



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ GELİŞTİRİLEN ÇOK FONKSİYONLU
MİXED-MODEL KOLON DOLGU MADDESİNİN
HİLİC-TERS FAZ UYGULAMALARI**

Ramazan ALTINDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalını

**ŞUBAT-2018
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır**

Bu tez rahmetli babam Ramazan ALTINDAĞ'a ithafen yazılmıştır.

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

İmza

Ramazan ALTINDAĞ

Tarih:10.02.2018

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****YENİ GELİŞTİRİLEN ÇOK FONKSİYONLU MIXED-MODE KOLON
DOLGU MADDESİNİN HILIC-TERS FAZ UYGULAMALARI****Ramazan ALTINDAĞ****Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Doç. Dr. Tarık ARAL****2018, ... Sayfa****Jüri****Doç. Dr. Tarık ARAL****Yrd. Doç. Dr. Uyan YÜKSEL****Yrd. Doç. Dr. Murat SÜNKÜR**

Bu tez çalışmasında, daha önce başka bir yüksek lisans tezi kapsamında sentezlenip HPLC kolonu haline getirilen *Ile-PBA-Mix* sabit fazın HPLC ile hidrofilik etkileşim (HILIC)/ters faz (RPLC) sıvı kromatografi mixed-mod özelliği incelendi. *Ile-PBA-Mix* kolonunun yüksek polardan en düşük polariteye kadar farklı grupların ayrılmasında başarı ile kullanıldığı görüldü. *Ile-PBA-Mix* kullanılarak HILIC şartlarında nükleotid/nükleositler ve B vitaminleri ayrıldı. 6 tane nükleosid/nükleotid 10 dakikada, 6 tane B vitamin de 22 dakikada başarı ile ayrıldı. Ayrıca nükleotid/nükleosit ve B-vitaminlerinin ayrılmasına çeşitli deneysel şartların etkisi de incelendi. Kolonun ters fazdaki etkinliğini incelemek için orta polarlıktaki bileşik sınıfları olan anilinler ve fenoller kullanıldı. 9 tane anilin 14 dakikada, 9 tane fenol de 15 dakikada ters faz şartlarında ayrıldı. Bunlara ek olarak yüksek polariteye, orta polariteye ve düşük polariteye sahip 9 analit karışımı da denendi ve HILIC/RP mixed-mode mobil faz ile 19 dakikada ayrılması sağlandı. Ayrılması sağlanan bileşikler için çeşitli kromatografik parametreler (alınma faktörü, pik asimetri faktörü ve teorik tabaka sayısı) hesaplandı. Geleneksel C18 VE HILIC kolonlarla kıyasladığımızda, *Ile-PBA-Mix* kolonunu hem RPLC hem de HILIC performansı sergilediği ve geniş bir analit sınıfına uygulanabildiği görülmüştür

Anahtar Kelimeler: Mixed-mode kromatografi, Polar sabit fazlar, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, HILIC, Ters faz

ABSTRACT**MS THESIS****HYDOPHYLIC INTERACTION-REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY APPLICATION OF A RECENTLY
DEVELOPED MIXED-MODE STATIONARY PHASE****Ramazan ALTINDAĞ****THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN DEPARTMENT OF
CHEMISTRY****Advisor: Doç. Dr. Tarık ARAL
2018, ... Pages****Jury
Doç. Dr. Tarık ARAL
Yrd. Doç. Dr. Uyan YÜKSEL
Yrd. Doç. Dr. Murat SÜNKÜR**

In this work, a novel multifunctional stationary phases synthesized under another graduate thesis was evaluated as a hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography (HPLC). Successful separation could be achieved by Ile-PBA-Mix column among several aromatic compounds having different polarities under both hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and reversed phase (RP) condition. Nucleotides/nucleosides were separated in the HILIC mode. The effects of different separation conditions, such as pH value, mobile-phase content, column temperature, buffer concentration and flow rate, on the separation of nucleotides/nucleosides in HILIC mode were investigated. The seven nucleotides/nucleosides were separated within 22 minutes, while six of them were separated within 10 minutes by isocratic elution. To determine the influence of the new multifunctional stationary phase under the RP condition, a number of moderately and weakly polar and nonpolar compounds, such as 10 substituted anilines and eight substituted phenols were separated successfully under the RP condition within 14 and 15 min, respectively. Additionally, nine mixtures of polar/nonpolar test compounds were simultaneously separated within 19 minutes, while seven of them were separated within 12 minutes, under HILIC/RP mixed-mode conditions. Chromatographic parameters, such as the retention factor and peak asymmetry factor, were calculated for all of the analytes, while the theoretical plate number was calculated for analytes separated by isocratic elution. Compared to traditional C18 and commercial HILIC columns, the new stationary phase exhibited both HILIC and RPLC performance, and the scope of analyte separation was thus enlarged.

Keywords: Mixed-mode chromatography, Mixed-mode stationary phase, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), Reversed phase liquid chromatography

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini, maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Tarık Aral'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada, yakın bir zamanda Doç. Dr. Tarık ARAL'ın yürütücülüğünü yaptığı BTÜBAP-2012-FED-3 No'lu BAP projesi kapsamında sentezlenen bir HPLC kolon dolgu maddesinin HILIC-Ters faz uygulamaları çalışılmıştır. Bu vesile ile Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BATÜBAP)'ne teşekkür ederim.

Sayın Arş. Gör. Dr. Hayriye Aral'a, Sayın Uzm. K. Serdar Çelik ve S. Erkan Yeng'e, kolon dolgu maddesinin sentezi ve tarafımda kullanımını uygun gördükleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans öğrenimim dâhil olmak üzere her konuda hiçbir desteğini esirgemeyen başta annem Kadriye ALTINDAĞ ve eşim Müzeyen ALTINDAĞ olmak üzere aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ramazan ALTINDAĞ
BATMAN-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	2
ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	4
SİMGELER VE KISALTMALAR	6
1. GİRİŞ	8
1.1. Kromatografi.....	8
1.1.1. Ayrılma Mekanizmasına Göre Kromatografi.....	9
1.1.2. Uygulama Biçimine Göre Kromatografi.....	10
1.1.3. Kolon Kromatografisi.....	10
1.1.3.1. Gaz Kromatografisi (GC).....	10
1.1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	11
1.1.3.2.1. HPLC Çeşitleri.....	11
1.1.3.2.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (NPLC).....	11
1.1.3.2.1.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RPLC).....	11
1.1.3.2.1.3. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC).....	13
1.1.3.2.1.4. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC).....	16
1.1.3.2.1.5. İyon Değişim Kromatografisi (IEC).....	17
1.1.3.2.2. HPLC Kullanım Alanları.....	17
1.1.3.2.2.1. Saflaştırma.....	17
1.1.3.2.2.2. Bileşen Ayırma.....	17
1.1.3.2.2.3. Tanımlama.....	17
1.1.3.2.2.4. Derişim Tayini.....	17
1.1.3.2.3. HPLC Sistemleri.....	18
1.1.3.2.3.1. Kolon.....	18
1.1.3.2.3.2. Dedektör.....	19
1.1.3.2.3.3. Pompa.....	19
1.1.3.2.3.4. Hareketli Faz.....	20
1.1.3.2.3.5. Sabit Faz.....	21
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	23
2.1. Mixed-mode Kromatografi	23
2.2. Mixed-Mode Sıvı Kromatografik Sabit Fazlar	24
2.2.1. RPLC/IEC Sabit Fazlar	25
2.2.2. RPLC/HILIC Sabit Fazlar	28
2.2.3. HILIC/IEC Sabit Fazlar	31
2.2.4. RPLC/HILIC/IEC Sabit Fazlar	33
2.2.5. Diğer MHPLC Sabit Fazlar	35
2.3. MHPLC Malzemelerinin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu	37
2.3.1. MHPLC Malzemelerinin Hazırlanması	37

2.3.1.1. Tıklama Kimyası.....	38
2.3.1.2. Yüzeyde Başlayan Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu.....	39
2.3.1.3. Diğer Metodlar.....	39
2.3.2. MHPLC Materyallerinin Karakterizasyonu.....	40
2.3.2.1. Fizikokimyasal Özelliklerin Karakterizasyonu	40
2.3.2.2. Kromatografik Tutunma Mekanizmasının Karakterizasyonu.....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Reaktifler ve Materyaller	42
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Kromatografik Parametreler	44
4.2. HILIC Modda Nükleotid ve Nükleozidlerin Ayrılması.....	47
4.2.1. Hareketli Faz İçeriğinin Etkisi.....	48
4.2.2. Tampon pH'ı ve Konsantrasyonunun Etkisi.....	49
4.2.3. Sıcaklık ve Akış Hızının Etkisi.....	51
4.3. B Vitaminlerinin HILIC ayrılması.....	52
4.4. Ters Faz Modda Ayırma	55
4.4.1. Polar/nonpolar test bileşiklerinin Ayrılması.....	55
4.4.2. Anilinlerin Ayrılması.....	56
4.4.2. Fenollerin Ayrılması.....	58
4.5. Kolon Stabilite Testleri.....	59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	63
EKLER	72
ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

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



1. GİRİŞ

1.1. KROMATOGRAFI

Kromatografi bir ayırma tekniğidir. Örnek içerisindeki bileşenler bireysel olarak ayrılarak kantitatif olarak belirlenir. Kromatografide ayrılacak bileşenler iki faz (sabit faz ve hareketli faz) arasında dağılıma uğrar. Bu fazlardan birini geniş bir yüzey alanına yayılmış sabit bir yatak oluştururken, diğer faz hareketli olup, sabit fazın üzerinden akarak ilerler. Bu iki faz birbiriyle temas halinde olup, karışmazlar. Bir karışımdaki bileşenlerin her türlü fiziksel ve kimyasal özellikleri ne kadar farklı olursa, söz konusu karışım o kadar iyi ayrılabilir. Sistemde en az alıkonan bileşen önce taşınır, daha kuvvetle tutulan bileşen ise daha geç çıkar. Sabit faz katı veya sıvı olabilir. Hareketli faz da gaz veya sıvı halde bulunabilir.

Kromatografi aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılabilir.

✓ Ayrılma Mekanizmalarına Göre

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- Dağılıma (Partisyon) Kromatografisi
- İyon Değiştirme Kromatografisi
- Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi
- İyon Çifti Kromatografisi
- Afinite Kromatografisi

✓ Faz Tiplerine Göre

- Sıvı Kromatografisi
- Sıvı-Katı Kromatografisi
- Sıvı-Sıvı Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi
- Gaz-Katı Kromatografisi
- Gaz-Sıvı Kromatografisi

✓ Uygulama Biçimine Göre

- Düzlemsel Kromatografi
- Kâğıt Kromatografisi
- İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
- Kolon Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi (GC)
- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

1.1.1. Ayrılma Mekanizmasına Göre Kromatografi

- Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon, bir karışımda bulunan sıvı veya gaz halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunmasıdır. Adsorpsiyon kromatografisi ise örnek bileşenlerinin dolgu maddesinin yüzeyinde farklı olarak tutunmaları sonucu meydana gelen bir ayırma işlemidir.

Adsorpsiyon kromatografisinde; maddeler katı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında etkileşir. Burada sabit faz; durgun ve hareketsiz faz iken hareketli faz ise sabit faz üzerinde hareket ederek numune bileşenlerinin ayrılmasını sağlayan fazdır.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz; ayrılması gereken maddeleri parçalamamalı, kimyasal reaksiyon vermemeli, adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı ve adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri verecek bir yapıda olması gerekir.

- Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Dağılma kromatografisinde; maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında dağılır. Birbirleriyle karışmayan iki sıvıdan, yani iki fazdan oluşan bir faz sistemi içine konulan madde bu sıvılardaki çözünürlüğe bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabit olup dağılma katsayısı ile ifade edilir ve K_d ile gösterilir. Böylece K_d değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar.

$$K_d = C_1 / C_2$$

C_1 = Maddenin 1. Fazdaki derişimi,

C_2 = Maddenin 2. Fazdaki derişimi

- İyon Kromatografisi

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır.

1.1.2. Uygulama Biçimine Göre Kromatografi

- Düzlemsel Kromatografisi

Düz bir yüzey halinde durgun fazın kullanıldığı ve hareketli fazın bu yüzeyde yer çekimi veya kapiler etkisiyle hareket ettiği kromatografik yöntemlerden biridir. Kâğıt kromatografisi ve İnce tabaka kromatografisi (TLC) olarak 2'ye ayrılır.

Kâğıt Kromatografisi: Bu yöntemde kalın bir süzgeç kâğıdı destek; gözeneklerine yerleşen su ise “sıvı fazı” oluşturur. Hareketli faz bir yürütücü tank içine yerleştirilmiş uygun bir sıvıdır. Bu durumda, kâğıt kromatografisi “sıvı-sıvı dağılım kromatografisi” olarak da adlandırılabilir.

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC): İnce tabaka kromatografisi, bir “katı-sıvı adsorpsiyon” kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz çeşitli boyutlardaki cam plakalar üstüne ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde kullanılan tüm katılar (alümina, silika jel, selüloz v.b.) kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarıya doğru olur. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür. Bu işlem sırasında, plakanın alt kesimlerine bir damlalıklı önceden damlatılmış olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır.

1.1.3. Kolon Kromatografisi

1.1.3.1. Gaz Kromatografisi

Kromatografik ayırimda, maddeler karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan biri hareketli faz diğeri sabit fazdır. Karışımındaki her maddenin hareket hızı dağılıma katsayısı ile belirlenir. Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit fazda dağılımı yüksek olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolon olarak adlandırılan birbirine yakın gözenekli partiküller sabit faz olarak adlandırılır. Hareketli faz ise bu partiküller arasındaki boşluğu doldurur. Hareketli faz kolon boyunca maddeleri sürükler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyon profili pik olarak adlandırılır, piklerin oluşturduğu tabloya da kromatogram adı verilir. Hareketli fazın gaz, sabit fazın ise sıvı olarak kullanıldığı kromatografi türüne gaz kromatografisi adı verilir. Gaz-katı kromatografisinde sıyırıcıya ait kuyruk pikler

oluştduğundan uygulamada bazı sınırlamalar vardır. Bu pikler adsorbsiyon izotermelerinin doğrusal olmayan özelliklerinden kaynaklanır. Ayrıca aktif gazların sabit faz üzerinde kalış süreleri kararlı değildir. Bu tip dezavantajlar, gaz-sıvı kromatografisinin geliştirilmesine yol açmış ve son yirmi yılda bu konuda önemli ilerlemeler olmuştur. Son yıllarda çıkarılan HPLC yöntemi ile gaz-sıvı kromatografisi uygulamalarının çoğu daha hassas ve verimli bir şekilde yapılabilir hale gelmiştir.

1.1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır.

1.1.3.2.1. HPLC Çeşitleri

Yüksek performanslı sıvı kromatografisini(HPLC) sabit fazın yapısına ve ayırma işlemine göre 5 farklı şekilde incelenebilir.

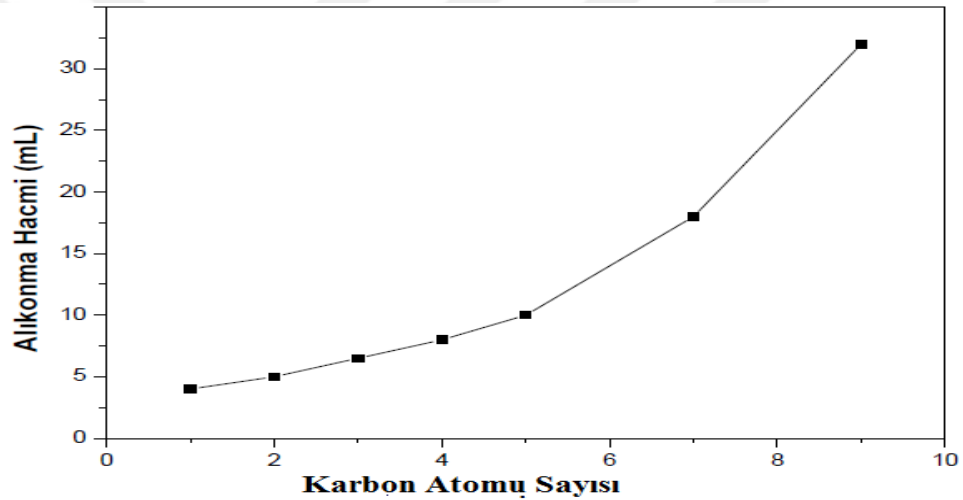
1.1.3.2.1.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC)

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 örneklerle oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

1.1.3.2.1.2. 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 1.1.3.2.1.2’de verilen örnekte birbirinin homoloğu olan alkilbenzen karışımındaki artan karbon atom sayısı ile alıkonma hacminin artışı belirgin şekilde görülebilir (Ünsal, E. 2006).



Şekil 1.1.3.2.1.2. Kolon: Hipersil-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 tablo 1.1.3.2.1.2’de verilmiştir. RPC uygulamalarında kullanılacak hareketli faz türünün belirlenmesi sabit 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 (H. Aral 2013).

Tablo 1.1.3.2.1.2. RPLC’de yaygın olarak kullanılan hareketli faz tür ve özellikleri

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

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 matrisler 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 (µmol/m²) ve polariteleri alıkonma süresini etkileyen diğer önemli bir parametredir (H. Aral 2013).

1.1.3.2.1.3. 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 seçicilige 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 grupta 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).

1.1.3.2.1.4. Büyükölçü Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC)

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

1.1.3.2.1.5. 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.

1.1.3.2.2. HPLC Kullanım Alanları

HPLC günümüzde saflaştırma, tanımlama, bileşen ayırma ve derişim tayini başta olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1.3.2.2.1. 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.

1.1.3.2.2.2. 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.

1.1.3.2.2.3. 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.

1.1.3.2.2.4. Derişim Tayini

HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik derişimlerde HPLC’ye enjekte edilmesi işlemi içerir. Bilinen derişimler bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak

derişime karşı grafiğe geerilir 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:

➤ **İzokratik Elüsyon**

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

➤ **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.

1.1.3.2.3. HPLC Sistemleri

Standart HPLC donanımı temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimleri bileşenlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözünmüş 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.

1.1.3.2.3.1. 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 elik 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) ok 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.

1.1.3.2.3.2. 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

1.1.3.2.3.3. 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

1.1.3.2.3.4. Hareketli Faz

Örnek bileşenlerini, kolon boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözeltiler 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.(H.Aral 2013)

1.1.3.2.3.5. 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;

- 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 (H. Aral 2013).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC, kısaca LC) çok yönlü bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılması için en çok kullanılan kromatografik yöntemdir. HPLC ayırma modları genellikle analitler ve sabit faz arasındaki etkileşime göre sınıflandırılır. Geçtiğimiz 10 yıl boyunca, ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC), iyon değiştirme kromatografisi (IEC),

büyükölükçe ayırma kromatografisi (SEC) gibi birkaç HPLC ayırma modu geliştirildi (H. Aral 2013).

Bu geleneksel kromatografik işlemlerde, analitler ile sabit faz arasında yalnızca bir baskın tip etkileşim vardır. Burada, ikincil bir etkileşim tipinin, genellikle kolon verimliliğinin kaybedilmesine yol açtığı için zararlı olduğu belirtilmiştir (B.C.Trammell ve ark. 2011, B.-Y.Zhu ve ark. 1992, Y.Kawade ve ark. 1963). Örneğın, silika jel temelli matrisler üzerindeki serbest silanol gruplarının RPLC ile çözünürlüğü etkilediğı bilinmektedir (R.Nikolov 1984), hidrofobik etkileşimler İEC'de tutulmayı değıştirir (J.M.Bussolo 1984), elektrostatik etkiler ise genellikle SEC'de mevcuttur (M.T.W.Hearn ve ark. 1983). Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RPLC) en yaygın kullanılan HPLC türüdür (A.A.Kazarian ve ark. 2013, D.Cho ve ark. 2003, S.Kawano ve ark. 2015, M.R.Sardar ve ark. 2014, S.Kawano ve ark. 2013) ve bu kromatografi türü hidrofobik analitlerin ayrılması için en uygun seçenektir. Bununla birlikte, RPLC, yüksek polariteye sahip ve yüklü çözeltilerin analizi için uygun değıildir. Ayrıca, proteinler gibi bazı biyolojik numuneler, mobil fazda kullanılan organik çözücüler ve sabit fazın aşırı hidrofobikliği ile biyoaktivitesini kaybedebilir (C.Song ve ark. 2013). Bu yöntemle alternatif olarak 1990 yılında ilk kez Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HILIC) öne sürülmüş ve tutma mekanizması Alpert ve ark. tarafından aydınlatılmıştır (A.J.Alpert 1990). 1990'dan günümüze kadar HILIC, polar ve hidrofilik bileşiklerin ayrılması için en uygun teknik haline geldi (Z.Guo ve ark. 2007, A.J.Alpert 2008, C.H.Lin ve ark. 2015). Ancak, HILIC'in mobil fazı her zaman yüksek oranda organik çözücülerden oluşur, bu nedenle örneklerin çözünürlüğü sınırlıdır.

Sabit faz HPLC'nin en temel unsurudur. Alıkonma mekanizması, ayırma selektivitesi ve kolon etkinliği çoğunlukla sabit fazın yapısına bağılıdır (L. Zhang ve ark. 2016). Geleneksel HPLC sabit fazlar ile analitler arasında tekli mekanizmaya geçerli iken (P.Janas ve ark. 2016, Y.Lui ve ark. 2008, P.Jandera ve ark. 2011, X.Guo ve ark. 2014, P.Jiang ve ark. 2014), mixed-mode sabit fazları ile analitler arasında çoklu mekanizma geçerlidir (X.Lui ve ark. 2008, H.Hinterwirth ve ark. 2010, X.Lui ve ark. 2010, X.Lui ve ark. 2011). Mixed-mode mekanizmada sabit faz ile analitler arasında en az iki farklı moleküller arası etkileşim olmalıdır (Y.Zhao ve ark. 2015). Geleneksel tekli mekanizmaya dayanan sabit fazlara kıyasla, mixed-mode sabit fazlar daha yüksek ayırma selektivitesi, yüksek bağlanma kapasitesi ve yüksek ayırma etkinliği sağlar (Y.Yang ve ark. 2011, Y.Li ve ark. 2011, X.Qiao ve ark. 2015, M.Sun ve ark. 2013, K.Hu ve ark. 2013, S.Ray ve ark. 2012). Son yıllarda mixed-mode kromatografisi hızla

gelişmeye başlamış olup, yüksek polardan düşük polara kadar geniş bir analit sınıfının analizi için çok yönlü bir yaklaşım sunmaktadır (K.Ohyama ve ark. 2010, H.Qiu ve ark. 2012, S.Wongyai ve ark. 1994).

İlk mixed-mode sabit faz 1986'da Brown ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (A.Halfpenny ve P.Brown 1986). Bu çalışmada, yeni bir sabit fazın sentezi yapılmamış, basit bir şekilde iki farklı kolonun seri şekilde birbirine bağlayarak mixed-mode mekanizması üzerinden ayırma sağlamışlardır. Yine 1986'da, Regnier ve çalışma arkadaşları tarafından, mixed-mode mekanizması ile ayırma yapan iki yeni sabit faz sentezlendi (L.AKennedy, F.E.Regnier ve ark. 1986). İlk önce bir poliamin silica yüzeyine tutturuldu, daha sonra da çok fonksiyonlu oksiran veya bir anhidrit ile etkileştirilerek iki farklı sabit faz hazırlandı. Bu dolgu maddeleri ile paketlenen kolon ile mixed-mode şartlarında çalışılarak proteinlerin ayrılmasında kullanıldı. Bu çalışmadan sonra günümüze kadar pek çok mixed-mode materyal geliştirilmiş olup, son birkaç yılda bu alanın gelişimi büyük bir ivme kazanmıştır (L.Zhang ve ark. 2016, L.W. McLaughlin. 1989, Y.Yang ve ark. 2011, L.Wang ve ark. 2016).

Geleneksel ters faz (RPLC) kolonlar çoğunlukla düşük ve orta polariteli bileşik sınıflarının ayrılması için kullanırken, daha yeni bir alan olan hidrofilik etkileşim kromatografi (HILIC) kolonları ise yüksek polariteye sahip analit sınıflarının ayrılmasında kullanılmaktadır. Bir mixed-mode kolon ise yüksek polariteden düşük polariteye kadar tüm analit sınıflarının ayrılması için uygun olabilir. Böylece RPLC ve HILIC'in ayrı ayrı yaptığı işleri tek bir kolonla yapmak mümkün olur (K.Hu ve ark. 2016). Bazı RPLC/HILIC mixed-mode sabit fazlar ve kullanım alanları ilgili referansta tablo halinde verilmiştir (L.Wang ve ark. 2016). En ideal dolgu maddesini bulmak için bu alandaki çalışmalar artarak devam etmektedir.

Mixed-mode yüksek performanslı sıvı kromatografisi (MHPLC), ayarlanabilir seçicilik, yüksek çözünürlük ve yüksek numune yükleme kapasitesi gibi olağanüstü ayırma özelliklerine sahip bir kromatografik teknik türüdür. Adından da anlaşılacağı üzere, MHPLC çok yönlü kromatografik tutma mekanizmaları için sabit fazlar ve çözünenler arasında birden fazla etkileşim biçimi kullanır ve bu nedenle bir MHPLC kolonu, iki veya daha fazla geleneksel tek modlu kolonun yerini alabilir. Mixed-mode sabit fazlı materyallerin fizikokimyasal özellikleri MHPLC'nin gelişiminin temelini oluşturmaktadır. Güncel yayınlarda, MHPLC sabit fazları için son gelişmelere sıklıkla rastlanmaktadır. Hızla gelişmekte olan bu alanda gelecekteki görünüm de tartışılmaktadır.

