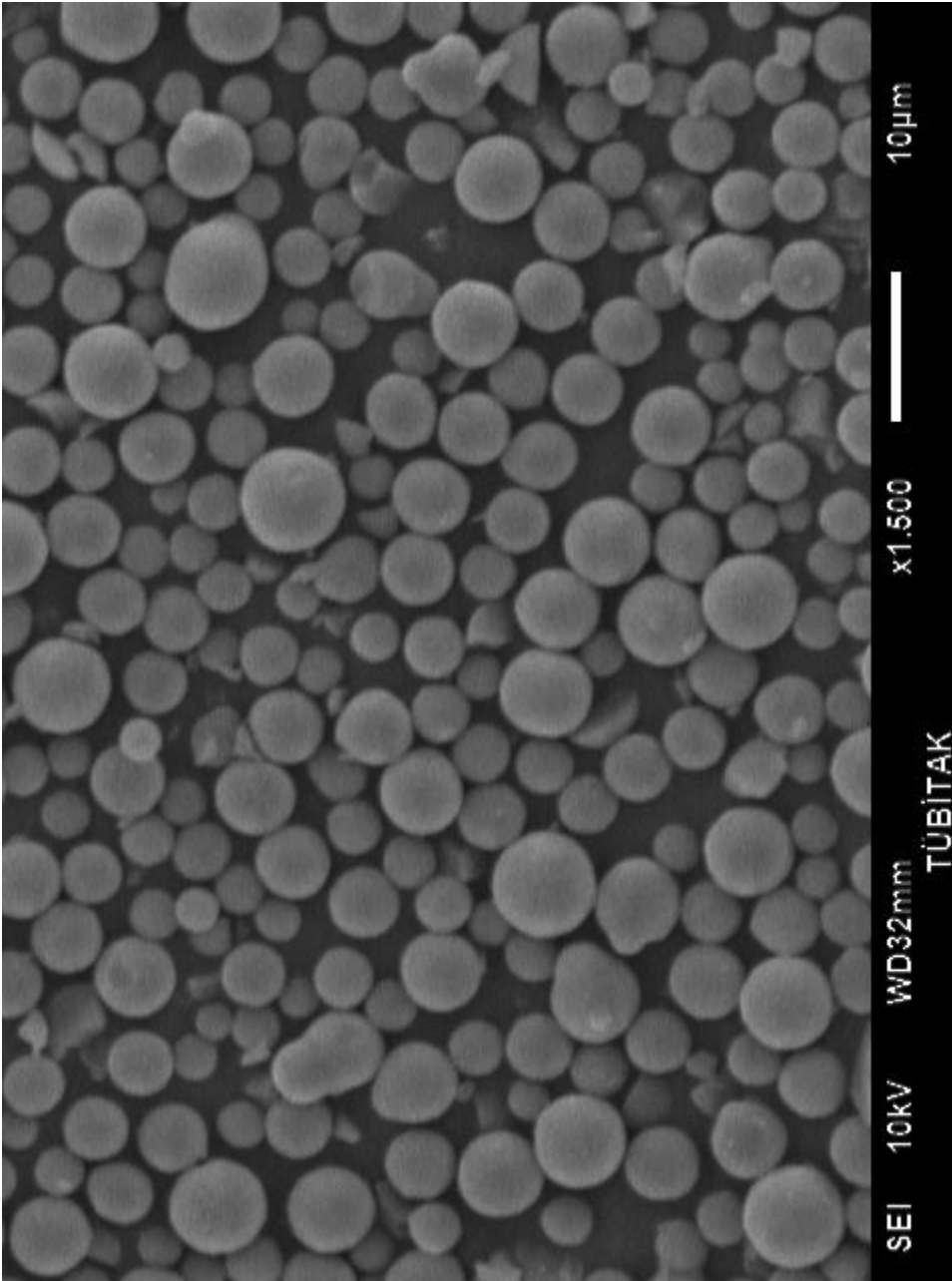
EK 23.3



EK 23.4



EK 23.5



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hayriye ARAL
Doğum Yeri : İslâhiye/Gaziantep
Doğum Tarihi : 05/05/1982
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Antakya Lisesi/Hatay/Antakya 1996-1999.

Lisans : Dicle üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 2001-2005.

Yüksek Lisans : Dicle üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.
2005-2007.

Doktora : Dicle üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.
2007-20