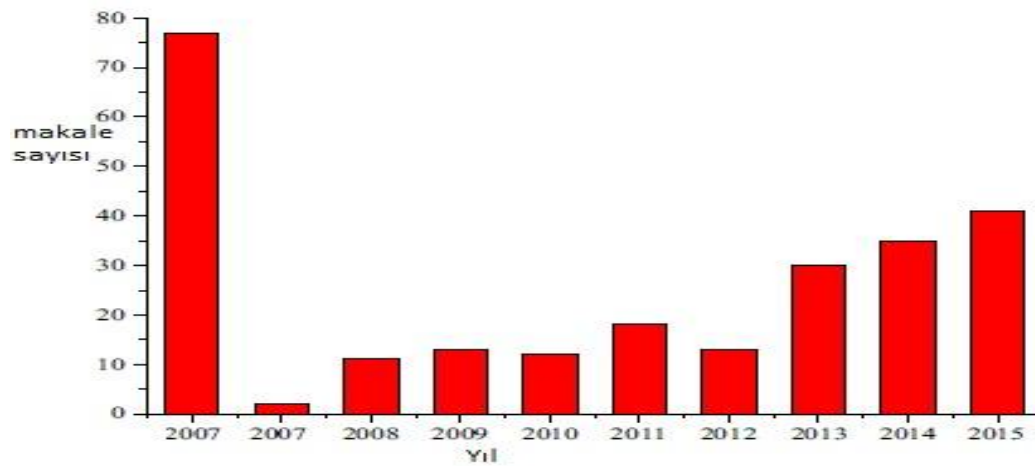
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mixed-mode Kromatografi

HPLC tekniğini daha güçlü hale getirmek için, bilim adamları birden fazla etkileşimin bir arada bulunmasının bazı spesifik koşullarda yararlı olabileceğini keşfetti. Böylece MHPLC, tek modlu kromatografiye alternatif veya tamamlayıcı bir yaklaşım olabilen yeni bir kromatografik ayırma türü olarak ortaya çıkmıştır (D.Cho ve ark. 2003, A.Shen ve ark. 2013, N.H.Davies ve ark. 2007). MHPLC, adından da anlaşılacağı üzere, durağan fazlar ile çözünen maddeler arasında birden fazla etkileşim biçimi kullanır ve tek bir kromatografik kolonda birden fazla ayırma modu elde edebilir (G.Zhao ve ark. 2009). MHPLC şimdiye kadar, oldukça karışık analit sınıflarının polar iyonlardan polar olmayan organik bileşiklere eşzamanlı olarak ayrılması için esnek ve çok yönlü bir yaklaşım olduğunu göstermiştir (K.Ohyama ve ark. 2010, H.Qiu ve ark. 2012, S.Wongyai ve ark. 1994). Ayrıca MHPLC'ler, genellikle yüksek yükleme kapasitesine sahiptir ve yarı-preparatif ve preparatif kromatografi için uygundur (N.H.Davies ve ark. 2007, S.C.Burton ve ark. 2001). Bu nedenle, birçok bilimadamı bu alana ilgi duydu; yakın zamanda MHPLC sabit fazları için kullanılabilen yeni materyaller daha fazla tasarlandı (L.C.Sander ve ark. 1984, K.B.Sentell ve ark. 1989, K.Kimata ve ark. 1995, A.K.Mallik ve ark. 2010).

MHPLC sabit fazları, hidrofobik ve iyon-değişim etkileşimleri (RPLC/IEC), hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler (RPLC/HILIC), hidrofil ve iyon-değişim etkileşimleri (HILIC/IEC) ve bunlar gibi ikiden fazla etkileşim türü içerecek şekilde sınıflandırılabilir. Mixed-mode kromatografi kavramı ilk olarak Brown ve ark. tarafından 1986 yılında ileri sürülmüştür (A.Halfpenny, P.Brown ve ark. 1986). Aynı yıl, hem anyon değişimi hem de hidrofobik etkileşimler sağlayabilen MHPLC'nin sabit fazları için birkaç madde ilk kez Regnier ve ark. tarafından önerildi (L.A.Kennedy, F.E.Regnier ve ark. 1986). Bu materyallerin hazırlanması için iki yöntem uygulandı. Her ikisi için de önce bir poliamin, makro gözenekli silis boncuklarının yüzeyine adsorbe edildi ve sonra sırasıyla ana gruplarında küçük bir anhidrit molekülü ile açillenmiş çok işlevli bir oksiran ile çapraz bağlandı. Bu materyalle dolu kolonla, protein ayırımı için uygun olan RPLC/IEC mixed-mode'ta çalıştırılabilirdi gösterilmiştir. Bundan sonra, RPLC/HILIC, HILIC/IEC ve hatta RPLC/HILIC/IEC gibi diğer MHPLC'ler için daha fazla sabit faz geliştirildi. "Mixed-mode kromatografisi" teriminin ilk ortaya çıkışından bu yana MHPLC'ye olan ilgi gün geçtikçe arttı. Akademik arama motorlarında başlık kısmında "Mixed-mode sıvı kromatografisi" anahtar kelimesi ile

arama yapıldığında 2015 yılının Eylül ayında yaklaşık olarak 250 adet makale bulunmuştur. Bununla birlikte, son on yılda yalnızca MHPLC ile ilgili makaleler vardır. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, 2007'den yaklaşık 20 yıl önce yaklaşık 77 makale bildirildi, ancak yalnızca 2015'te (dokuz ay) 41 makale yayınlandı. İstatistiksel sonuçlar, MHPLC için yeni materyallerin geliştirilmesi ve uygulanmasının kromatografik bilimde önemli bir parametre olduğunu gösteriyor. 1989'da McLaughlin, MHPLC'nin nükleik asidin ayrılması ve saflaştırılması için uygulanmasını gözden geçirdi (L.W. McLaughlin 1989). 2008'de Mant ve Hodges, peptidlerin ve proteinlerin analizi için HILIC/IEC'nin geliştirilmesi ve uygulanmasını çalıştı (C.T.Mant ve R.S.Hodges 2008). 2011'de Geng tarafından MHPLC'nin gelişimi ve biyopolimerlere olan uygulamaları gözden geçirildi (Y.Yang, X.Geng ve ark. 2011). Dolayısıyla, bu incelemeler ağırlıklı olarak biyomolekül analizinde MHPLC'nin uygulama ilerlemesiyle ilgilidir. Bununla birlikte, MHPLC sabit fazları için materyallerin hiçbir zaman özetlenmediği söylenebilir.



Şekil 2.1. "Mixed-Mode sıvı kromatografisi" başlıklı makale sayılarının yıllara göre dağılımı

2.2. Mixed-Mode Sıvı Kromatografik Sabit Fazlar

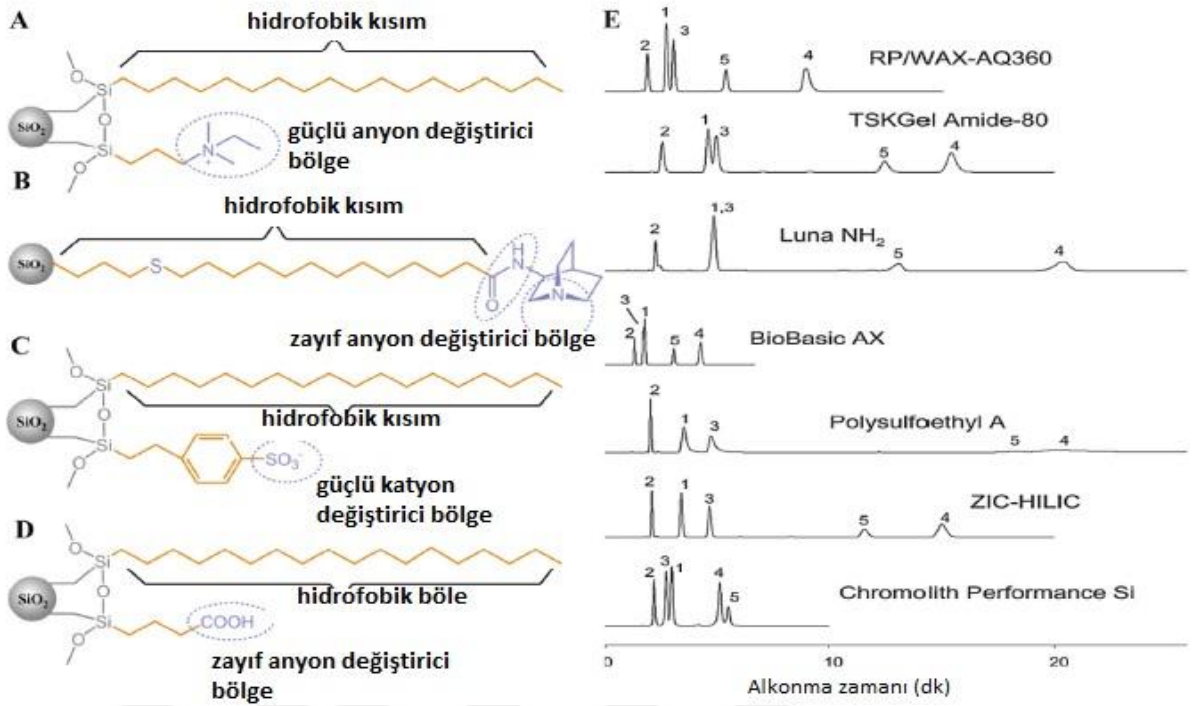
Bilindiği üzere, HPLC'nin gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi gibi birçok çeşidi vardır. Genel olarak, mixed-mode ayırma mekanizması, bu kromatografi çeşitlerinin alt başlıklarında meydana gelmiştir. Örneğin, hidrofobik etkileşim ve iyon değişimi sıklıkla kolon kromatografisiyle birleştirilir (J.Weı ve ark. 2012, A.Zimmermann ve ark. 2014, X.Li ve ark. 2012, X.Cai ve ark. 2012). Prensi olarak, iki farklı durağan fazın tek bir kolona fiziksel olarak harmanlanması, bazen mixed-mode ayırma etkisini elde edebilir (A.J.Link ve ark. 1999, D.A.Wolters ve ark. 2001, M.P.Washburn ve ark. 2001, W.H.McDonald ve ark. 2002, M.Walsh ve ark. 1995, A.Motoyama ve ark. 2007). Bununla birlikte, bu yöntemle ilgili

sorunlar, ortaya çıkan HPLC kolonlarının tekrarlanabilirliği ve homojenliği ile ilgili endişeleri içerir.

2.2.1. RPLC/IEC Sabit Fazlar

Ters Fazlı Sıvı Kromatografisi (RPLC), RPLC/IEC ile karşılaştırıldığında yüksek polariteye sahip bileşiklerin ayrılması için avantajlıdır (J.Weı ve ark. 2012, H.Qiu ve ark. 2013). RPLC/IEC'de, iyon alışverişı prensibi ayrıntılı olarak Güçlü Anyon Değişimi (SAX), Zayıf Anyon Değişimi (WAX), Güçlü Katyon Değişimi (SCX) ve Zayıf Katyon Değişimi (WCX) modları olarak sınıflandırılabilir. RPLC/IEC sabit fazları için kullanılan materyallerin çoğunluğu homojen olarak bağlanmış karışık ligandlara sahip silis matrislerinden üretilmektedir. RPLC'de başarılı olmak için, karışık ligandlar genellikle farklı uzunlukta, örneğin C18, C12, gibi alkil zincirlerinden oluşan hidrofobik kısımları içermelidir. Genellikle SAX (J.Weı ve ark. 2012, A.Abbood ve ark. 2009, 2010) için kuaterner amonyum grupları, aminoquinoklidin (A.Zimmermann ve ark. 2014, A.Abbood ve ark. 2009), aminotropın (H.Hinterwirth ve ark. 2010), imidazol (H.Qiu ve ark. 2006, M.Sun ve ark. 2009) ve piridin (M.Sun ve ark. 2011) grupları WAX etkileşim bölgeleri olarak kullanılır. Öte yandan, sırasıyla SCX ve WCX etkileşim bölgeleri olarak sülfonik asit (X.Li ve ark. 2012, H.Qiu ve ark. 2013) ve karboksil grupları (X.Cai ve ark. 2012) kullanılmaktadır. Tablo 2.2.1'de, bazı RPLC/IEC sabit faz materyalleri, karakterizasyon yöntemleri, ilgili mobil fazlar ve analitler listelendi.

Guo ve ark. Silika taneciklerin yüzeyinde kuaterner amonyum ve C18 alkil zincirinin kopolimerleştirilmesi yoluyla RPLC/SAX sabit fazlar için yeni bir materyal geliştirdi (Şekil 2.2.1 A) (J.Weı ve ark. 2012). RPLC modunda, toluen ve etilbenzen'in analizi için mobil faz olarak su-metanol (%40/%60) kullanılmıştır. IEC modunu değerlendirmek için piridin, benzoik asit ve aristolokhik asit, mobil faz olarak asetronitril (ACN), su ve 500 mM amonyum format solüsyonu kullanıldı (pH değeri 3.0 veya 6.2).



Şekil 2.2.1. Mixed-Mod Sabit Fazlar için materyaller, (A) RPLC/SAX, (B) RPLC/WAX, (C) RPLC/SCX VE (D) RPLC/WCX. (E) RP / WAX fazındaki nükleozitlerin piyasada bulunan sabit fazlarda elde edilenlerle ayrışmasının karşılaştırılması. 1. Adenozin, 2. Timidin, 3. Uridin, 4. Guanozin, 5. Sitidin

Polar gömülü işlevsel gruplara sahip bir hidrofobik alkil zinciri ve bir uç kuinüklidinyum WAX alanları ihtiva eden karışık ligandlarla fonksiyonize edilmiş gözenekli silika boncuklar, oligonükleotidlerin ayrılmasında mükemmel performans gösteren RPLC/WAX sabit fazları olarak kullanıldı (Şekil 2.2.1 B) (A.Zimmermann ve ark. 2014).

Mobil faz olarak oligonükleotidlerin analizi için pH 7.0 (20/80, v/v) trietilamonyum fosfat tamponu ve pH 8.0 (20/80, v / v) trietilamonyum fosfat tamponu kullanıldı.

X.Li ve arkadaşları, çok fosforile peptitlerin zenginleştirilmesi için yeni bir n-oktadesiltriklorosilan ve 2- (4-klorosülfonil fenil) etil triklorosilan karışımı olan RPLC/SCX materyali açıkladılar (Şekil 2.2.1 C) (X.Li ve ark. 2012). Sonra, sabit fazdaki bağlı peptitler daha sonra artmış ACN konsantrasyonu ile uzaklaştırılabilir. Son olarak, yeni bir RPLC/WCX mixed-mod sabit faz polar-kopolimerizasyon yaklaşımı ile hazırlandı. Bu materyal, silika bazlı sabit fazdı ve n-oktadesil ve 3-karboksipropil grupları ihtiva eden karışık ligandlarla modifiye edildi (Şekil 2.2.1 D) (X.Li ve ark. 2012). Değerlendirilen bileşikler (peptidler), A (20 mM amonyum formatlı tampon, pH 3.0, 4.5, 6.5 ve 8.0) ve B (ACN) 'den oluşan mobil faz ile ayrılabilir.

Tablo 2.2.1. RPLC / IEC mixed-mode sabit faz materyallerin karakterizasyonu, mobil fazları ve analitleri

RPLC/IEC Türleri	Sabit Fazların Karışık Ligandları	Karakterizasyon	Mobil Fazlar	Analitler
RPLC/SAX	C18+kuarterner amonyum grupları	Element Analizi (EA)	MeOH/Su, ACN/Formik Asit çözeltisi, MeOH/Formik Asit çözeltisi	Aristoloktik Asitler, Alkil Benzenler
RPLC/WAX	N-(10-undesenoil)-3-aminoquinuklidin	EA	ACN/Trietilamonyum fosfat tamponu	Oligonükleitler
RPLC/SCX	C18+Sulfonilfenil	EA, ¹³ C CP/MAS NMR	ACN/Amonyumasetat Tamponu	Fosfopeptitler
RPLC/WCX	C18+3-karboksipropil	Karakterize Edilmez	ACN/Amonyumformat Tamponu	Peptitler
RPLC/SAX	C21+kuarterner amonyum grubu	Karakterize Edilmez	ACN/Fosfat Tamponu	Peptitler
RPLC/SAX	C21+kuarterner amonyum grubu	Karakterize Edilmez	ACN/Fosfat Tamponu Fosfat/Klorür/Perklorat Çözeltileri	Enkefalinler
RPLC/WAX	Poli(1-allilimidazol)	FTIR, EA, TGA, X-ray, Fotoelektron Spektroskopisi	MeOH/Su, Sodyum Klorür Çözeltisi	Anilinler, Alkil benzenler, inorganik anyonlar
RPLC/WAX	N-undesanoil-3aminoquinuklidin, N-(10-undesanoil)-3aminotropan, N,N-dimetil-N-10-undesanoil-1,2-Etandiamin, N-betanoil-(2S,4S,5R)-2-aminometil-5-[(2-oktiltio)etil]-quinuklidin	EA	ACN/Su, ACN/Amonyum Asetat Tamponu	Alkil Benzenler, Ksatinler, Nükleozitler, Vitaminler
RPLC/IEC	Scherzo SW-C18,SM-C18, ve SS-C18	Karakterize Edilmez	ACN/Amonyum Asetat Tamponu	Kısa RNA Olinükleotitleri

Şekil 2.2.1 E'de gösterildiği gibi, örnek olarak RPLC/WAX sabit faz kullanılarak, materyaller, amino fazlar veya tipik HILIC paketlemeleri (ZIC-HILIC, TSKGel Amide-80) gibi uygulanabilirlik profilleri ile bu ticari sabit fazları tamamlayıcı olarak kabul edilebilir yüklü çözünen maddeler için polar gömülü RP materyali ile karşılaştırma yapılmıştır.

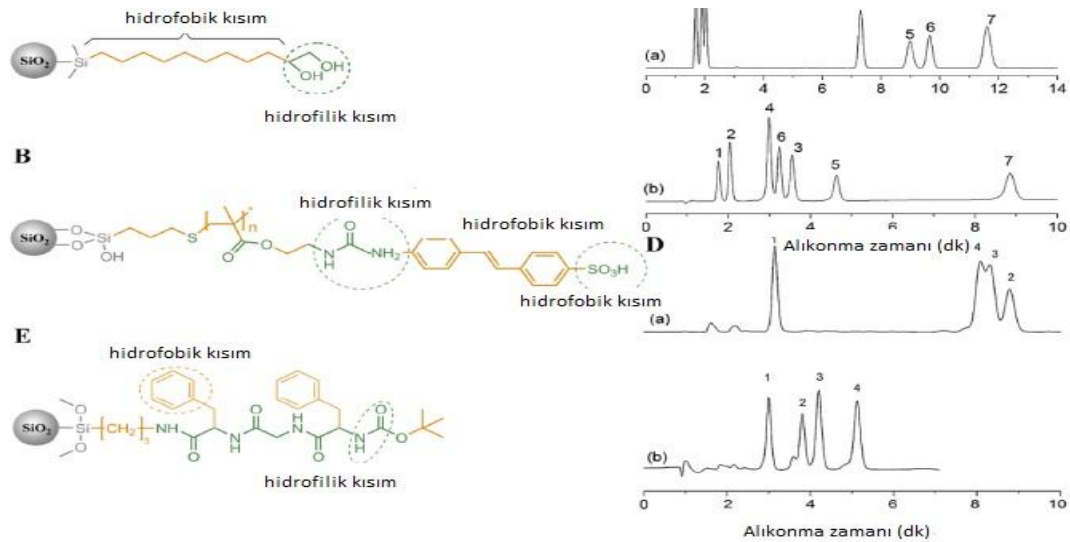
Dahası, RPLC/IEC sabit fazlı materyallerin hazırlanması için bazı ek yaklaşımlar vardır. RPLC sabit fazları uçucu iyon-çift reaktifleri, örn. trietilamin ve tetraalkilamonyum tuzları, asetat veya bikarbonat tuzları olarak RPLC/IEC karma mod prensibini elde edebilirler (R.Nogueira ve ark. 2005, H.Hinterwirth ve ark. 2010 A.Zimmermann ve ark.2014). Örneğin, Biba ve ark. iyi ayırıcı etkinlik gösteren RNA oligonükleotidlerini analiz etmek için üç tür mixed-mod sabit faz kullandı. Kullandıkları mixed-mod kolonları Scherzo SW-C18, Scherzo SMC18 ve Scherzo SS-C18'dir (M.Biba ve ark. 2013). Ayrıca, polistiren-divinilbenzen ve polivinilimidazol gibi karışık etkileşim bağlama bölgelerine sahip polimer esaslı paketleme malzemeleri, RPLC/IEC sabit fazları için başka bir malzeme türüdür (G.Jilge ve ark. 1993).

2.2.2. RPLC/HILIC Sabit Fazlar

RPLC, çoğunlukla apolar bileşiklerin ayrılması için kullanılır ve HILIC polar bileşiklerin ayrılması için bir avantaja sahiptir. Her iki kromatografi modu biyolojik numunelerdeki çevre kirleticileri ve doğal bitki özleri gibi karmaşık örneklerin analizinde bazı zorlukları karşılamaktadır. Karışık mod RPLC/HILIC hem hidrofobik hem hidrofilik bileşikleri ayırma özelliğine sahiptir (P.Jandera ve ark. 2010). Bazı bildirilen RPLC/HILIC sabit faz materyalleri, karakterizasyon yöntemleri, ilgili mobil fazlar ve ayırma analitleri Tablo 2.2.2'de listelenmiştir.

RPLC/HILIC sabit fazlı maddeler yaygın olarak hidrofobik yarıları (örneğin alkil zincirleri ve aromatik gruplar) ve hidrofilik grupları içeren karışık ligandları kullanarak tasarlanır. Hidrofilik kısımlar, iyonik gruplar (örneğin amino ve karboksil), zwitteriyonik gruplar (örneğin sülfalkilbetain, fosforilkolin ve aminofosfonat) ve nötr hidrofilik gruplar (örneğin hidroksil, siyano ve amid). Hidrofilik kısımlar aşağıdaki kategorilere gruplanabilir (Y.Li ve ark. 2014):

- ✓ İyonik Gruplar (Örneğin; Amino ve Karboksil)
- ✓ Zwitter İyonik Gruplar (Örneğin; Sülfalkilbetilen, Fosforilkolin ve Aminofosfonat)
- ✓ Nötr Hidrofilik Gruplar (Örneğin; Hidroksil, Siyano ve Amit)



Şekil 2.2.2 (A, B, E) RPLC / HILIC karışık mod sabit faz materyallerinin için üç tipik tür. (C) Tanaka test karışımının ayrılmasının karşılaştırılması: 1. Urasil, 2. Fenol, 3. Kafein, 4. Bütilbenzen, 5. O-ter fenil, 6. Amil benzen, 7. Trifenilen. (a): ODS kolonu ve (b): Sil-PAzO kolonu. (D): Dört steroid ayrımının (a):ODS kolonu ve (b): Sil-PAzO kolonu ile karşılaştırılması: 1. Estriol, 2. 17 α -estradiol, 3. 17 β -estradiol ve 4.estron

Hidrofobik alkil zinciri ve hidrofilik diol gruplarından oluşan klasik bir RPLC/HILIC sabit faz, Liu ve Pohl tarafından etoksillenmiş yüzey aktif maddelerin analizi için tasarlandı (Şekil 2.2.2 A) (X.Liu ve ark. 2008). Tasarım felsefesi, diol fazının silanol gruplarını kısa alkilhidroksi gruplarıyla değiştirerek bağlanmamış silisin (geleneksel HILIC kolonu) yakın bir taklidi olmasıydı. Mobil faz ACN ve 0.1 M amonyum asetat karışımıydı. İlginç bir şekilde, mobil fazda% 75'den az ACN bulunduğu zaman RPLC modu, mobil fazda %90'dan fazla ACN verildiğinde HILIC moduna geçti. Qiu ve ark. silika matrisinin sülfonikazobenzen ile modifiye edilmesi ile bir başka RPLC/HILIC sabit fazı sentezlendi (Şekil 2.2.2 B) (H.Qiu ve ark. 2013). HILIC modunda, yedi flavonoid ve ginsenosidler, nükleozidler ve bazıları içeren polar bileşikler, mobil faz olarak farklı orantı ve konsantrasyonda amonyum asetat ve ACN kullanılarak başarıyla ayrılmıştır. Dahası, RPLC modunda elde edilen RPLC/HILIC kolonları, Tanaka test karışımının ayrılması için geleneksel oktadesil silan (ODS) kolonuna ve metanol/su (%65/%35) mobil faz koşulunda dört steroid karışımı için bazı avantajlar gösterdi. Başka bir çalışmada kısa peptit Boc-Phe-Aib-Phe-OH mixed-mod RPLC/HILIC ayrımlarının yapılması için gözenekli silis üzerine sabitlendi (Şekil 2.2.2 C ve D) (S.Ray ve ark. 2012). Başka bir çalışmada kısa peptit Boc-Phe-Aib-Phe-OH karışık-mod RPLC/HILIC ayrımlarının yapılması için gözenekli silis üzerine

sabitlendi(Şekil 2.2.2 E) (S.Ray ve ark. 2012). Hidrofobik etkileşim modunda sekiz steroid karışımının ayrılması için çözücü olarak %30 CH₃OH ve dihidroksibenzen izomerleri çekirdek ve kükürt bazlı analitler hidrofilik etkileşim modunun değerlendirilmesi için eluotropik koşullar altında ayrılmıştır(10 mM Amonyum Asetat/ACN (% 10/90))

Tablo 2.2.2 RPLC/HILIC'in sabit fazlı materyallerin karışık ligandları, karakterizasyonu, mobil fazları ve analitleri

Sabit Fazların Karışık Ligandları	Karakterizasyon	Mobil Fazlar	Analitler
Sulfonik-Azobenzen	FTIR, EA, TGA	MeOH/Su, ACN/Su, ACN/Amonyum asetat tamponu	Alkil benzenler, Steroidler, Flavonoidler, Ginsenzitler, Bazlar ve nükeozitler
Alkil karbon+Glikol Terminüsü	EA, ¹³ C CP/MAS NMR	ACN/Amonyum asetat tamponu, ACN/Su	Alkil fenol türevleri, Etoksilenmiş alkoller,
Boc-Phe-Aib-Phe-OH	FTIR, EA, TGA, ¹³ C NMR	MeOH/Su, ACN/Amonyum asetat tamponu	Polietilen glikol, Steroidler, Nükleo-analitler, Dihidrobenzen izomeri, Sülfür temelli ilaç molekülleri
Alkil karbon+amido-aminofosfonat	EA	ACN/Asetik asit çözültisi, ACN/Amonyum asetat tamponu	Nükleozitler, Ksantinler, Alkil benzenler,
Humik Asit	FTIR, EA, TGA, Potansiyometrik titrasyonlar, Temas açısı ölçümleri	MeOH/Su, ACN/Su	Nükleozitler, Nükleobazlar,
poli-L-lisin	FTIR, TGA	ACN/Amonyum format tamponu	Anilinler, Fenoller,

2.2.3 HILIC/IEC Sabit Fazlar

Hidrofilik ve iyon değişim etkileşimlerinin kombinasyonu nedeniyle HILIC/IEC, proteinler ve peptidler gibi polar ve yüklü bileşiklerin analizi için özellikle uygundur (S.C.Burton ve ark. 2001, E.Y.Ordonez ve ark. 2012). Mixed-mod HILIC/IEC ayırma mekanizmaları genelde her iki yüklü grup, örn. amino, karboksil ve sülfalkil betain gibi anyonik, katyonik veya Zwitteriyonik gruplar ve hidrofilik gruplar. Bazı yayınlarda HILIC/IEC sabit faz materyalleri, karakterizasyon yöntemleri, ilgili mobil fazlar ve ayırma analitleri Tablo 2.2.3'te listelenmiştir.

1990'ların başında peptitlerin ayrılmasında mobil fazda yüksek ACN konsantrasyonlu IEC kolonlarında hidrofilik ayırma mekanizmasını ilk kez Hodges gözlemledi. Görüldüğü gibi, düşük ACN seviyelerinde iyonik değişim etkileşimleri ana ayırma mekanizmasıydı ve peptitler ile durağan fazlar arasındaki hidrofilik etkileşimler de yüksek ACN seviyelerinde oynandı. Bu mixed-modlu bir HILIC/IEC kolonunda, peptid ayrımları için RPLC ve IEC'ye rakip olabilir. Bundan sonra, karma modlu HILIC/IEC için daha fazla sayıda IEC kolonu geliştirildi (C.T.Mant, R.S.Hodges ve ark. 1998, 2004). 2008'de bir incelemeye göre, HILIC/IEC'in peptidlerin ve proteinlerin ayrılması ve analizi için geliştirilmesi ve uygulanmasını özetlendi (C.T.Mant, R.S.Hodges ve ark. 2008).

Son yıllarda, araştırmacılar HILIC ve IEC ayırma mekanizmalarını birleştirebilecek yeni malzemeler hazırlamaya başladılar. J.Lin ve arkadaşları, kılcal sıvı kromatografisini gerçekleştirmek için 2-(metakriloiloksi) etiltrimetilamonyum (META) ve pentaeritritol triakrilat'ın (PETA) kopolimerizasyonuna dayanan yeni bir katyonik değişim ve hidrofilik etkileşim monolitik sabit fazı sentezlendi (J.Lin ve ark. 2009). META hem iyon değiştirme alanları hem de hidrofilik ligand sağlayıcısı olarak işlev görürken, PETA çapraz bağlayıcı olarak tanıtıldı. HILIC/IEC için tıklama kimyası vasıtasıyla azid-silika üzerine propargilamin immobilizasyonu ile yeni bir silis esaslı amino sabit faz keşfedildi (Şekil 2.2.3 A) (Y.Liu ve ark. 2012). IEC'nin performansını değerlendirmek için, birkaç inorganik anyonun analizi için çözücü olarak 5 mM Na₂SO₄ + 0.5 mM H₂SO₄ kullanıldı. HILIC modunda, mobil fazdaki su içeriğini (ACN/H₂O) ve amonyum format derişimini değiştirmek suretiyle nükleozidlerin tutma davranışları araştırılmıştır. Daha sonra, glutatyon, Liang ve arkadaşlarının yaşamın bazı hayati maddesini ayırmak için yeni hidrofilik etkileşim/katyon-değişim mixed-mod kromatografik sabit faz elde etmek için tıklama kimyası ile silis yüzeyine kolaylıkla hareketsiz bırakıldı (Şekil 2.2.3 B) (A.Shen ve ark. 2013). Glutatyon modifiye kolonuna

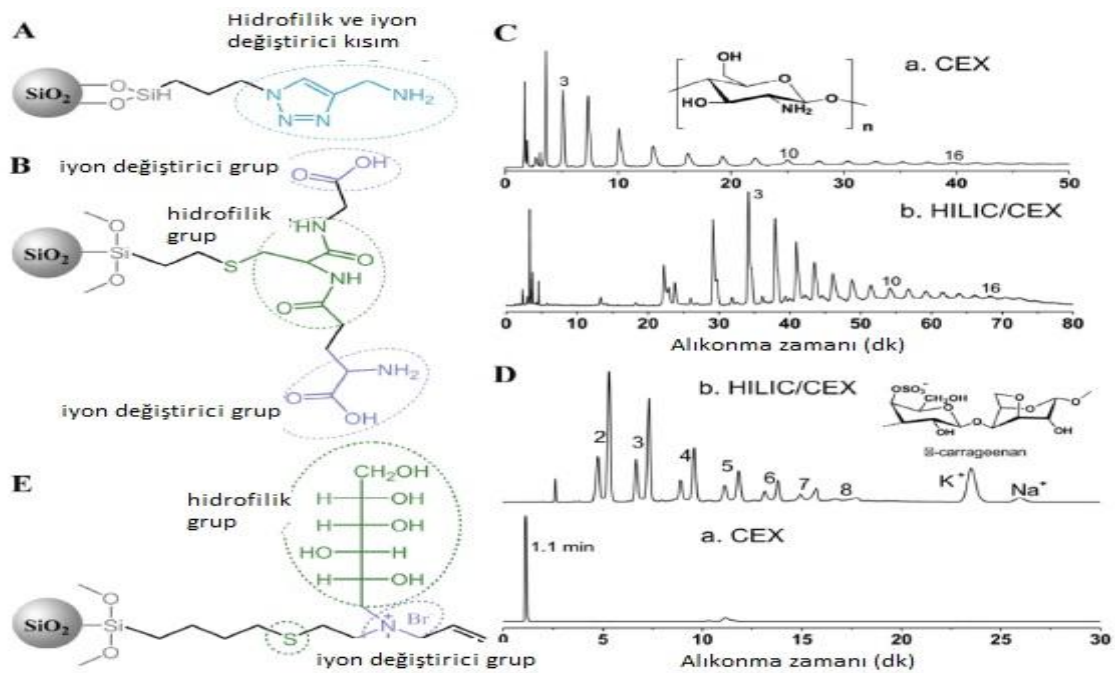
dayanarak, CEX modunda ve HILIC/CEX karışık modunda chitooligosakkaritlerin çözünürlüğü de gerçekleştirildi. Chitooligosakkaritlerin tutulması, mobil fazda organik çözücü eklenmesiyle, hidrofilik etkileşimin ortaya çıkmasıyla büyük ölçüde arttırılmıştır (Şekil 2.2.3 C). Hidrofilik etkileşimin, yani elektrostatik itme hidrofilik etkileşim kromatografisinin (ERLIC) kombinasyonu ile karragenan oligosakaritlerin ayrılması, iyi seçicilikle başarıyla elde edildi (Şekil 2.2.3 D).

Tablo 2.2.3 RPLC / IEC sabit fazlı materyallerin karma ligandları, karakterizasyonu, mobil fazları ve analitleri

Sabit Fazların Karışık Ligandları	Karakterizasyon	Mobil Faz	Analitler
Glutasyon	EA, ¹³ C CP/MAS NMR	ACN/Amonyum format tamponu, ACN/NaH ₂ PO ₄ çözeltisi, ACN/NaClO ₄ çözeltisi	Sakkaritler, Peptitler,
Polisülfoetil aspartamid	Karakterize Edilmez	ACN/Trifloroasetat(TFA) çözeltisi, ACN/Fosfat tamponu	Peptitler,
Polisülfoetil aspartamid	Karakterize Edilmez	ACN/TFA çözeltisi, Tetraetilamonyum perklorat(TEAP) çözeltisi/NaClO ₄ çözeltisi	Peptitler,
Poli(2-sulfoetil aspartamid)	Karakterize Edilmez	ACN/TFA çözeltisi, ACN/TEAP çözeltisi ve NaClO ₄ çözeltisi	α-sarmal peptitler
Poli(META-co-PETA)	SEM	ACN/Amonyum format tamponu	Amidler, Fenoller, Yüklü çözünen maddeler
Proparglamin	FTIR, EA	5 mM Na ₂ SO ₄ /0.5 mM H ₂ SO ₄ , ACN/Amonyum format tamponu	İnorganik anyonlar, Nükleozitler,
Glukaminyum bazlı iyonik sıvılar	FRIR, EA	ACN/Amonyum Format tamponu	Nükleozitler, Flavonoidler

Sonuç olarak, hidrofilik etkileşimin uygulanması, IEC'ye yüklü ve hidrofilik grupların karışımının analizi için bazı avantajlar sağlamıştır. Son zamanlarda, bir glukaminyum-bazlı iyonik sıvı N,Ndiallil-metil-D-glukaminyum bromür sentezlendi ve daha sonra

"tiyol-ene" tıklama kimyası yoluyla 3-merkaptopropil modifiye silika yüzeylerinin yüzeyine bağlandı (Şekil 2.2.3 E) (L.Qiao ve ark. 2014). Elde edilen sabit fazın ayırma mekanizması, farklı kromatografik faktörlerin farklı tipteki çözünenlerin tutulmasına etkisi incelenerek değerlendirildi. Mobil fazdaki tuz yoğunluğunun artmasıyla bazik bileşiklerin alıkonma süresi arttırıldı, ancak asidik bileşiklerin tutunması açık bir şekilde azaldı. İkinci faktör için, basit ve zayıf temel çözeltiler, mobil fazdaki su içeriği arttıığında, alıkonmada sürekli bir azalma görüldü. Mobil faz pH'sı için, tutma süresi, pH değeri düşükten yükseğe değiştirildiğinde artmıştır.

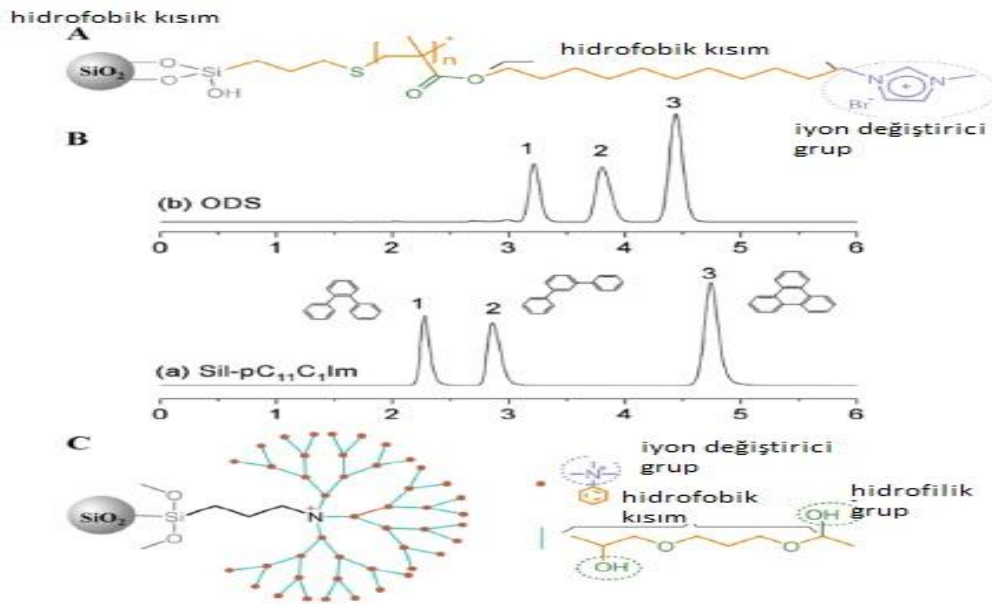


Şekil 2.2.3 Mixed-Mode sabit faz malzemeleri; (A) HILIC/WAX, (B) HILIC/anyon ve katyon değişimi ve (E) HILIC/SAX. (C) chitooligosakkaritler ve (D) karragen oligosakkaritlerinin CEX modunda ve HILIC / CEX modunda glutasyon modifiye kolon üzerinde ayrılması

2.2.4 RPLC/HILIC/IEC Sabit Fazlar

Son yıllarda, MHPLC'nin araştırılması ve uygulanması hızla artıyor. İki modlu MHPLC'nin yanı sıra üç modlu veya çok modlu MHPLC de tek bir kolonun daha yüksek ayırma özelliklerini sağlamak için geliştirildi. RPLC/HILIC/IEC, hidrofobik, hidrofilik ve anyon-değişim etkileşimleri olmak üzere üç çeşit etkileşimden oluşan bir kombinasyona sahiptir. Yeni tutma mekanizması amacıyla iyonik sıvılar, karmaşık MHPLC sabit fazlarının sentezi için yeni bir materyal olarak ortaya çıkmıştır (H.Qiu ve ark. 2011). Bazı bildirilen RPLC/HILIC/IEC sabit faz materyalleri, karakterizasyon yöntemleri, ilgili mobil fazlar ve ayırma analitleri Tablo 2.2.4'te listelenmiştir.

2012'de Ihara ve ark. anyonlar, hidrofobik bileşikler ve küçük polar moleküllerin sırasıyla RPLC/HILIC/IEC ayrımı için bir poli-graftlı silika sabit fazı hazırladı (H.Qiu ve ark. 2012). Ayırma malzemelerinde, bu üç modlu malzeme, hidrofobik alkil zinciri, ester ve polar imidazolyum gruplarını ayırma kaynakları olarak içermektedir (Şekil 2.2.4 A). RPLC modunda, imidazol veya piridin grupları olan tri-mod kolonu, mobil faz olarak metanolü kullanarak konumsal izomerlere karşı yüksek bir moleküler düzlemsel seçiciliği indükleyebilir (Şekil 2.2.4 B). HILIC modunda, nükleozitler ve bazları, 20 mM amonyum asetat: ACN (5/95,) eluent olarak ayrıldığı görüldü. IEC modunda inorganik anyonlar, mobil faz olarak 20mM Na₂SO₄ (pH 3.3) sulu solüsyonu kullanılarak iyi pik şekilleri ve yüksek verim ile ayrılmıştır.



Şekil 2.2.4 (A,C) 2 tip RPLC/HILIC/IEC sabit fazları için materyaller. (B) O-terfenil, m-terfenil ve trifenilenin ayrılması ve (a) SilpC11C1Im, (b) ODS kolonu.

Dendritik materyallerin gelişmesiyle birlikte, 2014'te Y.Li ve ark. çok modlu RPLC/HILIC/IEC ayrımı için yeni bir dendritik polimer modifiye silika sabit faz hazırladı (Şekil 2.2.4 C) (Y.Li ve ark. 2014). Malzeme, hidrofobik amin ve hidroksil grupları, hidrofobik alkil zincirleri ve fenil halkası ve yüklü kuarterner amonyum grupları olarak 3 bölümden oluştu. Özetle, bir mixed-modlu kolon, iki veya daha fazla tek modlu kolonun yerini alması için kullanılabilir; bu da, malzemelerin atık ve aşırı tüketilmesini önler.

Tablo 2.2.4 RPLC/HILIC/IEC sabit fazlı materyallerin karma ligandları, karakterizasyonu, mobil fazları ve analitleri

Sabit Fazların Ligandları	Karışık	Karakterizasyon	Mobil Faz	Analitler
poli(1-vinil-3-octadesilimidazolyum bromid)		FTIR, EA, TGA, ¹³ C CP/MAS NMR	Heksan/2-propanol MeOH, MeOH/Su	Alkil benzenler, Steroidler, Ter-fenil izomerleri,
poli(1-(2-akrililoksijundesil)-3-metilimidazolyum Bromid)		FTIR, EA, TGA	20 mM Na ₂ SO ₄ , ACN/Amonyum asetat tamponu	İnorganik anyonları, Ter-fenil izomerleri, Bazlar ve nükleozitler
Dentritik polimer		FT-IR, EA	ACN/Su, ACN/Fosfat tamponu, ACN/Amonyum format tamponu	Alkil benzenler, Yüklü çözünen maddeler, Nüklebazlar

2.2.5. Diğer MHPLC Sabit Fazlar

Daha önce de belirtilen bu mixed-modlara ek olarak, araştırmacılar tarafından başka yeni MHPLC türleri de araştırılmıştır. Tablo 2.2.5'te MHPLC sabit fazlı materyallerin diğer türleri ve karakterizasyon yöntemleri ile ilgili mobil fazlar ve ayırma analitleri özetlenmiştir. MHPLC'de yeni bir malzeme olarak mixed-modlu monolitler ortaya çıkmıştır (C.T.Mant ve ark. 2008, X.Lin ve ark. 2013). Geleneksel paketlenmiş kolonlara kıyasla, monolitik silika kolonları, hızlı kütle transferi, uç fritlerin yokluğu ve paketlenmiş kolonlarda bulunan uçtaki fritlerin varlığı nedeniyle bazı çalışma problemlerinin önemli derecede azaltılması gibi pek çok gelişme sunmaktadır (T.Hara ve ark. 2006). Jia ve arkadaşları mixed-mod monolitleri konusunda güzel çalışmalar yapmışlardır. 2011'de Jia ve ark. mixed-modlu kılcal HPLC için bir N-metil imidazolyum işlevselleştirilmiş monolitik silika kolonu hazırlandı. Karışık mod monolitinin ayrılmış mekanizmaları, anyon değiştirme, hidrofilik, π - π , dipol-dipol ve hidrofobik etkileşimleri içerir (P.Zhang ve ark. 2011). 2014 yılında aynı grup hidrotermal bir yaklaşımla bir hibrid karbon/silika monolitik kılcal HPLC kolonu hazırlandı. Yeni durağan faz, hidrofobik, hidrofilik, elektrostatik ve π - π etkileşimlerine dayalı bileşikleri ayırma yeteneğine sahiptir (P.Yang ve ark. 2014). Zhao'nun grubu,

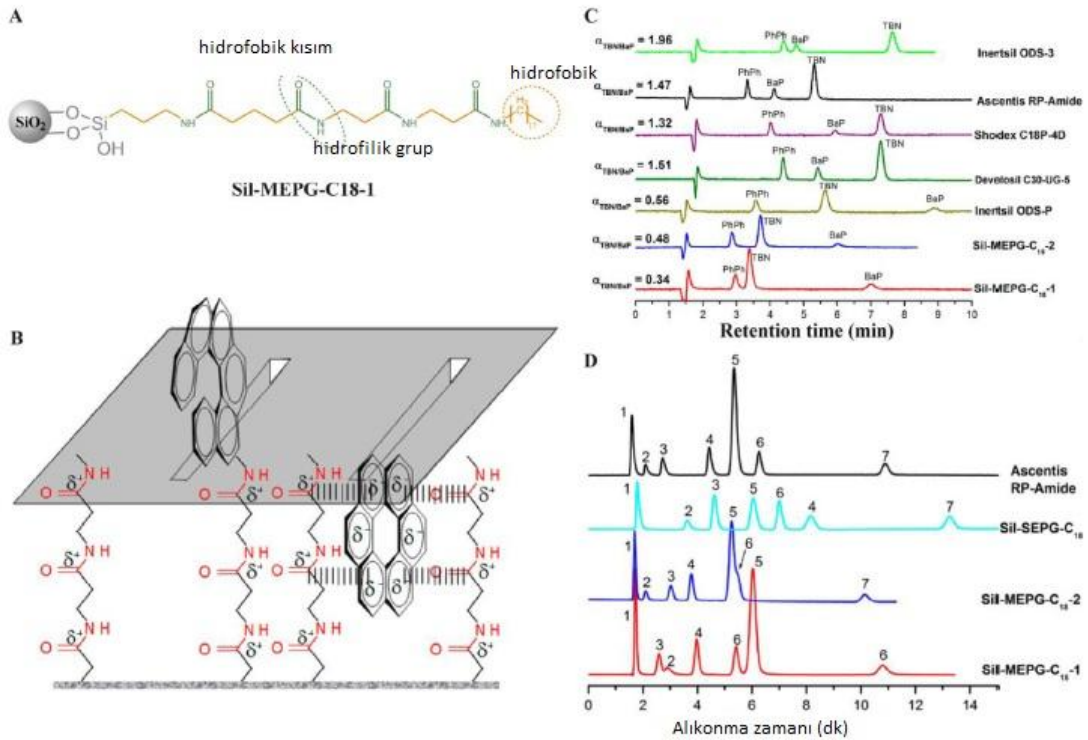
hidrofobik, hidrojen bağlayıcı (HB), boyut katıştırma, π - π ve anyon değişim etkileşimleri içeren çok amaçlı ayrılmış mekanizmalara sahip bir tetraazakaliks[2]aren[2]triazin esaslı mixed-mod sabitini sentezledi (W.Zhao ve ark. 2012).

Tablo 2.2.5. MHPLC sabit fazlı materyallerin karma ligandları, karakterizasyonu, mobil fazları ve analitleri

Diğer MHPLC Sabit Fazları	Karakterizasyon	Mobil Faz	Analitler
IEC/ π - π /hidrojen-bağlayıcı (HB)	Karakterize Edilmez	ACN/Amonyum format tamponu	PAH ve fenoller, Estrojenler, Aromatik aminler, Nükleobazlar
RPLC/HILIC/IEC/ π - π /HB/dipol-dipol	SEM	ACN/Na ₂ HPO ₄ çözeltisi, MeOH-Su, 20 mM Na ₂ HPO ₄ çözeltisi	İnorganik anyonlar, Alkil benzenler, Aromatik Asitler, Nükleotidler, PAH ve fenoller
RPLC/HILIC/IEC/ π - π	SEM, EDS, FTIR, ISEC	ACN/Su, ACN/Amonyum asetat tamponu,	Alkil benzenler, Nükleozit ve bazlar, Aromatik Asitler
RPLC/IEC/ π - π /HB/kapsama	FTIR, EA, TGA	MeOH/su, 25 mM KCl çözeltisi	Aminler, Fenoller, İnorganik anyonlar,
RPLC/HILIC/IEC/ π - π /HB/şekil seçiciliği	FTIR, EA, TGA, NMR, DSC	MeOH, ACN/Amonyum asetat tamponu, MeOH/Fosfat tamponu	Alkil benzenler, Nükleik asit bazları ve nükleozitler, İzomerler

2015 yılında Ihara Grubu, şekil seçiciliği (S.S), hidrofobik ve hidrofilik seçicilik, HB ve iyon değiştirme kapasitesi gibi daha süslü performansa sahip çok modlu sabit bir faz malzemesi hazırladı (A.K.Mallik ve ark. 2015). Şekil 2.2.5 A'da gösterildiği gibi, hidrofobik kısım C18 alkil zinciri ile, hidrofilik kısım ise amid işlevsel grubu ile sunulmuştur. Kolon, şekil kısıtlı izomerlerin ve polar, polar olmayan ve bazik bileşiklerin ayrılması için kullanılabilir. Sınırlandırılmış izomerleri şekillendirmek için mekanizma, sütunun sadece yarı benzeri bir yapı oluşturması değil aynı zamanda çoklu karbonil- π etkileşimlerini kolaylaştırarak çok yüksek şekil seçiciliğine yol

açmasıdır (Şekil 2.2.5 B). Şekil 2.2.5 C, en yaygın olarak kullanılan RP ticari kolonlarla Sil-MEPG-C18-1, Sil-MEPGC18-2 üzerinde SRM869b'nin ayrılması için karşılaştırmalı kromatogramı göstermektedir. Şekil 2.2.5 D'de gösterildiği gibi, tasarlanan kolonlar, tekli EPG C18 (Sil-SEPG-C18 ve Ascentis RP amide) fazlarına kıyasla, kromatografik şartlar altında (45/55, 65/35 ve 75/25, metanol/20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.00) polar olmayan, polar ve bazik bileşiklerin (urasil, propanolol, bütül paraben, dipropil ftalat, naftalen, amitriptilin ve asenaften) bir test karışımı ile çok iyi bir zirve asimetrisi gösterdi.



Şekli 2.2.5. (A) RPLC/HILIC/ IEC şekil seçimli mixed-mod sabit faz ligandının kimyasal yapısı. (B) Karbonil- π etkileşimleri yoluyla düzlemsel/düzlemsel olmayan çözünür maddelerin seçiciliğini açıklayan Yuva modeli. (C) SRM869b'nin 35°C'de Sil-MEPG-C18-1, Sil-MEPG-C18-2 ve en yaygın olarak kullanılan RP ticari kolonlarında ayrılması için kromatogramlar. (D) Sil-MEPG-C18-1, Sil-MEPG-C18-2, Sil-SEPG-C18 ve EPG C18 safhaları üzerinde sırasıyla urasil, propranolol, butilparaben, dipropil ftalat, naftalen, amitriptilin ve asenaften ayrılması için kromatogramlar.

2.3. MHPLC Malzemelerinin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu

2.3.1. MHPLC Malzemelerinin Hazırlanması

MHPLC materyallerin hazırlanması fiziksel ve kimyasal yöntemlere ayrılabilir. Genel olarak, mixed- modlu kromatografik ayırma, iki veya daha fazla HPLC kolon modunun fiziksel olarak tandem kombinasyonu ile doğrudan elde edilebilir. Örneğin Brown ve ark. otomatik anahtarlama valfleri ile RPLC ve IEC tandem kolonları

geliştirdi (A.Halfpenny ve ark. 1986). Aynı zamanda, Horvath ve ark. sabit faz yüzeyleri sırasıyla -COOH, -SO₃H, -NH₂ ve -N (CH₃)₃ grupları ile kaplı olan dört IEC sütununu birleştirerek bir tandem kromatografik sistem tasarladı (Z.El Rassi ve ark. 1986). Bu tandem sistemi aynı anda WCX, SCX, WAX ve SAX ayırım mekanizmalarını sağlayabilir. "Mixed-mod kromatografisi" terimine daha yakın olmak için, iki sabit fazlı malzeme bir kolonun farklı bölümüne sırayla doldurulur ve bu tür bir kolon genellikle "iki fazlı kolon" olarak adlandırılır. 2000'li yıllarda Wolters'in grubu birkaç SCX ve RPLC kombine bifazik kolonlar hazırladı (A.J.Link ve ark. 1999, D.A.Wolters ve ark. 2001). Bundan sonra aynı grup, iki fazlı bir kolonun bir ucuna 3.0 cm RPLC malzemesi ekleyerek bir trifazik kolon hazırladı. Üçüncü fiziksel yaklaşım, "karma kolon" veya "karışık yataklı kolon" olarak adlandırılan iki veya daha fazla hareketsiz faz materyalini bir kolona karıştırmaktır. 1995'te Walshe ve ark. önce böyle bir melez kolonu, C18 ve sülfonatla modifiye edilmiş silika sabit fazının karışımıyla doldurarak hazırladı (M.Walshe ve ark. 1995). Motoyama ve çalışma arkadaşları, anyon ve katyon değişim reçinelerini bir sütunda, peptid ve fosfopeptitlerin ayrılması için harmanladılar (A.Motoyama ve ark. 2007).

2.3.1.1. Tıklama Kimyası

Tıklama kimyası, yüksek seçicilik ve verimlilik nedeniyle yeni bir sentetik yöntem olarak ortaya çıkmıştır. "Tıklama kimyası" (Click Chemistry) terimi ilk önce 2001'de Sharpless tarafından ortaya atıldı (H.C.Kolb ve ark. 2001) ve Fréchet'in grubu ilk olarak 2006'da HPLC sabit fazlarının hazırlanmasına uyguladı (M.Slater ve ark. 2006). Bundan sonra tıklama kimyası, MHPLC sabit fazlı materyallerin hazırlanması için kullanılmaya başlandı. 2008'de Guo ve ark. organik azid ve terminal alkin arasındaki Huisgen [3+2] dipolar sikloadizasyonu (tıklama kimyası denilen) yoluyla bir β-siklodekstrin (β-CD) konjüge silika sabit fazı hazırladı (Z.Guo ve ark. 2008). Bu sabit faz, RPLC/HILIC mixed-mod tutma davranışlarını gösterdi. B-CD'nin hidrofilik dış yüzleri, HILIC tutunmasına katkıda bulunmuştur ve boşluğun hidrofobik iç yüzeyi, RPLC modu tutulumu için hidrofobik etkileşim bölgeleri temin etmektedir. Tıklama kimyasının başka bir türü olan "tiol-ene" tıklama reaksiyonu, ilk olarak Liang'ın grubu tarafından zwitterionik sabit fazlı materyallerin hazırlanması için kullanıldı. Bu sabit faz, oligosakaritlerin, peptitlerin ve bazik bileşiklerin HILIC ayrılmasında başarıyla kullanıldı (A.Shen ve ark. 2011). Daha sonra, tekrar "tiol-ene" tıklama reaksiyonu ile bir

glutasyon bazlı HILIC/SEC sabit faz materyali hazırlandı ve standart peptitlerin ve fruktosanların ayrılması için etkili bir teknik olduğu kanıtlandı (A.Shen ve ark. 2013).

2.3.1.2. Yüzeyde başlayan Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu

Çoğu durumda, kromatografik sabit fazlar, ligandların silika ya da polimer parçacıkları üzerine kovalent olarak bağlanmasıyla serbest radikal polimerizasyon reaksiyonlarının kullanılmasını içeren yüzey türetme yöntemleri ile hazırlanabilir. Böylece SI-ATRP, kontrol edilebilir aşı yoğunluğu ve zincir uzunluğu ile yeni bir sentetik yöntem olarak ortaya çıkmıştır. SIEC-ATRP, ilk kez 2006 yılında Tuncel ve arkadaşları tarafından bir IEC sabit faz malzemesi hazırlamak için kullanıldı (M.Tuncel ve ark. 2006). Aynı yıl, Jiang'ın grubu, peptitlerin ayrılması için SI-ATRP reaksiyonu ile bir zwitteriyonik sabit faz sentezledi. Bundan kısa bir süre sonra, Carr'ın grubu SI-ATRP reaksiyonu ile katyon değişimli ve ters fazlı tutma mekanizmalarına sahip bir MHPLC sabit fazlı materyal sentezledi. Ters fazlı kısım C8 alkil zinciriydi ve katyon değişim kısmı sülfonik asit gruplarından oluşuyordu (H.Luo ve ark. 2008). 2011 yılında Wei ve arkadaşları silika boncukların yüzeyine aşılana viniltetrazol polimer ile SI-ATRP reaksiyonu ile bir HILIC/WCX sabit faz materyali hazırladılar (J.Hao ve ark. 2011).

2.3.1.3. Diğer Metodlar

Genellikle MHPLC sabit fazlarının hazırlanması için başka klasik reaksiyonlar da kullanılır. Amino ve karboksi grubu arasındaki yoğunlaşma reaksiyonu, analitik bilimde kullanılan tipik bir reaksiyondur. Örneğin, disikloheksilkarbodiimid/1-hidroksibenzotriazol (DCC/HOBt), Ihara'nın grubu tarafından, peptid bazlı silika RPLC/HILIC sabit fazının sentezi için kondensasyon ajanı olarak seçilmiştir (S.Ray ve ark. 2012). Bazı MHPLC sabit fazlar, katalizör olarak Paladyum(Pd) kullanılarak hidrosililasyon reaksiyonu ile hazırlandı. Örneğin Liu ve ark. 1,2-epoksi-9-decen dimetiletoksisilan ile platin katalizör varlığında birleştirmek için reaksiyonu kullandı (X.Liu ve ark. 2008).

2.3.2. MHPLC Materyallerinin Karakterizasyonu

2.3.2.1. Fizikokimyasal Özelliklerin Karakterizasyonu

Fizikokimyasal karakterizasyon MHPLC sabit fazlı materyallerin başarılı sentezini sağlamak için önemli bir adımdır. Genellikle, elemental analizler (EA), Fourier transform infrared spektrometri (FT-IR), termogravimetrik analiz (TGA), katı hal nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR) ve benzeri dahil en sık kullanılan karakterizasyon yöntemleridir. EA, C, H, N, O ve S gibi elementlerin yüzdesini belirleyebilir ve durağan fazların yüzey kapsamı, element yüzdesine göre denklemler kullanılarak hesaplanabilir (H.Qiu ve ark. 2013). FT-IR, sabit fazlı malzemelerin kimyasal bileşimlerini hassas bir şekilde tanımlamak için kullanılacak başka bir araçtır. TGA sabit fazların termal kararlılığını belirlemek ve destekler üzerinde hareketsizleştirilmiş bileşiklerin miktarını teyit etmek için yaygın olarak kullanılır (S.Ray ve ark. 2012, W.Zhao ve ark. 2012). TGA eğrilerinde gözlenen kütle kaybı derecesi, destek yüzeylerine tutturulmuş organik grupların kaybı ile ilişkilendirilir ve bazı sıcaklık aralığında, genellikle 30-800°C'de tespit edilebilir. Özellikle, katı hal NMR, sabitlendirilmiş mixed-ligandların fonksiyonel grupları hakkında bilgi kazanmanın en güçlü araçlarından biridir.

2.3.2.2. Kromatografik Tutunma Mekanizmasının Karakterizasyonu

MHPLC'nin tutma mekanizması, MHPLC sabit fazındaki çeşitli çözünen maddelerin kromatografik davranışı ile karakterize edilebilir. RPLC/IEC sabit fazlar açısından hidrofobik (steroidler, arenler, alkilbenzenler ve flavonoidler ve diğerleri) ve yüklü bileşikler (anilinler, amino asitler, nükleobazlar ve diğer organik asitler ve benzerleri) karışık RPLC/IEC'nin tutma mekanizmasını değerlendirmek için seçilir. Örneğin, yukarıda tarif edilen RPLC/SAX sabit fazındaki hidrofobik tutma davranışı, toluen ve etilbenzen'den oluşan bir test probu ile değerlendirildi ve iyon değiştirme etkisi, piridin, benzoik asit ve aristolokhik asitlerin test problemleri ile karakterize edildi (Y.Liu ve ark. 2012). Test problemlerinin tutma davranışı, kolon üzerindeki RPLC ve IEC'nin karma modlarının ayırma verimi üzerinde egemen olduğunu gösterdi. RPLC/HILIC sabit fazlarının karma tutma mekanizmasını ispatlamak için, hidrofobik (steroidler, arenler, alkilbenzenler ve flavonoidler gibi) ve polar bileşikler (peptidler, nükleozitler, vitaminler, aminoasitler, sakkaritler gibi), karışık RPLC/HILIC tutma

mekanizmasını araştırmak için seçilir. Karışık sabit fazda hidrofilitik tutma davranışlarını araştırmak için Ginsenosidler, nükleozitler ve bazları kullanıldı (H.Qiu ve ark. 2013). Bu etkili sonuçlar, sabit fazın hem RPLC hem de HILIC tutma mekanizmasına sahip olduğunu gösterdi. HILIC/IEC ve diğer MHPLC sabit fazlar açısından, yukarıda da değinildiği gibi polar ve yüklü bileşiklerin tutma davranışları, HILIC/IEC mixed-mod sabit faz için değerlendirme standardı olarak seçilmiştir. L.Qiao ve ark. Örneğin, tuz konsantrasyonu, mobil fazdaki su içeriği ve hareketli faz pH'sı gibi bazı kromatografik faktörler tarafından etkilenen bazik ve asidik bileşiklerin (nkleozbazlar, nükleozidler ve sübstitüe benzoik asitler) tutma davranışı, glukaminyum bazlı iyonik sıvı sabit fazın bir HILIC/IEC mixed-mod tutulma mekanizması sundu (L.Qiao ve ark. 2014). Diğer karmaşık mixed-mod sabit fazların tutma mekanizması, çeşitli standart bileşiklerin tutulma davranışı ile karakterize edilmiştir.

H. Aral ve arkadaşları son yıllarda çeşitli mixed-mode sabit fazlar geliştirmiş olup etkinliklerini incelemişlerdir (H.Aral ve ark. 2013, T.Aral ve ark. 2015, H.Aral ve ark. 2016). Geliştirilen  dolgu maddesi de HILIC/RP mixed-mode özelliği göstermiş olup çeşitli polar, orta polar ve apolar bileşiklerin ayrılmasında başarı ile kullanılmıştır. Ancak, arzu edildiği gibi, çok yüksek polariteden çok yüksek apolariteye kadar çok geniş bir yelpazede ayırma yapabilen bir dolgu maddesini henüz rapor edilmediği belirtilmektedir (H. Aral ve ark. 2017). Bu nedenle, mixed-mod özelliği taşıyan yeni dolgu maddelerin geliştirilmesi yoğun ihtiyaç olduğu gibi, bu alanda yapılacak yeni çalışmalar mixed-mod ayırma mekanizmasının daha iyi anlaşışmasına hizmet edecektir.

Bu nedenle, bu çalışmada, yakın zamanda H. Aral ve çalışma arkadaşları (H. Aral ve ark 2017) tarafından senzitenlenen Ile-PBA-Mix isimli mixed-mod özellikteki dolgu maddesinin HILIC ve RPLC uygulamalarının yapılması, dolgu maddesinin çeşitli analit gruplarına olan ilgisi ve ayırma mekanizmasının anlaşılması amaçlanmaktadır.

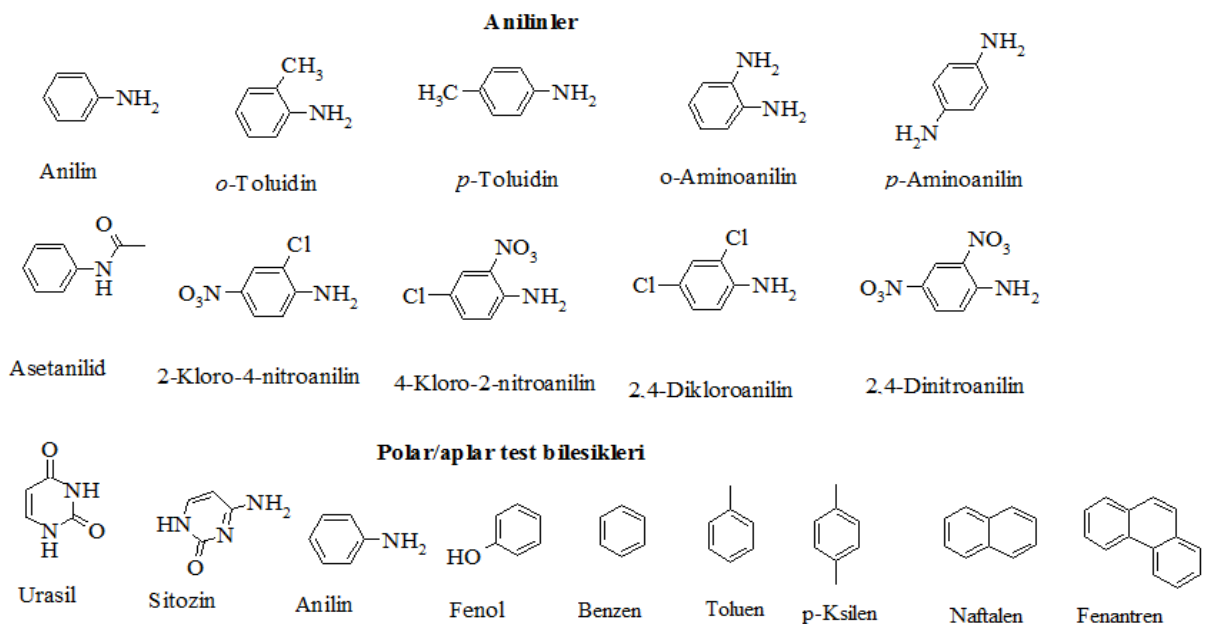
3. MATERYAL VE YÖNTEM

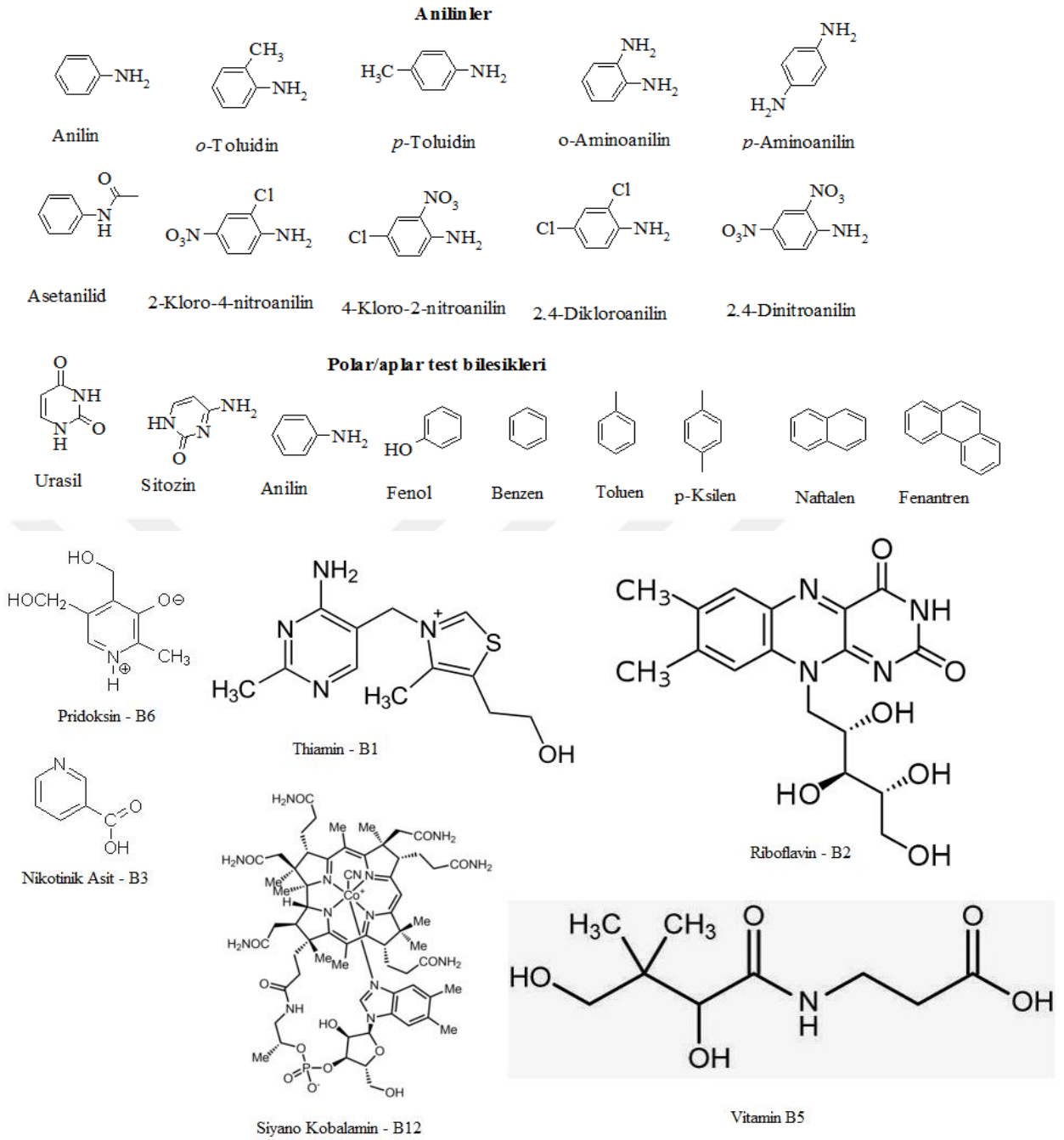
3.1. Materyaller

HPLC’de kullanılan çözücüler “HPLC grade” olup Merck firmasından satın alındı. Ayırma için seçilen tüm analit (Şekil 3.2) ve reaktifler Sigma-Aldrich veya Merck firmalarından temin edilmiştir. Boş HPLC kolonları paslanmaz çelik olup Kalite Sistem Merieux Nutrisciences (Istanbul, Turkey) firmasından ücretsiz temin edilmiştir. Sentezde kullanılan tüm reaktifler “reagent grade” olup başka herhangi bir saflaştırma tekniğine tabi tutulmamıştır..

3.2. Yöntem

Kromatografi çalışmaları için Agilent 1260 HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) sistemi kullanıldı. Analitlerin standart çözeltileri (1 mg mL^{-1}) asetonitril ve suda hazırlandı. Tüm çözeltiler su veya asetonitril ile seyreltilerek, vitamin B5 hariç her bir analit çözelti karışımında 100 ppm olacak şekilde ölçüm örneği hazırlanırken, vitamin B5’in çalışıldığı dalga boylarında absorbanı çok düşük olduğu için örnek karışımında 500 ppm olacak şekilde karışım hazırlandı ve $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de muhafaza edildi. Tampon çözeltiler ahzırlanırken LC-MS uyumlu tampon olmasına önem verildi. Bu nedenle tuz tüm tamponlarda amonyum tuzları kullanıldı. Amonyum format tamponu pH 3-4 aralığı için, amonyum asetat pH 4-6 aralığı için, amonyum fosfat pH 6-8 aralığı için ve amonyum klorür pH 8-8.50 aralığı için kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH’ları gerektiğinde % 2.5 amonyak veya 1M ilgili asit ile dengeye getirildi. Burada bahsedilmeyen diğer kromatografik şartlar diğer bölümlerde detaylı olarak verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm analitler ve yapıları Şekil 3.2’de verilmiştir.





B Vitaminleri

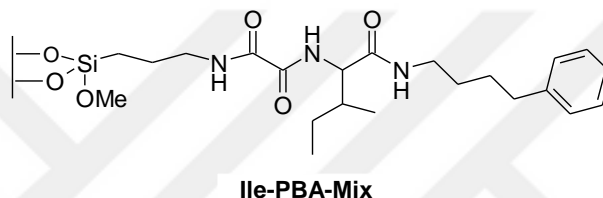
Şekil 3.2. Ayırmada kullanılan analitler

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan dolgu maddesi Doç. DR. Tarık ARAL tarafından yürütülen BAP projesi kapsamında sentezlenmiştir. Ile-PBA-Mix olarak adlandırılan dolgu maddesi polar grup olarak üç amid grubu ve apolar gruplar olarak da bütül iki

bütil grubu ve bir fenil halkası içerir (Şekil 4.1). Böylece sabit fazın hem güçlü polar etkileşim hem de güçlü alifatik ve aromatik apolar etkileşim ile geniş bir sakalada analit gruplarının ayrılması hedeflenmektedir.

Dolgu maddesinin performansını ölçmek için yükek polariteli ve bazik özellik taşıyan nükleotid-nükleozit karışımı ve asidik özellik taşıyan B grubu vitaminler HILIC şartlarında çalışıldı. Ters faz şartları için ise orta polarlıktaki anilinler ve fenoller tercih dildi. Anilinler zayıf bazik, fenoller de zayıf asidik bileşiklerdir. Ayrıca RPLC-HILIC karışım moda ayırma uygulaması da çalışıldı. Bunun için de yüksek, orta ve düşük polariteli çeşitli analit karışımları kullanıldı ve gradient yürütücü faz ile karışık mod sağlandı.



Şekil 4.1. Çalışmalarda kullanılan Ile-PBA-Mix sabit fazın yapısı

4.1. Kromatografik Parametreler

Ile-PBA-Mix ile ayrılan analitler için alıkonma faktörü(k'), teorik tabaka sayısı(N) ve pik asimetisi(As)'ni içine alan kromatografik datalar Tablo 4.1'te verilmiştir.

Alıkonma faktörü (k') dolgu maddesi üzerinde bir analitin hareket etme hızını açıklamak için kullanılır. Bir analitin alıkonma faktörü 1'den küçük olduğunda, elüsyon o kadar hızlıdır ki alıkonma süresinin doğru olarak belirlenmesi çok zordur. Alıkonma faktörünün 20'den daha büyük olması elüsyonun çok uzun sürdüğü anlamına gelir. İdeal olarak, bir analit için alıkonma faktörü 1 ile 10 arasında olmalıdır. Bununla beraber, Kromatograficilere göre bunun 0.5 ile 20 arasında olması da mümkündür (L.R.Synder ve ark. 2007). Tablo 4.1'de görüldüğü gibi, **Ile-PBA-Mix** ile ayrılan bütün analitler için alıkonma faktörleri vanilik asit hariç 0.7 ile 5 arasında belirlendi. Bu analiz sürelerinin ideal olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Yeni Ile-PBA-Mix kolon ile ayrılan bütün analit grupları için kromatografik parametreler

Analitler	k'	N	Af
Nucleotidler/nucleosidler			
1	1.07	3466	1.50
2	1.34	3194	1.67

3	2.20	3044	1.89
4	2.61	n.d	1.78
5	2.96	n.d	n.d
6	2.96	n.d.	n.d.
7	3.63	3861	1.85
<i>Polar/non-polar test bileşikleri</i>			
1	0.77	-	1.98
2	1.59	-	1.67
3	2.03	-	1.44
4	2.37	-	1.62
5	3.34	-	n.d.
6	3.34	-	n.d.
7	n.d.	-	n.d.
8	4.14	-	1.75
9	4.82	-	1.71
<i>Anilinler</i>			
1	0.93	3865	1.08
2	1.11	3209	1.05
3	1.25	2959	1.31
4	1.48	n.d.	n.d.
5	1.59	n.d.	n.d.
6	1.80	4143	1.20
7	2.30	1441	1.43
8	2.58	1105	1.46
9	3.47	1175	1.24
10	5.15	2149	1.13
<i>Fenoller</i>			
1	0.26	-	3.00
2	0.74	-	1.55
3	1.30	-	1.30
4	1,87	-	1.35
5	2.76	-	1.33
6	3.42	-	1.42
7	3.79	-	1.43
8	4.95	-	1.50

Kromatografik Koşullar: 250 x 4.6 mm I.D. kolon yeni Ile-PBA-Mix dolgu maddesi ile dolduruldu. Diğer bütün koşullar optimumkoşullarla aynı. k' , alıkonma faktörü; N , teorik tabaka sayısı; A_s , pik asimetri faktörü. N.d, belirlenmedi.

Yeni bir kolon için kabul edilebilir A_s değeri 1-1.5 aralığındadır. Pratikte 1.5'in altındaki A_s değeri genellikle çalışmak için uygundur, ancak 2.0'a kadar olan değer de kabul edilebilir değerdir (L.R.Synder ve ark. 2007). Tablo 4.1'de görüldüğü gibi A_f değerleri 1-2 arasında değişmektedir. Genel olarak, en iyi A_s değerleri anilinler ile elde edildi (1.05-1.46). Ancak en yüksek A_s değerleri nükleotid/nükleozidler (1.50-1.85) ile

elde edildi. Genel bir değerlendirme yapacak olursak, nükleotid/nükleozidler gibi yüksek bazik ve vanilik asit gibi yüksek asidik bileşikler yüksek kuyruklanma göstermiştir. Bu muhtemelen silika yüzeyinde kalan silanol gruplarının etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu etkiye silanol aktivitesi denilmektedir. Element analizi sonucu II-PBA-Mix için % 4.5 karbon oranını göstermektedir. Bu oranın düşük olduğu görülmektedir. Daha yüksek miktarda ligand bağlanarak silanol aktivitesi düşürülebilir.

Geleneksel olarak, teorik tabaka sayıları nükleotid/nükleozidler için 3000-4000/m, anilinler için 1000-4000 olarak hesaplandı. Bu değerlerin kabul edilebilir aralıktadır. Fenoller ve diğer test bileşiklerin ayrılması gradient şartta gerçekleştiği için teorik tabaka sayısı hesaplanmadı. Çünkü teorik tabaka sayısı gradient şartlar için anlamlı ve faydalı bir bilgi vermez. Bunun yerine pik kapasitesi (Pc) daha kullanışlı bir parametredir. Pc aşağıdaki formülle hesaplanabilir.

$$Pc = 1 + tg / (1/n)Wa ,$$

n hesaplama için seçilecek piklerin sayısını,

tg gradient analiz süresini,

Wa ise ortalama pik genişliğini ifade eder (U.D.Nuue 2005).

Diğer hesaplamalar;

Ayrım gücü(Rs):

$$Rs = 1/4 \sqrt{N} \cdot (\alpha - 1/\alpha) \cdot (k' / 1 + k')$$

α : seçicilik

$$\alpha = k_2 / k_1$$

k_1 =ilk bileşene ait alıkonma zamanı

k_2 =ikinci bileşene ait alıkonma zamanı

k' =kapasite faktörü

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

N=teorik tabaka sayısı

Teorik tabaka sayısı(N):

$$N=5,54.(t_r/W_{1/2})^2$$

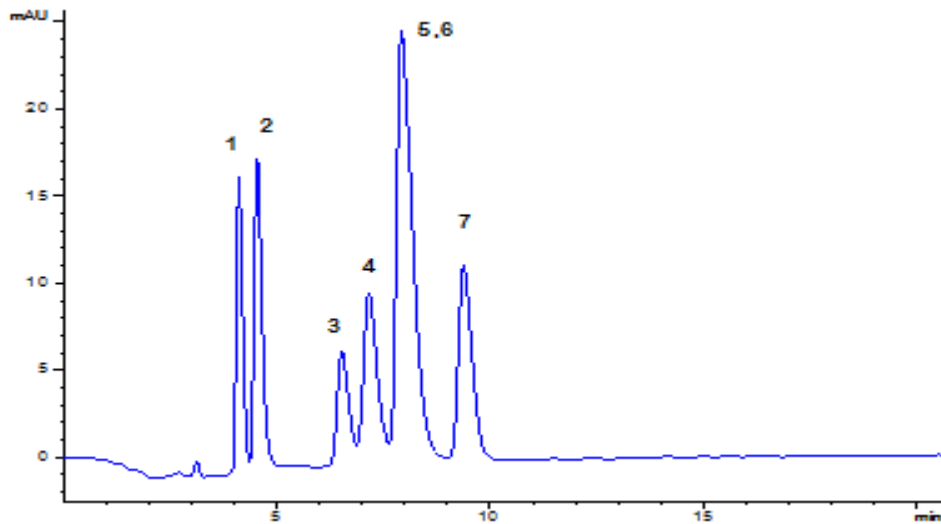
t_r =Alıkonma zamanı

$W_{1/2}$ =1/2 yükseklikteki pik genişliği

4.2. HILIC Modda Nükleotid ve Nükleozidlerin Ayrılması

Nükleotid ve nükleozidler bağıl olarak güçlü polariteye sahiptirler. Bu yüzden, Yüksek polariteye sahip bu analitlerin RPLC kolonlar ile etkili bir şekilde ayrılması RPLC kolon ile zayıf etkileşiminden dolayı zordur. Bununla birlikte, bu analitlerin HILIC kolonlar ile ayrılması kolay bir şekilde başarılmaktadır. Bundan dolayı, Nükleotidler/Nükleozidler sentezlenen Ile-PBA-Mix ve Ile-AA-Mix dolgu maddelerinin ayırma mekanizmasını belirlemek için kullanıldı. Ile-PBA-Mix kolonu ile yedi tane nükleotid/nükleozid(uracil, uridine, adenine, adenosine, guanine, cytosine ve cytidine) karışımının ayrılması yapılmıştır. Altı tane nükleotid/nükleozid karışımı Ile-PBA-Mix kolonu ile izokratik elüsyon şartlarında akış hızı 1 mL/dk'da ACN/amonyum asetat tamponu (20 mM, pH of 5.71): 82/18 mobil faz oranında 10 dakikada ayrılmışken 7 analit de 22 dakikada ayrılmıştır (Şekil 4.2).

Nükleotid/nükleozid karışımının ayrılmasıyla ilgili makalelere baktığımızda, bu analitleri ekili ayıran kolonlar genellikle 5-9 analiti 8-15 dakikada ayırmıştır (K.Hu ve ark., H.Aral ve ark. 2016, T.Aral ve ark. 2015, D.Kotani ve ark. 2012, S.Liu ve ark. 2015, X.D.Cheng ve ark. 2013, T.Liang ve ark. 2015, S.Bocian ve ark. 2012, L.Qiao ve ark. 2013, H.Liu ve ark. 2017). Bununla beraber, bu analitlerden 5 tanesini 25 dakikada(P.R.Brown ve ark. 1998), 8 tanesini 25-35 dakika arasında (Q.Wang ve ark. 2016, Y.Zhang ve ark. 2016), 9 tanesini 40 dakikada (Q.Wang ve ark. 2015) ayıran birçok çalışma bulunmaktadır. Daha önce çalışılan HILIC ve mixed-mod kolonlarla Ile-PBA-Mix kıyaslandığında, yeni multifonksiyonlu Ile-PBA-Mix kolonunun oldukça polar ve bazik olan nükleotid/nükleozidlerin ayrılmasında en etkili kolonlardan biri olduğu açıktır.



Şekil 4.2. Ile-PBA-Mix Kolonu ile yedi tane nükleotid/nükleozid karışımının ayrılması Hareketli faz: ACN / 20 mM, pH 5.71 amonyum asetat tamponu: 82 / 18. Akış hızı: 1 mL/dk Sıcaklık: 50 °C. Enjeksiyon hacmi: 1 µL. Analitler: 1, urasil; 2, uridin; 3, adenin; 4, adenosine; 5, guanin; 6, sitozin; 7, sitidin.

4.2.1. Hareketli Faz İçeriğinin Etkisi

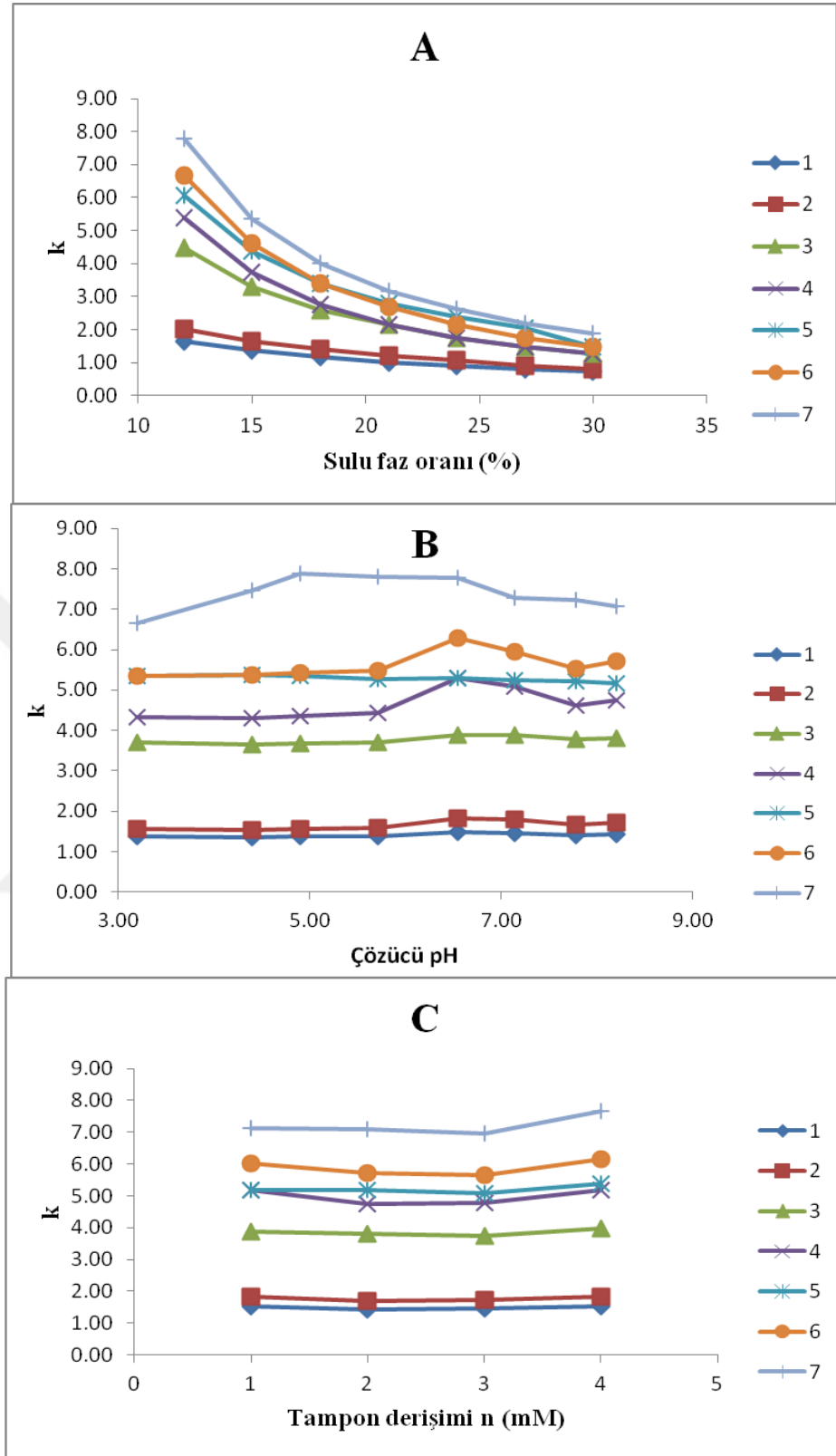
Ile-PBA-Mix kolonun HILIC özelliklerini incelemek için 7 tane nükleotid/nükleozid karışımı test bileşiği olarak seçilmiştir. Amonyum klorür tamponu (20 mM, pH 8.20) içeren sulu fazın oranı 20 °C’de % 12’den %20’ye değiştirildi ve 7 tane analit 22 dakika içerisinde %12 sulu faz oranında ayrıldı. Şekil 4.2.2.A nükleotid/nükleozid karışımının hareketli fazdaki çeşitli sulu tampon oranıyla alıkonma süresi değişimlerini göstermektedir. Bütün test bileşiklerinin alıkonması hareketli fazdaki sulu faz içeriğinde bir artış olduğunda azalma eğilimi göstermiştir ki bu tipik bir HILIC kolon davranışıdır.

Analitlerin Ile-PBA-Mix kolon üzerinde elüsyon sırasını göz önüne alırsak, sitidin, adenosin ve üridin (bunlar yüksek polarlıktaki şeker ünitesine bağlıdır) kendi şeker ünitesine bağlı olmayan formları sitozin, adenin ve urasilden daha iyi alıkonulmuştur ki bu tipik bir HILIC özelliğidir. İlginç bir nokta sitozinin hareketli fazın tampon içeriği % 21 ya da daha fazla olduğunda guaninden daha az kolonda alıkonurken, tampon içeriği % 15 ya da daha az olduğunda guaninden daha fazla kolonda alıkonmasıdır. Yani, sitozin tampon içeriği artışından guaninden daha fazla etkilenmektedir (pH=8.20). Analitlerin amin grubu ile dolgu maddesinin amid grubu arasındaki temel etkileşim hidrojen bağı olduğu için tampon (pH 8.20) içeriğinin artması guaninin sitozinden daha çok protonlanmasına yol açabilir. Böylece, sitozin

tampon (pH 8.20) içeriğinin artmasıyla dolgu maddesi ile daha az etkileşir. Sonuç olarak, Ile-PBA-Mix kolonu ile nükleotid/nükleozid karışımının ayrılma mekanizmasında sadece analitlerin polaritesi değil ayrıca asitlik-bazlıkları da diğer önemli faktördür.

4.2.2. Tampon pH'ı ve Konsantrasyonunun Etkisi

Tampon pH'sının ve konsantrasyonun etkisi sabit ACN/20 mM amonyum klorür tamponu (88:12), 0.8 mL/dk ve 50 °C şartları kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.2.2.B'de görüldüğü gibi, nükleotid/nükleozid karışımının alıkonması guanin hariç hareketli fazın pH'sıyla hafifçe etkilenmektedir. Genel olarak, tampon pH'nın düşmesiyle guanin daha çok alıkonurken, sitozin daha az alıkonmaktadır. Böylece, guanin ve sitozin pikleri pH 5.71 olduktan sonra iç içe girmektedir. Bununla beraber, sitidin hariç, bütün analitlerin alıkonması pH 7.78 ile 6.55 arasında artmış ve pH 6.55 'in altında azalmıştır. pH 4.90'a kadar düşürülerek sitidin kolonda daha fazla alıkonulmuştur. pH 4.90'ın altında sitidinin alıkonması keskin bir şekilde düşüş göstermektedir. Böylece, sitozin ve guanin için en iyi selektivitenin sağlandığı pH 6.55, adenzin ve guanin için pH 3.20 olarak belirlendi. 7 analitin hepsi göz önüne alındığında, en iyi ayırma pH 8.20'de gözlemlendi. İlâveten, 6 analitin en iyi ayrılma koşullarını belirlemek için diğer pH değerleri de çalışıldı. 6 analit pH 5.71, 1 mL/dk akış hızı, ACN/Tampon: 82/18 hareketli faz oranında 50 °C şartlarında 10 dakika içerisinde ayrıldı.



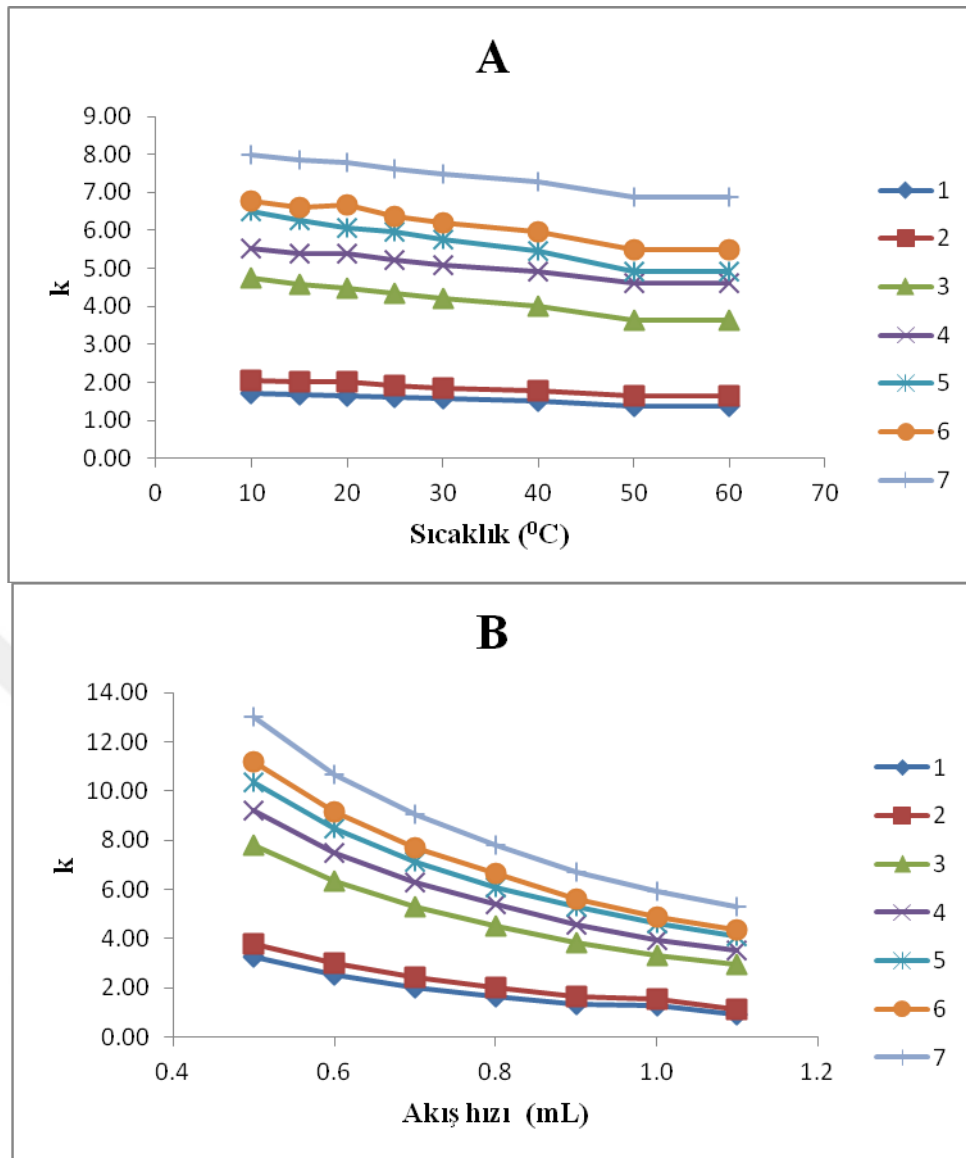
Şekil 4.2.2 Yeni Ile-PBA-Mix kolonu ile nükleotid/nükleozid karışımının ayrılmasında hareketli faz içeriği(A), Tampon pH'ı(B) ve Tampon Konsantrasyonu(C) 'nun etkisi Analitler: 1, urasil; 2, uridin; 3, adenin; 4, adenosin; 5, guanin; 6, sitozin; 7, sitidin.

Hareketli fazdaki tampon konsantrasyonunun etkisi farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30 and 40 mM) amonyum klorür tamponu kullanılarak çalışıldı. En iyi ayırma 20 mM tampon konsantrasyonunda gözlemlendi (Şekil 4.2.2.C). Bununla birlikte, guanin ve sitozin 20 ve 30 mM tampon konsantrasyonunda baseline ayrılma göstermezken, 10 ve 40 mM tampon konsantrasyonunda baseline ayrılma göstermiştir. Aksine, adenozin ve guanozin pikleri 10, 30 ve 40 tampon konsantrasyonunda iç içe girmiştir. Bu yüzden, en iyi tampon konsantrasyonu 20 mM olarak seçildi.

4.2.3. Sıcaklık Ve Akış Hızının Etkisi

HILIC ayırmalarında sıcaklık önemli bir parametredir. Yaygın olarak kabul edilen görüşe göre, hareketli faz yüksek sıcaklıklarda daha hidrofobik olmakta, HILIC’da analitlerin alıkonmasını arttırmaktadır. Bununla beraber, sıcaklığın artması sonucu alıkonmanın hem arttığı ve hem de azaldığı yönünde literatürde belirlenmiştir (www.sielc.com). Bu yüzden, nükleotid/nükleozid karışımının ayrılması ve alıkonmasında sıcaklığın etkisi izokratik elüsyon kullanılarak diğer optimum koşullar altında kolon sıcaklığı 10°C’den 40°C’ye değiştirilerek incelendi (Şekil 4.2.3.A). Bütün analitlerin alıkonma süreleri sıcaklığın artmasıyla azaldı. Bununla birlikte, bütün analitler sıcaklık değişiminden eşit oranda etkilenmedi. Guanin ve sitozin pikleri 10 ve 15°C’de birbirine çok yakınken, baseline ayırma 60 °C’de gözlenmiştir. Öte yandan, adenozin ve guanin 10 ve 15 °C’de baseline ayrılma göstermiştir. Sıcaklığın artmasıyla adenin ve guanin arasındaki selektivite artarken, sitozin ve guanin arasındaki selektivite azalmaktadır. Böylece, 7 analit için en iyi sıcaklık şartı 50 °C olarak seçildi.

Akış hızının etkisi 25 °C ‘de ve diğer optimum şartlarda akış hızı 0.5’ten 1.1 mL/dk.’ya değiştirilerek çalışıldı. Şekil 4.2.3.B’de görüldüğü gibi, bütün analitlerin alıkonma zamanları paralel olarak azaldı ve selektivite akış hızının artmasından etkilenmedi. Bütün akış hızlarında, 6 tane analit için baseline ayırmalar gözlemlendi.

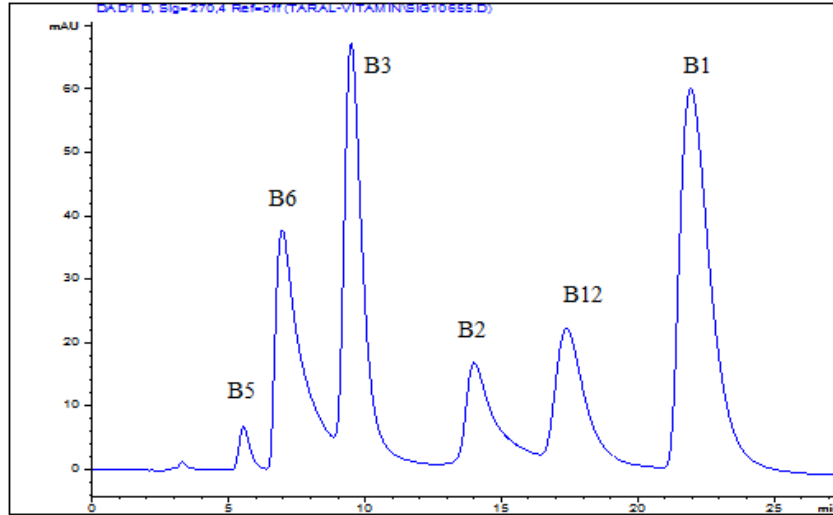


Şekil 4.2.3. Ile-PBA-Mix Kolon ile Nükleotid/Nükleozid Karışımının Ayrılmasında Sıcaklık (A) ve Akış Hızının(B) Etkisi. Analitler: 1, urasil; 2, uridin; 3, adenin; 4, adenozin; 5, guanin; 6, sitozin; 7, sitidin.

4.3. B Vitaminlerinin HILIC ayrılması

B Vitaminleri hidrofilik karakterde ve suda çözünen bileşiklerdir. Bundan dolayı ters faz koşullarındansa HILIC koşullarında alıkonurlar. Yapısal karmaşıklığı ve çeşitli kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, kromatografik ayırım ve HILIC şartları altındaki davranışlarının çalışmaları zorludur.

Yeni mixed-model HPLC kolonu, 6 suda çözünen B vitaminlerinin ayırımı için kullanıldı. Bütün deneysel koşulların optimizasyonundan sonra, 6 tane B vitaminlerinin 30 dakikada ayırımı yapılmıştır (Şekil 4.3.1).



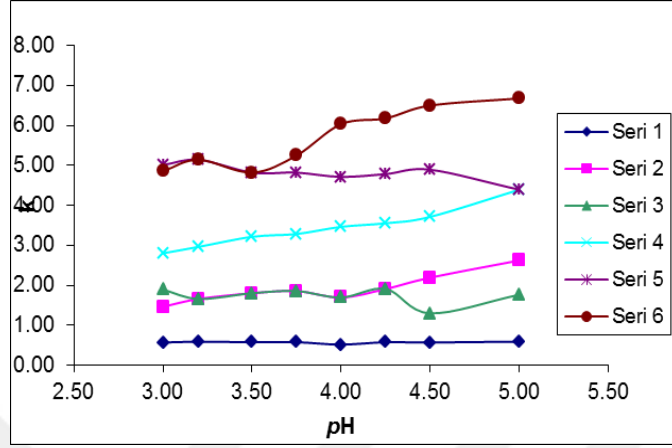
Şekil 4.3.1 Ile-PBA-Mix durgun fazı ile B Vitaminlerinin ayrımı: Şartlar ; % Amonyum asetat (20 Mm pH 4.50) ACN: Gradient; 0-25 dk, 15-60% Akış: 1 ml/dk, Sıcaklık: 25 °C Analitler: B5, B6, B3, B2, B12, B1

Ile-PBA-Mix kolonu ile B vitaminlerin ayrılmasına çeşitli deneysel şartların etkisi çalışıldı. İlk olarak pH etkisi çalışıldı. Yapılan ön deneme testlerinde, pH 5'in üzerinde çoğu B vitaminin bozunduğunu ve sağlıklı kromatogramlar elde edilmediği gözlenmiştir. Bu nedenle pH optimizasyonları pH 3-5 aralığında yapılmıştır.

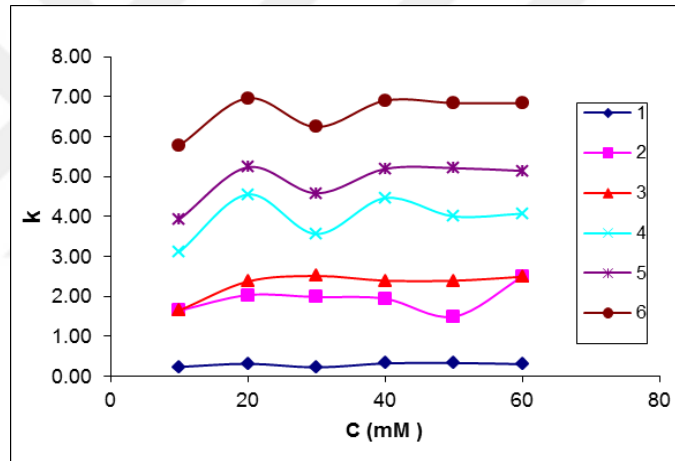
Şekil 4.3.2'de gözüktüğü üzere, B5 haricindeki tüm vitaminler pH değişiminden oldukça etkilenmiştir. B1 ve B2 amin fonksiyonel grupları içerdiği için bazir özellik taşımaktadır. Bu nedenle pH arttıkça kolonda daha çok alıkonması da artmaktadır. Bu beklenen bir sonuçtur. B12 vitamininin alıkonma zamanı pH 3.00-4.50 aralığında kaydadeğer oranda arasında değişmemektedir. Ancak pH 5.0'da az da olsa alıkonma süresi düşmektedir. Böylece pH 5.0'da B2 ile B12 içiçe geçmiştir. Vitamin B6 (pridioksin) ile B3 vitamini pH 3.0-4.25 arasında aynı alıkonma zamanına sahip oldukları için ayrılmamaktadır. Ancak pH 4.5'den itibaren ayrılabilir oldukları görülüyor. B3 asidik, B6 da piridin azotu içerdiği için bazik özelliğe sahiptir. pH2nın artması ile B6'nın analiz süresi artarken, B3'ün analiz süresi düşmektedir. Tüm analitler göz önünde tutulduğunda, en iyi ayrılmanın pH 4.5 olduğu görülmektedir.

Bununla birlikte, tampon çözeltisi konsantrasyonu değişiminin B3 vitamini dışında diğer B vitaminlerinin ayrımı üzerinde etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.3.3). Ancak B2 ile B3 vitaminleri 10, 20 ve 60 mM derişimlerde bu iki analit ayrılmazken 30, 40 ve 50 mM derişimlerde ayrılmakta ve en iyi ayrılma 50 mM ile gözlenmektedir. Bu nedenle optimum tampon derişimi 50 mM olarak seçilmiştir.

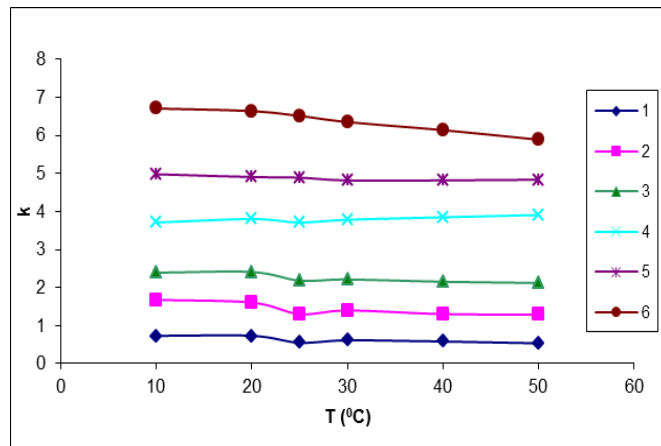
Ayrıca, 10-60 °C arasında yapılan farklı ölçümlerde sıcaklığın selektiviteye ciddi etkisi olmadığı görülmektedir. Sıcaklık arttıkça tüm analitlerin analiz süresi aynı paralellikte azalmaktadır. Analiz süresi ve ayırma kapasiteleri gözönünde bulundurularak optimum sıcaklık 25 °C olarak seçilmiştir (Şekil 4.3.4).



Şekil 4.3.2 Vitaminlerin ayırma faktörüne pH etkisi; 1, B5; 2, B6; 3, B3; 4, B2; 5, B12; 6, B1



Şekil 4.3.3 Vitaminlerin ayırma faktörüne tampon çözelti konsantrasyonunun etkisi; 1, B5; 2, B6; 3, B3; 4, B2; 5, B12; 6, B1

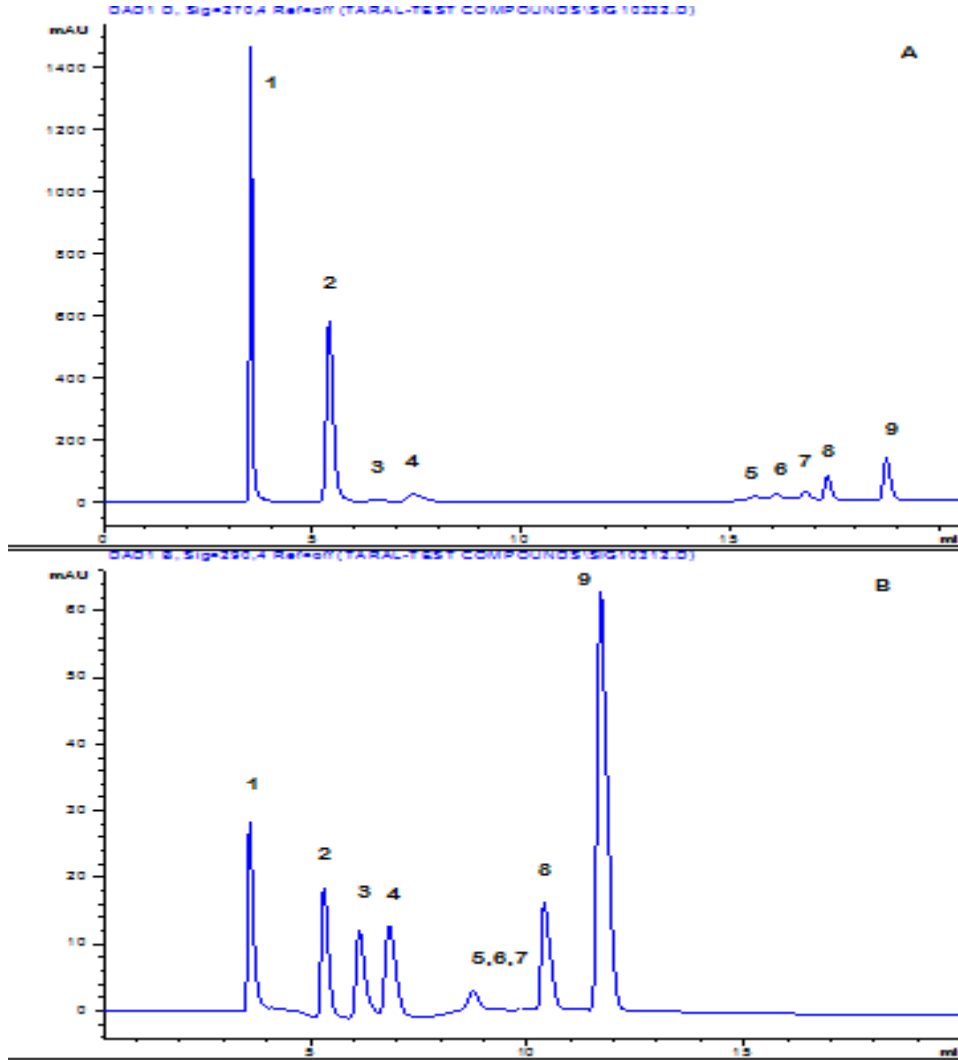


Şekil 4.3.4. Vitaminlerin ayırma faktörüne sıcaklık etkisi; 1, B5; 2, B6; 3, B3; 4, B2; 5, B12; 6, B1

4.4. Ters Faz Modda Ayırma

4.4.1. Polar/nonpolar test bileşiklerinin Ayrılması

RPLC, apolar, zayıf polar ve kısmen polar bileşiklerin ayrımı için kullanılan en sık kullanılan HPLC modudur. Bununla birlikte, yüksek polariteye sahip bileşiklerde RPLC kolonları ile ayırım zordur, HILIC kolonlar ile ayırım daha kolaydır. RPLC/HILIC mixed-mode kolonlar, apolar, zayıf, kısmen ve yüksek polar bileşiklerin eşzamanlı ayrımları için kullanılmaktadır.



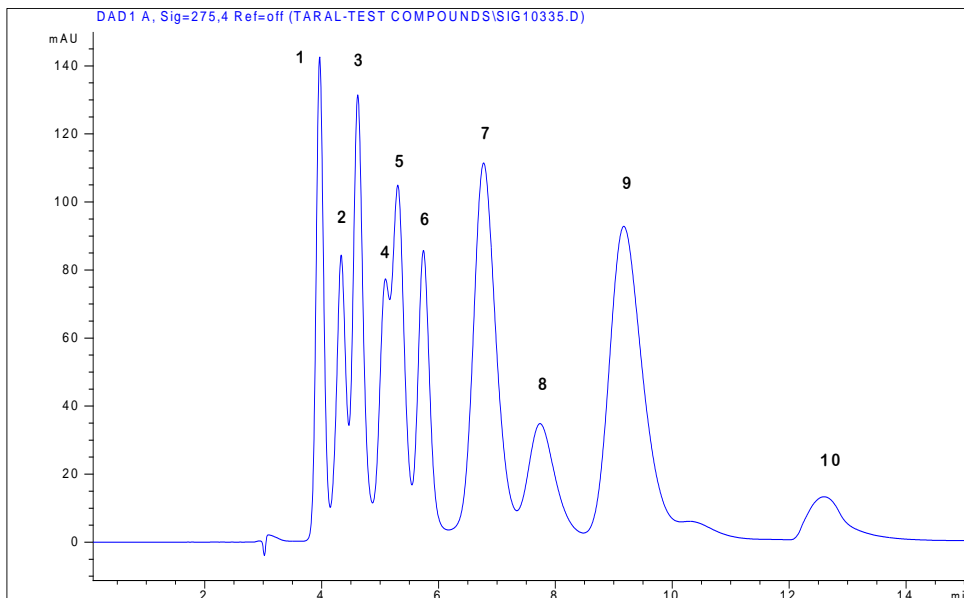
Şekil 4.4.1. A için; 9 polar/apolar aromatik test bileşiklerinin Ile-PBA-Mix durgun faz ile ayrılması; Mobil Faz, ACN:Su; 0-8 dk; 5-10%, 8-20 dk; 10-95%, B için; 0-8 dk; 5-25%, 8-20 dk; 25-85% lineer gradient elüsyon. Akış hızı: 1 ml/dk. Enjeksiyon hacmi: (A) için 20 μ L ve (B) 5 μ L. Sıcaklık : (A) için 40 $^{\circ}$ C ve (B) için 30 $^{\circ}$ C. Dalgaboyu : 270 ve 290 nm. Analitler: 1, Urasil; 2 Sitozin; 3, Anilin; 4, Fenol; 5, Benzen; 6, Toluen; 7, o-ksilen; 8, Naftalin; 9, fenantren.

Polar ve nonpolar analit karışımlarının ayrılma etkinliğini test etmek için; asidik, bazik ve nötr bileşenlerden oluşan dokuz analit Ile-PBA-Mix kolon ile ayırım yapıldı. 9

analitin optimum ayrılma şartlarda ayrılması için yapılan çeşitli gradient ve isokratik elüsyon programları testlerinden sonra, en iyi ayrılma tamponsuz su ve asetonitril mobil fazı, 40 °C kolon sıcaklığında ve 1 ml/dk akış hızı olduğu belirlenmiştir. Tek kromatografik çalışmada 9 analit 19 dakikada (Şekil 4.4.1.A), 7 analit ise 12 dakikada ayrılabilir. Asidik, bazik ve nötr (yüksek polar, kısmen polar ve apolar) bileşiklerin tek bir kolon kullanılarak yapılan tek bir çalışma ile eşzamanlı ayırma için çok cazip olmasına karşı numunenin gittikçe daha da komplike olmasından dolayı zordur.

Şekil 4.4.1.B'den görüldüğü üzere, analitlerin ayrılma sırası RPLC kolonlarının tipik davranışlarını göstermektedir. Suca zengin mobil fazda, apolar bileşikler, benzen, toluene, ksilen, naftalin ve phenanthrene, kuvvetlice tutunurlarken yüksek polar bileşikler, Urasil ve Sitozin, daha az kuvvetli tutunmaktadır. Mobil fazdaki ACN oranı yükseltildikçe, Ile-PBA-Mix kolonda yüksek polariteye sahip bileşiklerin tutunmaları gitgide kuvvetlenmektedir ve apolar bileşiklerin tutunmaları gitgide güçsüzleşmektedir (veri gösterilmemektedir). Böylece, RPLC/HILIC mixed-mod ayrılması tek bir kolon ve çalışma ile başarılmaktadır.

4.4.2. Anilinlerin Ayrılması



Şekil 4.4.2. Anilinlerin yeni Ile-PBA-Mix durgun fazı ile ayrılması; Mobil Faz: ACN/ Su; 25/75. Akış Hızı: 1 ml/dk. Enjeksiyon hacmi: 10 µL. Sıcaklık: 30 °C. Analitler: 1,m-aminoasetanilit; 2,o-aminoanilin; 3,anilin; 4,o-toluidin; 5,p-toluidin; 6,asetanilit; 7,2-kloro-4-nitroanilin; 8,2,4-dinitroanilin; 9,4-kloro-2-nitroanilin; 10,p-aminoanilin. Dalga boyu: 275 nm

Anilinler zayıf alkalın ve kısmen polar aromatic bileşiklerdir ve RPLC kolonlar ile ayrılabilirler (www.sielc.com). Bundan dolayı, kısmen polar bileşiklerin yeni mixed-mod kolondaki ayrılma etkisini test etmek, ayırma mekaniğinin daha iyi anlaşılabilmesi için önemli bilgiler vermektedir. Böylelikle, yeni hazırlanmış durgun faz ile anilinlerin ayrılmaları birçok makalede ortaya konmuştur. Genaro ve ark. 13 anilin türevlerinin İyon Kromatografisi RPLC modda kullanılarak 80 dakikada ayrılmasını açıklamıştır (M.C.Gennaro ve ark. 1990). Erdemir ve ark. Aromatic aminlerin yeni 1,3-alternate-calix [4] arene-bağlı silika durgun faz kullanılarak 7 aromatik aminlerin 30 dakikada ayrılmasını açıklamıştır (S.Erdemir ve ark. 2010). Diğer iki yeni çalışmalarda, 5 anilinler yeni mixed-model kromatografik kolon kullanılarak 8 dakikada ayrılmıştır (M.Sun ve ark. 2013, L.Qiao ve ark. 2016).

Ile-PBA-Mix durgun fazın RPLC özelliklerini çalışmak için, 10 anilin kullanılmıştır. Mobil faz, pH, sıcaklık ve akış hızı için çeşitli ön çalışmalardan sonra, ACN/su: 25/75 kullanılarak 9 anilin Şekil 4.4.2'de görüldüğü üzere 14 dakikada ayrılmıştır.

Analitlerin elüsyon sıralaması tipik RPLC davranışı göstermemiştir. En alkalın ve polar analit olan p-aminoanilin kolonu en son terk ederken (10), o-aminoanilin Şekil 8'de görüldüğü üzere kolonu ikinci sırada terk etmiştir. İki analitin arasında yaklaşık 8 dakika vardır. Bunun sebebi Ile-PBA-Mix'deki amid grupları ile p-aminoanilin'deki nitrojenler arasındaki hidrojen bağı etkileşiminden olabilmektedir. O-aminanilin'de mokolül içi hidrojen bağı olduğundan dolayı, durgun fazdaki amid grubu ile moleküller arası hidrojen bağı ile iyice etkileşmemektedir. Bundan dolayı, o-aminanilin, p-aminaniline göre kolonu çok daha erken terketmektedir. Bu iki analitin elüsyon sıralaması HILIC mekaniğine uymaktadır. Fakat o-amino asetanilit (1) < o-aminoanilin (2) < asetanilit (6); o-amino asetanilide elüsyon sıralamasını dikkate alırsak, asetanilit'ten daha hidrofilik olan ve O-aminanilin'den daha yüksek hidrofobik olan kolonu en erken terk eder. Bu elüsyon sıralaması ne RPLC ne de HILIC mekaniğine uymaktadır.

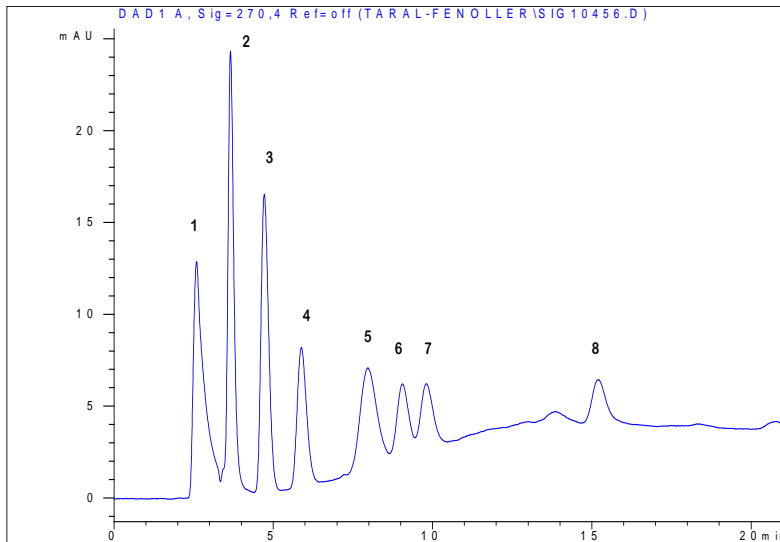
Diğer bir etkili sebep ise belki de analitler ile Ile-PBA-Mix yapısındaki aromatik halkanın arasındaki π - π etkileşimleridir. Güçlü bazik π ya da asidik π halkaları, durgun fazın yapısındaki fenil halkası ile kuvvetlice etkileşmektedir. Örneğin, elektron çekici nitro- ve klor- gruplarını taşıyan analitler (7-9), güçlü asidik- π aromatik halkaya sahiptir ve kolonu geç terk ederler. Analitlerin elüsyon sıralamasına etki eden üçüncü

faktör belki de hidrofobik etkileşimler olabilmektedir. Anilinden çok daha hidrofobik bileşikler olan o- ve p-metilanilinler, kolonu aniline göre daha geç terk ederler. Sonuç olarak, anilinlerin Ile-PBS-Mix ile ayrılma mekanizmasına etki eden faktörler dipol-dipol etkileşim (hidrojen bağı), π - π etkileşimi ve hidrofobik etkileşimler olabilir. Sonuçlar, Ile-PBA-Mix kolonun çift alıkonma mekanizmasını gösterdiğini açıkça ispatlamıştır. Olağan bir HILIC durgun faz ile karşılaştırıldığında; spesifik ve karmaşık içerikli numunelerin analizlerinde bu özellik potansiyel olarak büyük bir esneklik sağlamıştır.

4.4.3. Fenollerin Ayrılması

Fenoller zayıf asidik ve kısmen polar aromatik bileşiklerdir. Bundan dolayı, anailinlere benzer olarak, yeni geliştirilmiş durgun fazın (M.Sun ve ark. 2013, K.Hu ve ark., S.Liu ve ark. 2015, X.D.Cheng ve ark. 2013, L.Qiao ve ark. 2016) ayırma etkilerini test etmek için sıklıkla kullanılan önemli bileşiklerdir. Bu çalışmalarda, 4-7 fenoller 8-15 dakikada ve 12 fenol 20 dakikada ayrılmıştır (X.D.Cheng ve ark. 2013). Dolayısı ile, Ile-PBA-Mix kolonunun asidik bileşikler üzerinde ayrılma etkisini test etmek amacı ile, 8 fenolün karışımı olan vanillik asit, resorsinol, fenol, *p*-kresol, *p*-nitrofenol, 1-naftol, 4-*tert*-butil fenol ve 3,5 di-*tert*-butilfenol, ACN/susuz amonyum fosfat tamponu (pH=7.14, 20 mM), kullanılarak, akış hızı 1 ml/min ve 30 °C'de Ile-PBA-Mix kolon ile 16 dakikada ayırım yapılmıştır (Şekil 3.12). Son zamanlarda geliştirilmiş mixed-model kolonlar ile karşılaştırılmasında, Ile-PBA-Mix kolonu fenollerin ya da kısmen polar ve asidik bileşiklerin ayrılmasında çok etkili olduğu gözlenmiştir.

Alıkonma sırası göz önüne alınarak, Ile-PBA-Mix'deki *p*-nitrofenol haricindeki fenollerin tipik RPLC davranışına uymaktadır. *p*-Nitrofenol, amid gruplar ile güçlü hidrojen bağları ve Ile-PBA-Mix yapısındaki fenil halka ile güçlü π - π etkileşimleri oluşturmuş olabilir.



Şekil 4.4.3. Fenollerin Ile-PBA-Mix durgun fazı ile ayrılması. Mobil Faz: ACN: Susuz amonyum fosfat tampon (pH=7.14, 20 mM), 0-20 dk; 20-70 % lineer gradient elüsyon. Akış hızı: 1 mL/dk. Sıcaklık: 30 °C. Enjeksiyon hacmi: 5 µL. Dalgaboyu: 270 nm. Analitler: 1, Vanillic asit; 2, Resorsinol; 3, Renol; 4, *p*-kresol; 5, *p*-nitrofenol; 6, 1-naftol; 7, *p*-tert-butilfenol; 8, 3,5-di-tert-butilfenol. Dalga boyu: 270 nm

4.5. Kolon Stabilite Testleri

Ile-PBA-Mix kolonu stabilite testleri pH 2.50-8.50 aralığında yapılmıştır. Bunun için iki yeni 50x4.6 mm ölçülerinde kolonlar hazırlanmıştır. Testlerin kromatografik şartları aşağıdaki gibidir: Düşük pH değerleri için mobil faz : 100%, 40 mM, pH = 2.50 ve 3.00 susuz amonyum format, yüksek pH için: 100%, 40 mM, pH = 8.50 susuz amonyum klorür tampon; akış hızı, 1 ml/dk; sıcaklık, 60 °C; dalgaboyu, 280 nm; probe, urasil ve anilin.

Kolon aralıksız olarak pH 3.0 mobil fazı ile purge edilip Urasil ve anilin alıkonma zamanları periyodik olarak test edilip kaydedilmiştir. Yaklaşık 5000 kolon hacmi kadar pH 3.0 mobil fazı kolondan geçirildikten sonra urasil ve anilin alıkonma zamanları arasında bir değişiklik olmamıştır (% 2'nin altında). 2000 kolon hacmi pH 2.5 olan mobil faz kolondan geçirildiğinde, urasil ve anilin alıkonma zamanları yaklaşık %10, 5000 kolon hacmi mobil fazda ise % 20-22 değişim görülmüştür. Bu nedenle, kolonun pH = 3.00'te oldukça kararlı, pH 3.00-2.50 aralığında kısmen veya düşük kararlılığa sahip ve pH 2.5 altında ise kararsız olduğu anlaşılmıştır. Aynı deneyler diğer bir kullanılmamış 50-4.6 mm kolonu kullanılarak pH = 8.50 şartları için tekrarlanmıştır. Yaklaşık 1000 kolon hacminde pH 8.50 mobil fazı akışı kolondan geçtikten sonra alıkonma zamanlarındaki değişimler %2'nin altındadır. Lakin, urasil ve anilinin alıkonma zamanlarında 1500 hacimden sonra, yaklaşık %3-5 ve 5000 hacimden sonra

yaklaşık %15-18 değişim gözlenmiştir. Bundan dolayı, kolon pH 8.50de 1000 kolon volüme kadar kararlı olmasına karşı, pH 8.0ın üstünde çalışırken dikkatli olmak önemlidir. Sonuç olarak, bu kolon pH 3 ve 8 değerleri arasında kararlı olup bu aralıkta çalışılması önerilir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapısında üç farklı amid grubu, alkil ve fenil grupları bulunduran, mixed-model özelliğine sahip yeni sabit fazın HILIC ve ters faz HPLC uygulamaları yapıldı. HILIC uygulamaları için 6 tane nükleotid/nükleozit karışımı ve 6 tane B vitamini kullanıldı. HILIC uygulamaları sonucunda 6 nükleotid/nükleozit 10 dakikada ayrılırken, 6 B vitamini de 25 dakikada ayrılmıştır.

Kolonun ayırma mekanizmasının anlaşılması için HILIC uygulamalarının çeşitli deneysel şartlara karşı (pH, tampon ve asetonitril konsantrasyonu, sıcaklık ve akış hızı) optimizasyonu yapılmış, kolonun analitlerle olan davranışı ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Ters faz uygulamaları için zayıf asid özellikte ve orta polarlıktaki bileşik grupları olan fenol türevleri ve yine orta polarlıkta ama zayıf bazik özellikte olan anilin türevleri kullanıldı. 9 tane fenol 16 dakikada ayrılırken, 9 anilin 14 dakikada ayrılmıştır. Ayrıca yüksek polar, orta polar ve çok düşük polariteye sahip analit karışımlarından oluşan bir örne de kolona verilerek farklı polariteye sahip 9 analit 19 dakikada ayrılmas sağlandı.

Kromatografik testler göstermiştir ki, bu faz, yüksek polardan yüksek apolara kadar geniş çeşitlilikteki analitlerin, hem HILIC hem de RPLC şartları altında ayırımını yapabilmektedir.

Yeni mixed-model durgun faz hem HILIC hem de RPLC uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılabilir olup değişik fizikokimyasal özellikleri olan kompleks analitlerinde ayrılmalarında potansiyel olarak uygulanabilmektedir. Gelecek çalışmalarda bu sabit fazın oldukça kompleks polar ve apolar bileşik karışımlarının ayrılmasında kullanılması planlanmaktadır.

Bu dolgu maddesinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

1. Sentezin çok basamaklı olması üretimi güç ve maliyetli kılmakta, sanayiye uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır.
2. pH 3'ün altında ve 8'in üzerinde dolgu maddesi yeterli kararlılığa sahip değildir. Bunun nedeni silika gele bağlanan ligand miktarının düşük olmasıdır (% 4 karbon oranı).
3. Pik genişlikleri yüksektir. Bunun iki nedeni olabilir: 1) silanol aktivitesinin yüksek olması, 2) kolonun sanayi düzeyinde tam profesyonel şartlarda doldurulmaması.

Bu dezavantajları bertaraf etmek için şunlar yapılabilir:

- 1) Ile-PBA-Mix dolgu maddesine çok benzeyen, ama en faz 2 basamaklı yeni bir dolgu maddesi dizayn edilip yeni mixed-mod kolonlar hazırlanabilir.
- 2) Aynı dolgu maddesi tekrar senezlenerek, daha yüksek miktarda ligand bağlanarak kolon tekrar üretilebilir. Böylece hem hidrolitik kararlılık artacak hem silanol aktivitesi düşecek, hem de çok daha etkili ayırma yapılabilme şansı doğacaktır.
- 3) Özel kolon dolum cihazı temin edilerek veya ticari firmalardan yardım alınarak kolon çok daha profesyonel şartlarda doldurulabilir.

Sonuç olarak, mixed-mod özelliğe sahip, çok fonksiyonlu yeni HPLC kolonunun HILIC/RPLC uygulamaları başarı ile yapılmış, mixed-mod ayırma mekanizmasının detaylı irdelenmiş ve beş farklı analit grubunun başarı ile ayrılması sağlanmıştır. Böylece mixed-mod ayırma mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına önemli katkıda bulunulmuş olup, bundan sonra çok daha etkili yeni kolonların geliştirilmesinin önünü açmış, ideal mixed-mod kolonun geliştirilmesine bir adım daha yaklaşmıştır. Ayrıca, geliştirilen metodlar, mevcut kolon kullanılarak doğal numunelere uygulanabilir, bu analit gruplarının kantitatif tayininde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

A. Abbood, C. Smadja, C. Herrenknecht, Y. Alahmad, A. Tchaplal, M. Taverna, Retention mechanism of peptides on a stationary phase embedded with a quaternary ammonium group: a liquid chromatography study, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3244–3251.

A. Abbood, C. Smadja, M. Taverna, C. Herrenknecht, High performance liquid chromatography separation of structurally related enkephalins on quaternary ammonium-embedded stationary phase in isocratic mode, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 450–458.

A. Halfpenny, P. Brown, Mixed mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and non-ionic nucleic acid constituents, *Chromatographia* 21 (1986) 317–320.

A. Halfpenny, P. Brown, Mixed mode chromatography via column switching for the simultaneous HPLC analysis of ionic and non-ionic nucleic acid constituents, *Chromatographia* 21 (1986) 317–320.

A. Motoyama, T. Xu, C.I. Ruse, J.A. Wohlschlegel, J.R. Yates, Anion and cation mixed-bed ion exchange for enhanced multidimensional separations of peptides and phosphopeptides, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3623–3634.

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

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

A. Shen, Z. Guo, L. Yu, L. Cao, X. Liang, A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol-ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica, *Chem. Commun.* 47 (2011) 4550–4552.

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

A.A. Kazarian, M.R. Taylor, P.R. Haddad, P.N. Nesterenko, B. Paull, Ion-exchange and hydrophobic interactions affecting selectivity for neutral and charged solutes on three structurally similar agglomerated ion-exchange and mixed-mode stationary phases, *Anal. Chim. Acta* 803 (2013) 143–153.

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

A.J. Alpert, Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62–76.

A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr. A* 499 (1990) 177–196.

A.J. Link, J. Eng, D.M. Schieltz, E. Carmack, G.J. Mize, D.R. Morris, et al., Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.* 17(1999) 676–682.

A.K. Mallik, H. Qiu, T. Oishi, Y. Kuwahara, M. Takafuji, H. Ihara, Design of C18 organic phases with multiple embedded polar groups for ultraversatile applications with ultrahigh selectivity, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6614–6621.

A.K. Mallik, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara, Novel approach for the separation of shape-constrained isomers with alternating copolymer-grafted silica in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3320–3328.

Alpert, A.J. 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A*, 499: 177-196

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.

B.C. Trammell, M.A. Hillmyer, P.W. Carr, A study of the lewis acid-base interactions of vinylphosphonic acid-modified polybutadiene-coated zirconia, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3323–3331.

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

B.-Y. Zhu, C.T. Mant, R.S. Hodges, Mixed-mode hydrophilic and ionic interaction chromatography rivals reversed-phase liquid chromatography for the separation of peptides, *J. Chromatogr. A* 594 (1992) 75–86.

C. Song, J. Wang, K. Zhao, Q. Bai, Preparation and characterization of a novel dual-retention mechanism mixed-mode stationary phase with PEG 400 and succinic anhydride as ligand for protein separation in WCX and HIC modes, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 1741–1753.

C.H. Lin, X.X. Lin, L. Lin, J.M. Wang, Z.X. Lin, J.M. Lin, Development of LC–MS method for analysis of paclitaxel-inhibited growth and enhanced therapeutic response in human glioblastoma cells, *Chin. Chem. Lett.* 26 (2015) 1225–1230.

C.T. Mant, J.R. Litowski, R.S. Hodges, Hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography for separation of amphipathic α -helical peptides, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 65–78.

C.T. Mant, R.S. Hodges, Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2754–2773.

D. Cho, S. Park, J. Hong, T. Chang, Retention mechanism of poly(ethylene oxide) in reversed-phase and normal-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 191–198.

D. Kotani, I. D'Acquarica, A. Ciogli, C. Villani, D. Capitani, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 196–211.

D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. Yates, An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5683–5690.

E. Unsal, B. Elmas, B. Çağlayan, M. Tuncel, S. Patir, A. Tuncel, Preparation of an ion-exchange chromatographic support by a “grafting from” strategy based on atom transfer radical polymerization, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5868–5875.

E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 91–104.

G. Gilge, B. Sébille, C. Vidal-Madjar, R. Lemque, K.K. Unger, Optimisation of fast protein separations on non-porous silica-based strong anion exchangers, *Chromatographia* 37 (1993) 603–607.

G. Zhao, X.-Y. Dong, Y. Sun, Ligands for mixed-mode protein chromatography: principles, characteristics and design, *J. Biotechnol.* 144 (2009) 3–11.

H. Aral, T. Aral, B. Ziyadanoğulları, R. Ziyadanoğulları, Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones, *Talanta* 116 (2013) 155–163.

H. Aral, T. Aral, K.S. Çelik, G. Topal, Preparation of a novel ionic hybrid stationary phase by non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with amino-derivatized silica gel for fast HPLC separation of aromatic compounds, *Talanta* 149 (2016) 21–29.

H. Aral, farklı polaritelere sahip amid-silika kolon dolgu materyallerinin sentezi ve hplc ile çeşitli polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılması, doktora tezi, Dicle Üniversitesi (2013)

H. Aral, K.S. Çelik, R. Altındağ, T. Aral, Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography, *Talanta* 174 (2017) 703–714

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

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

H. Luo, L. Ma, C. Paek, P.W. Carr, Application of silica-based hyper-crosslinked sulfonate-modified reversed stationary phases for separating highly hydrophilic basic compounds, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 8–18.

H. Qiu, A.K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara, A facile and specific approach to new liquid chromatography adsorbents obtained by ionic self-assembly, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 7288–7297.

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

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

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

H. Qiu, S. Jiang, X. Liu, L. Zhao, Novel imidazolium stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 46–50.

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

H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 2004–2021.

J. Hao, F. Wang, X. Dai, B. Gong, Y. Wei, Preparation of poly(vinyltetrazole) chain-grafted poly(glycidymethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads by surface-

initiated atom transfer radical polymerization for the use in weak cation exchange and hydrophilic interaction chromatography, *Talanta* 85 (2011) 482–487.

J. Lin, J. Lin, X. Lin, Z. Xie, Preparation of a mixed-mode hydrophilic interaction/anion-exchange polymeric monolithic stationary phase for capillary liquid chromatography of polar analytes, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 801–806.

J.F.K. Huber, M. Pawłowska, P. Markl, Solvent-generated liquid-liquid chromatography with aqueous ternary systems, *Chromatographia* 19 (1984) 19–28.

J.M. Bussolo, Reversed-phase liquid chromatography of proteins and peptides, *Am. Biotechnol. Lab.* 2 (1984) 20.

J. Wei, Z. Guo, P. Zhang, F. Zhang, B. Yang, X. Liang, A new reversed-phase/strong anion-exchange mixed-mode stationary phase based on polar-copolymerized approach and its application in the enrichment of aristolochic acids, *J. Chromatogr. A* 1246 (2012) 129–136.

K. HU, W. Zhang, H. Yang, Y. Cui, J. Zhang, W. Zhao, A. Yu, S. Zhang, Calixarene Ionic Liquid Modified Silica Gel: A Novel Stationary Phase for Mixed-mode Chromatography.

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

K. Kimata, T. Hirose, K. Moriuchi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, High-capacity stationary phases containing heavy atoms for HPLC separation of fullerenes, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2556–2561.

K. Ohyama, Y. Fukahori, K. Nakashima, T. Sueyoshi, N. Kishikawa, N. Kuroda, Adamantyl-functionalized polymer monolith for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1501–1505.

K. Ohyama, Y. Fukahori, K. Nakashima, T. Sueyoshi, N. Kishikawa, N. Kuroda, Adamantyl-functionalized polymer monolith for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1501–1505.

K.B. Sentell, J.G. Dorsey, Retention mechanisms in reversed-phase liquid chromatography. Stationary-phase bonding density and partitioning, *Anal. Chem.* 61 (1989) 930–934.

L. Qiao, A. Duou, X. Shi, H. Li, Y. Shan, X. Lu, G. Xu, Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1286 (2013) 137–145.

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

L. Qiao, X. Zhou, Y. Zhang, A. Yu, K. Hu, S. Zhang, 4-Chloro-6-pyrimidinylferrocene modified silica gel: a novel multiple-function stationary phase for mixed-mode chromatography, *Talanta* 153 (2016) 8–16.

L. Wang, W. Wei, Z. Xi, X. Jie, Z.Z. Xia, Recent Advances in Materials for Stationary- Phases of Mixed-mode High-performance Liquid Chromatography 80 (2016), 2016, pp. 495–506.

L. Zhang, Q. Dai, X. Qiao, C. Yu, X. Qin, H. Yan, Mixed-mode chromatographic stationary phases: recent advancement and its applications for high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 143–163.

L.A. Kennedy, W. Kopaciewicz, F.E. Regnier, Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode, *J. Chromatogr. A* 359 (1986) 73–84.

L.A. Kennedy, W. Kopaciewicz, F.E. Regnier, Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode, *J. Chromatogr. A* 359 (1986) 73–84.

L.C. Sander, S.A. Wise, Synthesis and characterization of polymeric C18 stationary phases for liquid chromatography, *Anal. Chem.* 56 (1984) 504–510.

L.W. McLaughlin, Mixed-mode chromatography of nucleic acids, *Chem. Rev.* 89 (1989) 309–319.

L.W. McLaughlin, Mixed-mode chromatography of nucleic acids, *Chem. Rev.* 89 (1989) 309–319.

M. Biba, E. Jiang, B. Mao, D. Zewge, J.P. Foley, C.J. Welch, Factors influencing the separation of oligonucleotides using reversed-phase/ion-exchange mixed-mode high performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 69–77.

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

M. Slater, M. Snauko, F. Svec, J.M.J. Fréchet, “Click Chemistry” in the Preparation of Porous Polymer-Based Particulate Stationary Phases for μ -HPLC Separation of Peptides and Proteins, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4969–4975.

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

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

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

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

M.P. Washburn, D. Wolters, J.R. Yates, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 242–247.

M.R. Sardar, Y. Jin, G. Kong, H. Li, J.M. Lin, Molecularly imprinted polymer for pre-concentration of esculetin from tobacco followed by the UPLC analysis, *Sci. China Chem.* 57 (2014) 1751–1759.

M.T.W. Hearn, C. Horvath (Editor), *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 3, Academic Press, New York, 1983, p. 87.

M. Walshe, M.T. Kelly, M.R. Smyth, H. Ritchie, Retention studies on mixed-mode columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 708 (1995) 31–40.

McCalley, D.V. 2007. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns 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.

N.H. Davies, M.R. Euerby, D.V. McCalley, A study of retention and overloading of basic compounds with mixed-mode reversed-phase/cation-exchange

columns in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007)65–72.

O. Gezici, H. Kara, Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and HILIC behavior, *Talanta* 85 (2011) 1472–1482.

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

P. Jandera, J. Urban, V. Škeršiková, P. Langmaier, R. Kubíčková, J. Planeta, Polymethacrylate monolithic and hybrid particle-monolithic columns for reversed-phase and hydrophilic interaction capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 22–33.

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

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

P. Yang, W. Wang, X. Xiao, L. Jia, Hydrothermal preparation of hybrid carbon/silica monolithic capillary column for liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1911–1918.

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

Q. Wang, M. Ye, L. Xu, Z.G. Shi, A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications, *Anal. Chim. Acta* 888 (2015) 182–190.

Q. Wang, Y. Long, L. Yao, L. Xu, Z.G. Shi, L. Xu, Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DDT stationary phase, *Talanta* 146 (2016) 442–451.

R. Nikolov, Mixed retention mechanisms in reversed-phase high-performance liquid chromatography with alkyl-bonded silica, *J. Chromatogr. A* 286 (1984)147–162.

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

R.S. Hodges, Y. Chen, E. Kopecky, C.T. Mant, Monitoring the hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side-chains in the non-polar and polar faces of amphipathic α -helices by reversed-phase and hydrophilic interaction/cationexchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 161–172.

S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, New-alkyl-phosphate bonded stationary phase for liquid chromatographic separation of biologically active compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 731–740.

S. Kawano, H.Y. Hao, Y. Hashi, J.M. Lin, Analysis of chloramphenicol in honey by on-line pretreatment liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Chin. Chem. Lett.* 26 (2015) 36–38.

S. Kawano, Y. Inohana, Y. Hashi, J.M. Lin, Analysis of keto-enol tautomers of curcumin by liquid chromatography/mass spectrometry, *Chin. Chem. Lett.* 24 (2013) 685–687.

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

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

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

S. Wongyai, Synthesis and characterization of phenylpropanolamine bonded silica for multimode liquid chromatography of small molecules, *Chromatographia* 38 (1994) 485–490.

S. Wongyai, Synthesis and characterization of phenylpropanolamine bonded silica for multimode liquid chromatography of small molecules, *Chromatographia* 38(1994) 485–490.

S.C. Burton, D.R.K. Harding, Salt-independent adsorption chromatography: new broad-spectrum affinity methods for protein capture, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 275–287.

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

T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7632–7642.

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

T. Tang, W.B. Zhang, J.W. Xu, M.Z. Xia, X.D. Gong, F.Y. Wang, T. Li, *Chin. J. Anal. Chem.* 45 (2017) 56–60.

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.

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

W.H. McDonald, R. Ohi, D.T. Miyamoto, T.J. Mitchison, J.R. Yates III, Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT, *Int. J. Mass Spectrom.* 219 (2002) 245–251.

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

X. Dong, A. Shen, Z. Gou, D. Chen, X. Liang, Hydrophilic interaction/weak cation-exchange mixed-mode chromatography for chitoooligosaccharides separation, *Carbohydr. Res.* 361 (2012) 195–199.

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

- X. Li, Z. Guo, Q. Sheng, X. Xue, X. Liang, Sequential elution of multiply and singly phosphorylated peptides with polar-copolymerized mixed-mode RP18/SCX material, *Analyst* 137 (2012) 2774–2776.
- X. Lin, J. Lin, Y. Sun, Y. Li, Z. Xie, A facile versatile polymeric monolith for multiple separations, *Analyst* 138 (2013) 771.
- X. Liu, C. Pohl, A. Woodruff, J. Chen, Chromatographic evaluation of reversed-phase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases prepared by electrostatically driven self-assembly process, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3407–3412.
- X. Liu, C. Pohl, New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 83–89.
- X. Liu, C. Pohl, New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 83–89.
- X. Liu, C.A. Pohl, Comparison of reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimodal stationary phases and their use in active pharmaceutical ingredient and counterion determinations, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 190–195.
- X. Liu, C.A. Pohl, HILIC behavior of a reversed-phase/cation-exchange/anionexchange trimodal column, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 779–786.
- X. Qiao, L. Zhang, N. Zhang, X. Wang, X. Qin, H. Yan, et al., Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/ hydrophilic interaction mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1400 (2015) 107–116.
- X.D. Cheng, X.T. Peng, Q.W. Yu, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Preparation and chromatographic evaluation of a novel phosphate ester-bonded stationary phase with complexation and hydrophobic interactions retention mechanism, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 81–87.
- Y. Kawade, T. Okamoto, Y. Yamamoto, Fractionation of soluble RNA by chromatography on DEAE ion exchangers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10 (1963) 200–203.
- Y. Li, J. Yang, J. Jin, X. Sun, L. Wang, J. Chen, New reversed-phase/anionexchange/ hydrophilic interaction mixed-mode stationary phase based on dendritic polymer-modified porous silica, *J. Chromatogr. A* 1337 (2014) 133–139.
- Y. Li, Y. Feng, T. Chen, H. Zhang, Imidazoline type stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5987–5994.
- Y. Li, Z. Xu, Y. Feng, X. Liu, T. Chen, H. Zhang, Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Chromatographia* 74 (2011) 523–530.
- Y. Li, Z. Xu, Y. Feng, X. Liu, T. Chen, H. Zhang, Preparation and evaluation of poly-L-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, *Chromatographia* 74 (2011) 523–530.
- Y. Liu, Q. Du, B. Yang, F. Zhang, C. Chu, X. Liang, Silica based click amino stationary phase for ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography, *Analyst* 137 (2012) 1624–1628.
- Y. Liu, Z. Guo, Y. Jin, X. Xue, Q. Xu, F. Zhang, et al., Click oligo(ethylene glycol)”: an excellent orthogonal stationary phase to C18 for two-dimensional reversed-phase/reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 153–159.

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

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

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

Y. Zhang, Y. Zhang, G. Wang, W. Chen, P. He, Q. Wang, Simultaneous separation of polar and non-polar mixtures by capillary HPLC based on an octadecylsilane and taurine derivatized silica continuously packed column, *Talanta* 161 (2016) 762–768.

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

Z. El Rassi, C. Horvath, Tandem columns and mixed-bed columns in highperformance liquid chromatography of proteins, *J. Chromatogr.* 359 (1986) 255–264.

Z. Guo, A. Lei, X. Liang, Q. Xu, Click chemistry: a new facile and efficient strategy for preparation of functionalized HPLC packings, *Chem. Commun.* 43 (2006) 4512–4514.

Z. Guo, A. Lei, Y. Zhang, Q. Xu, X. Xue, F. Zhang, et al., “Click saccharides”: novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Chem. Commun.* 24 (2007) 2491–2493.

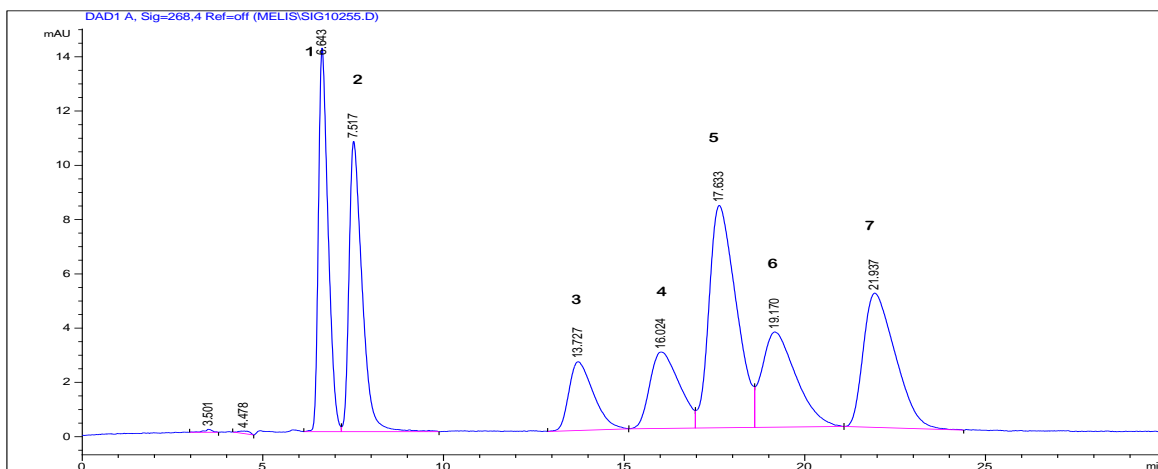
Z. Guo, Y. Jin, T. Liang, Y. Liu, Q. Xu, X. Liang, et al., Synthesis, chromatographic evaluation and hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode behavior of a “Click β -cyclodextrin” stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 257–263.

Z. Liu, B.D. Cai, Y.Q. Feng, Rapid determination of endogenous cytokinins in plant samples by combination of magnetic solid phase extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 891-892 (2012) 27–35.

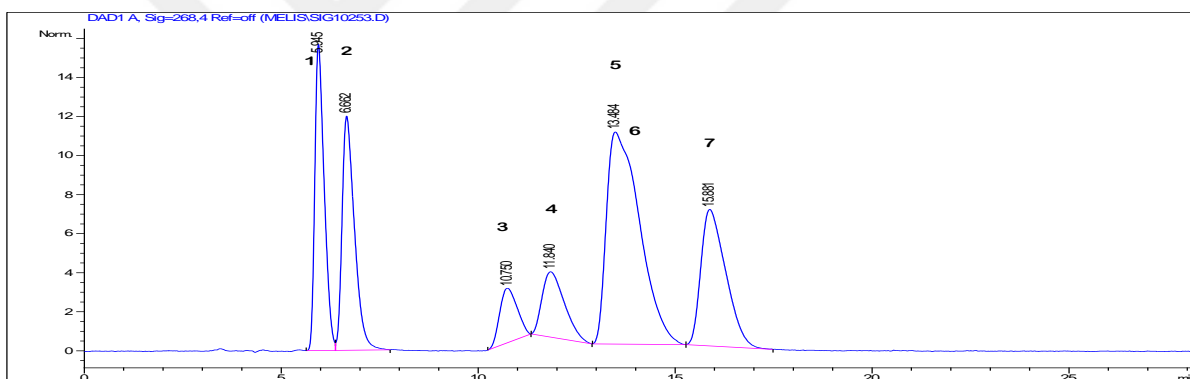
EKLER

Tampon içeriği etkisi

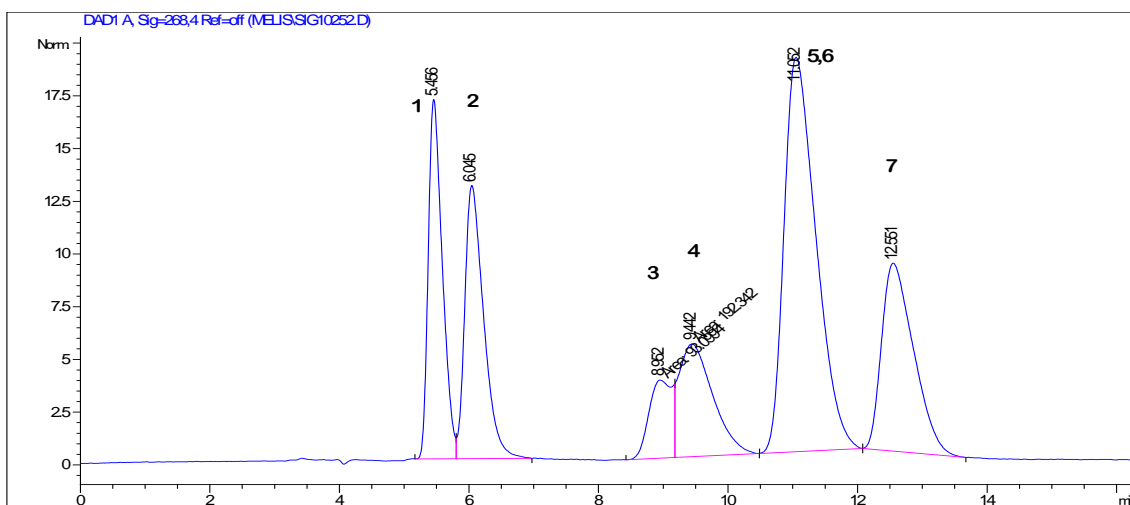
%12 tampon



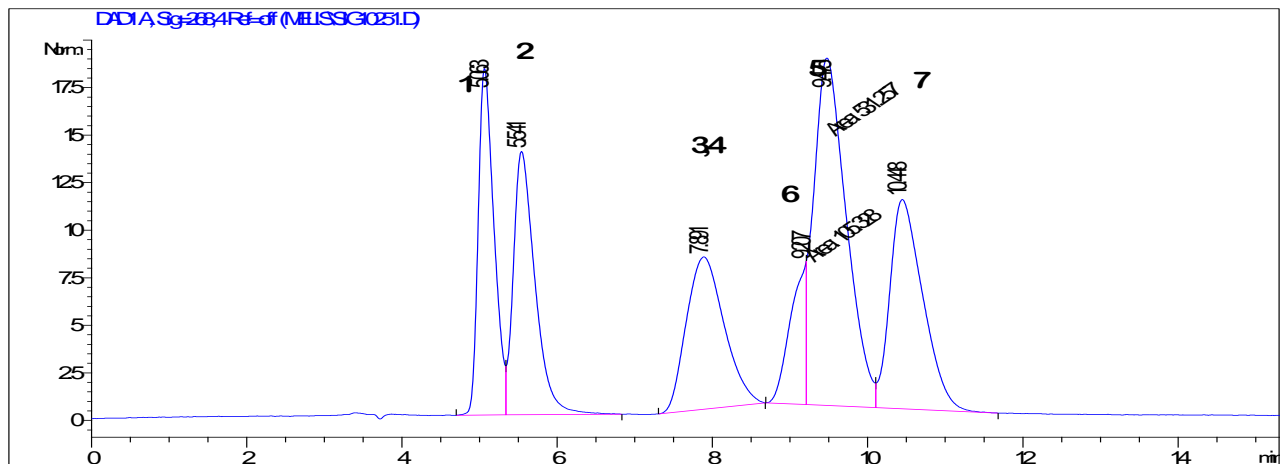
%15



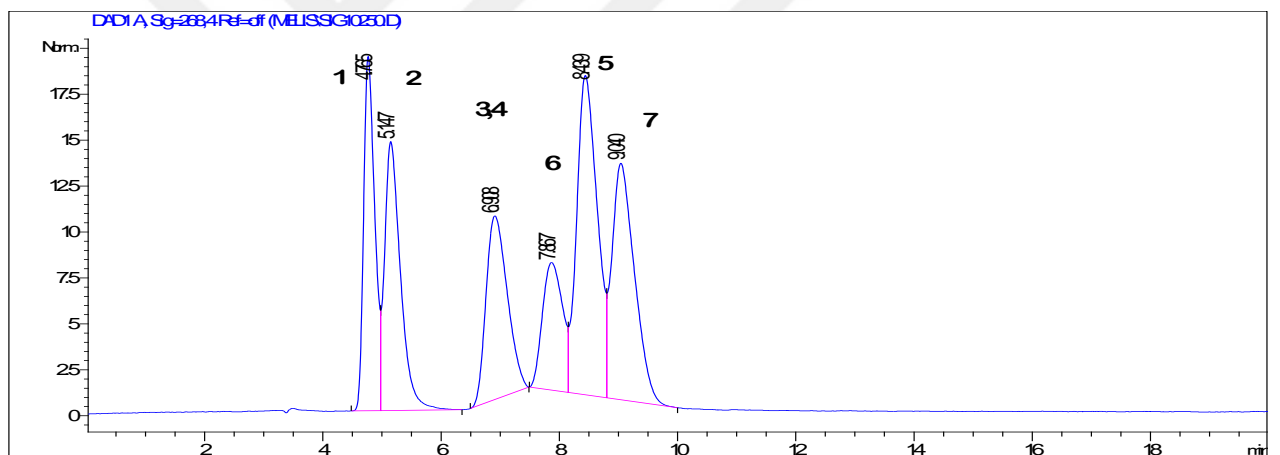
%18



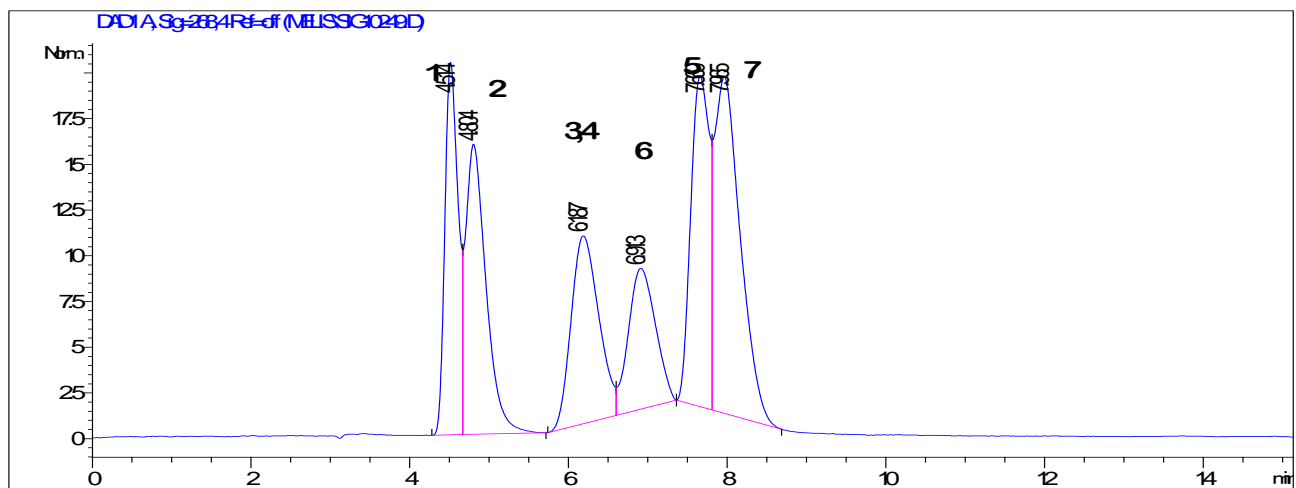
%21



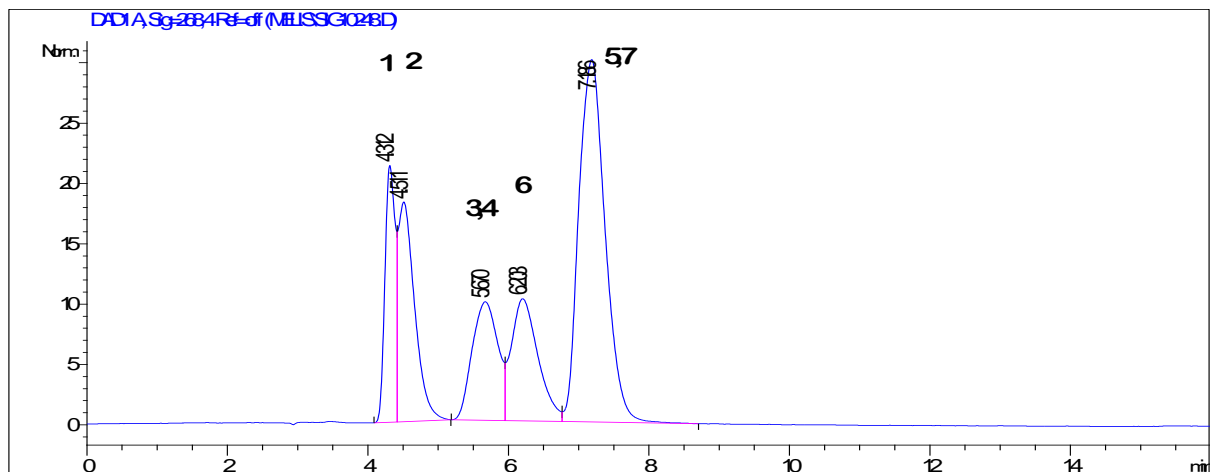
%24



%27

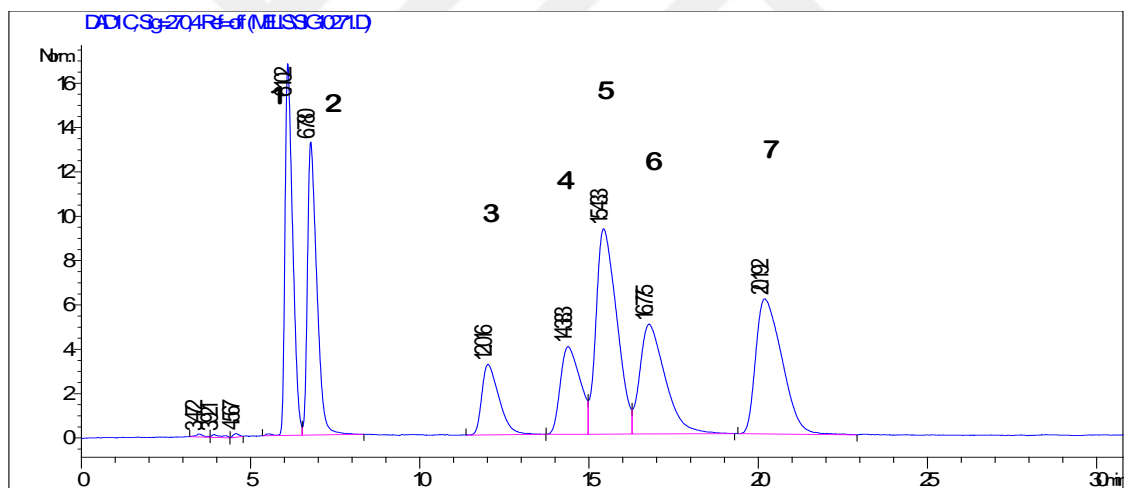


%30

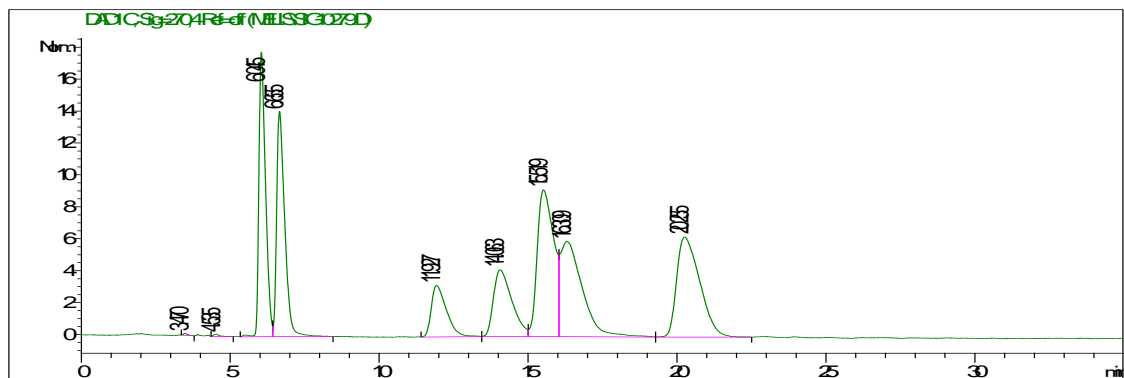


pH etkisi

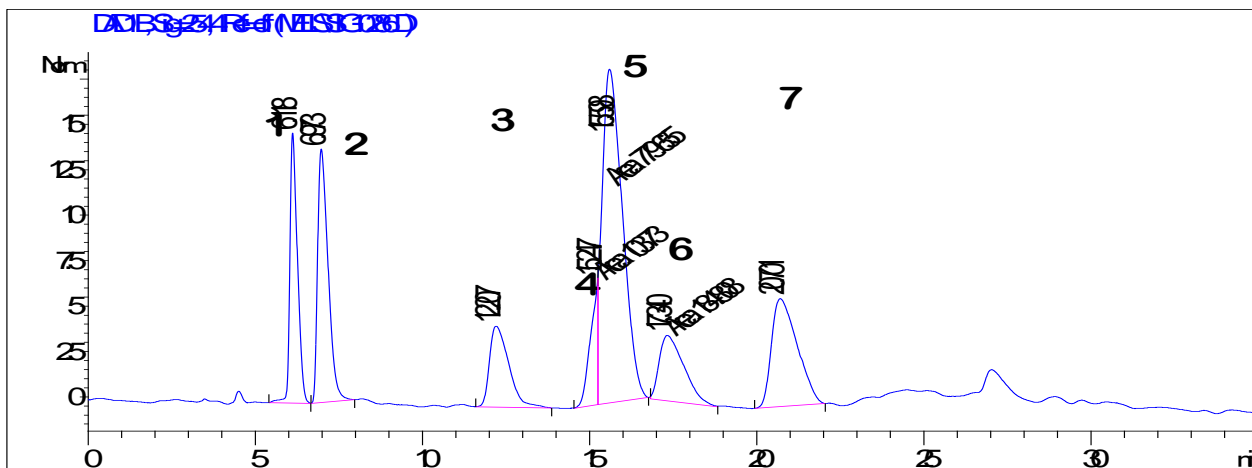
pH 8.20



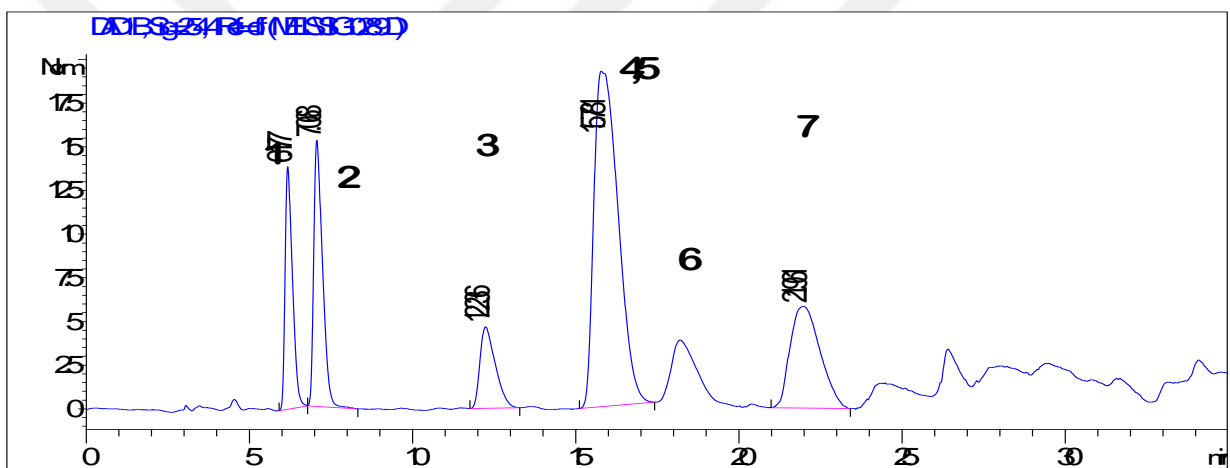
pH 7.78



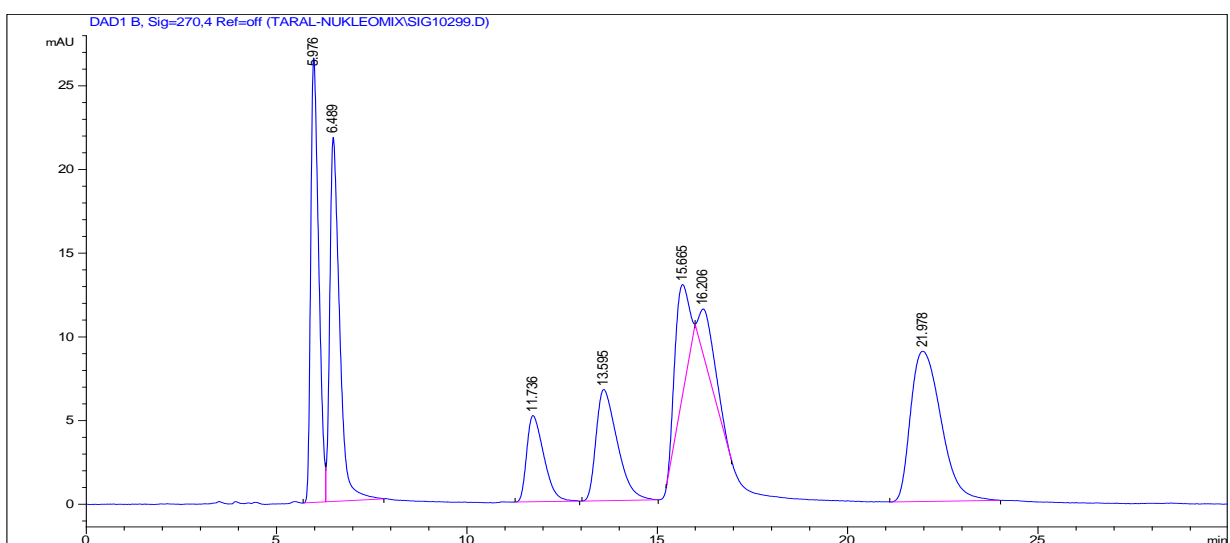
pH 7.14

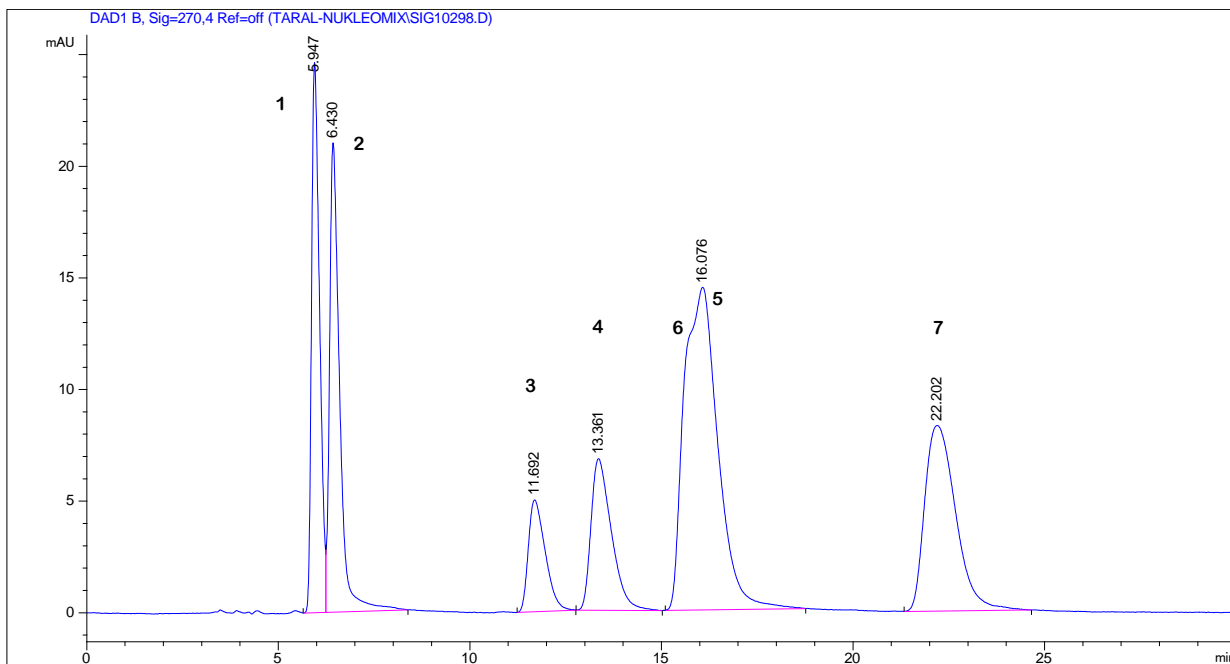
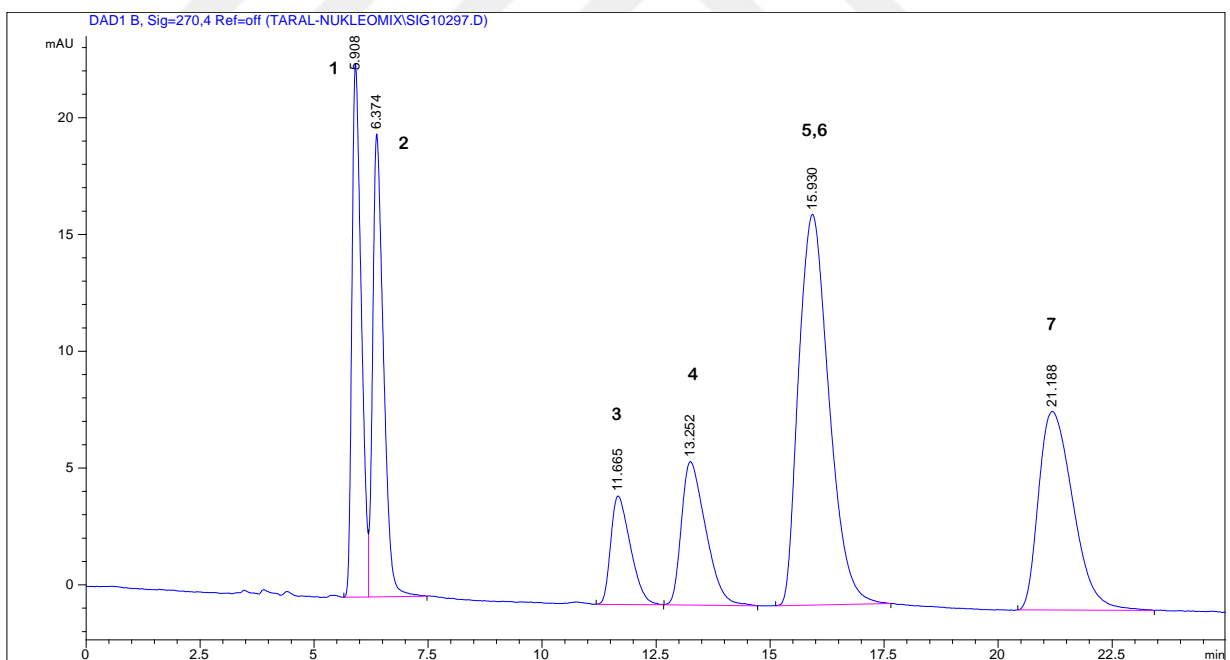


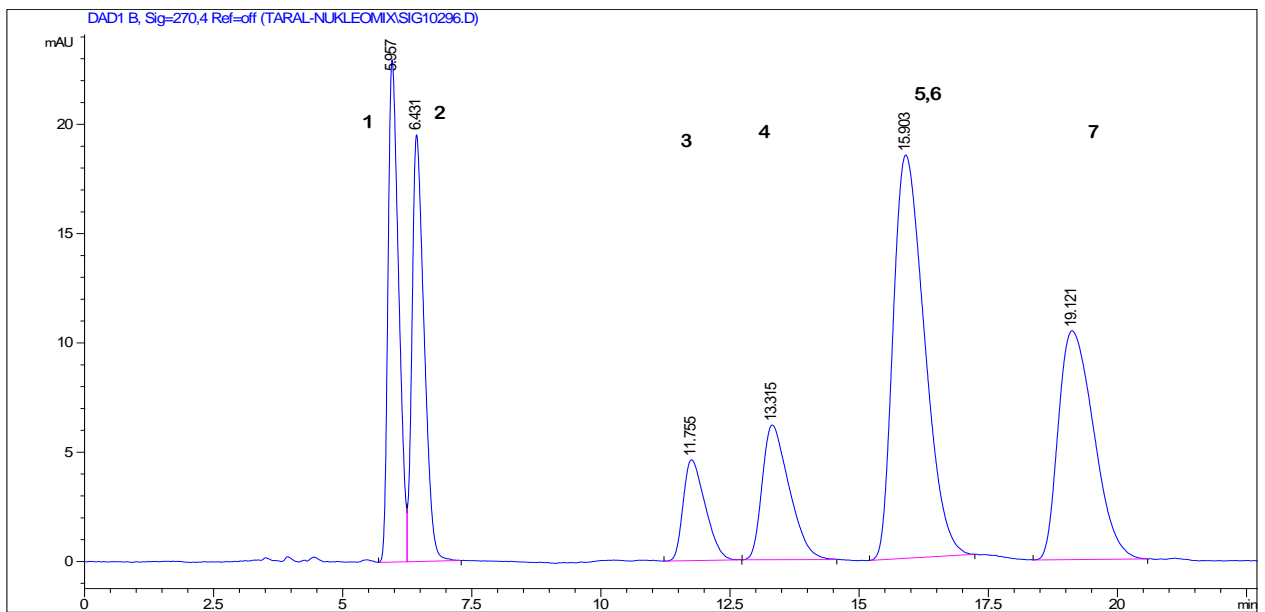
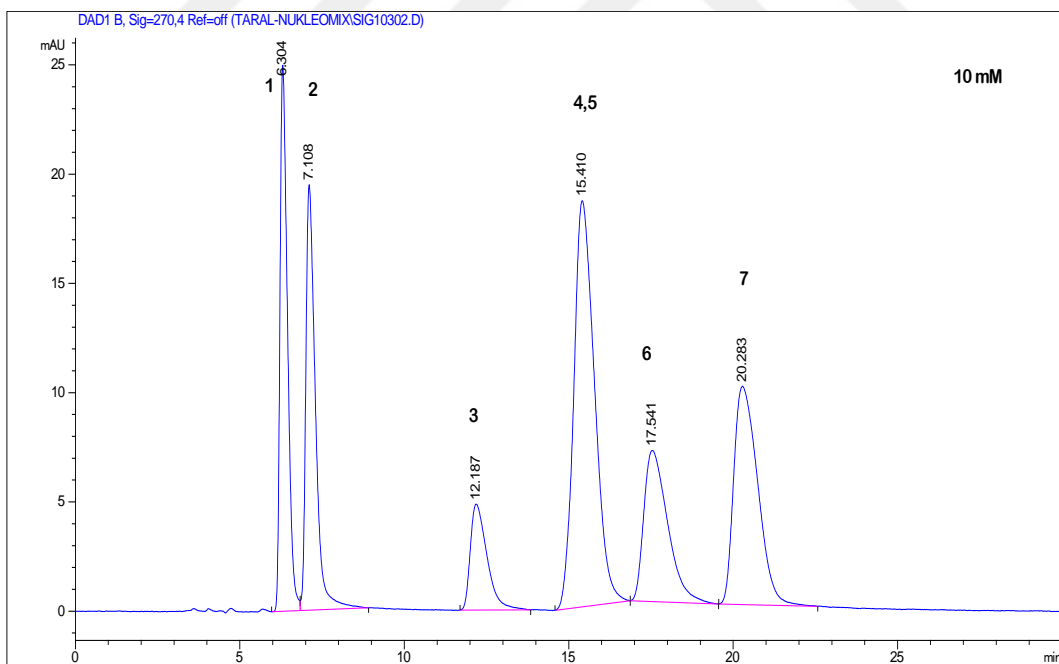
pH 6.55

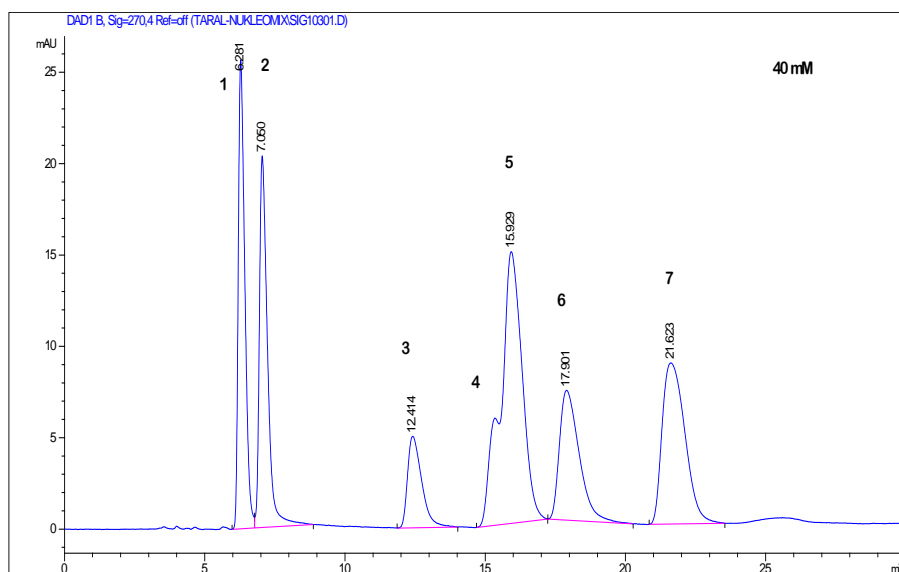
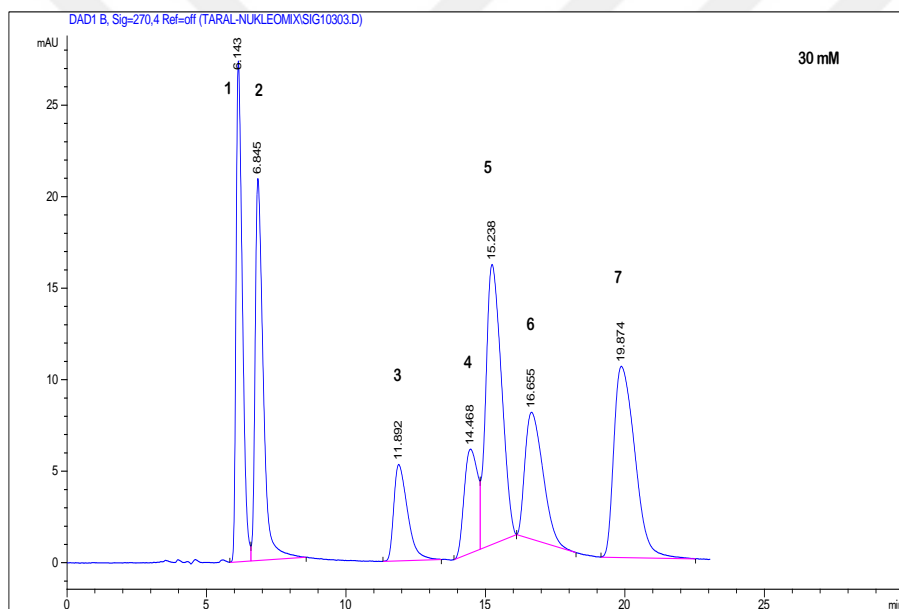
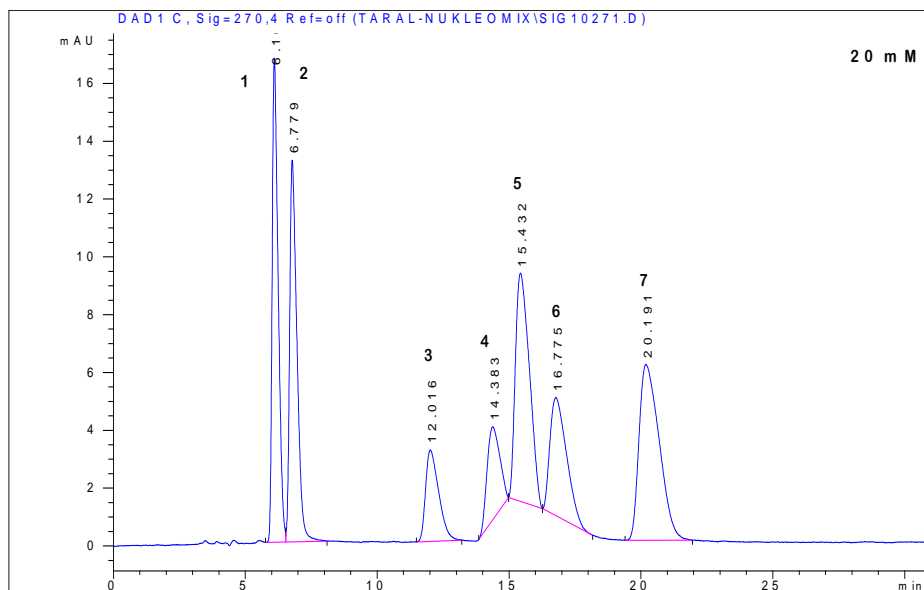


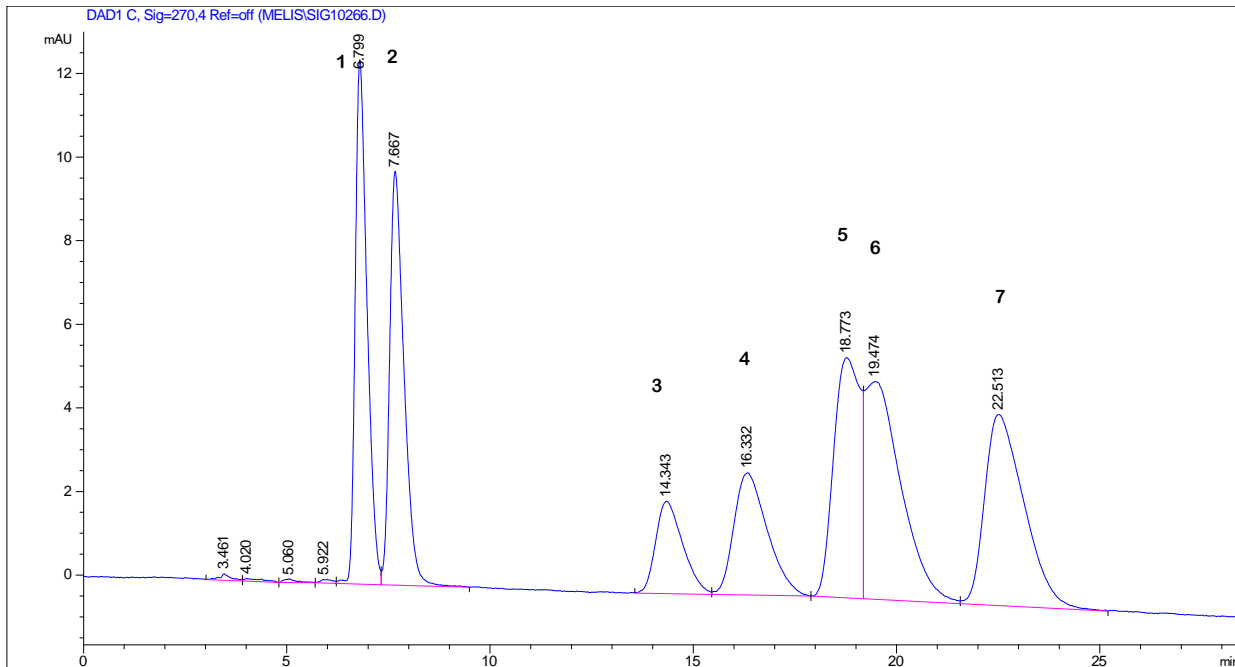
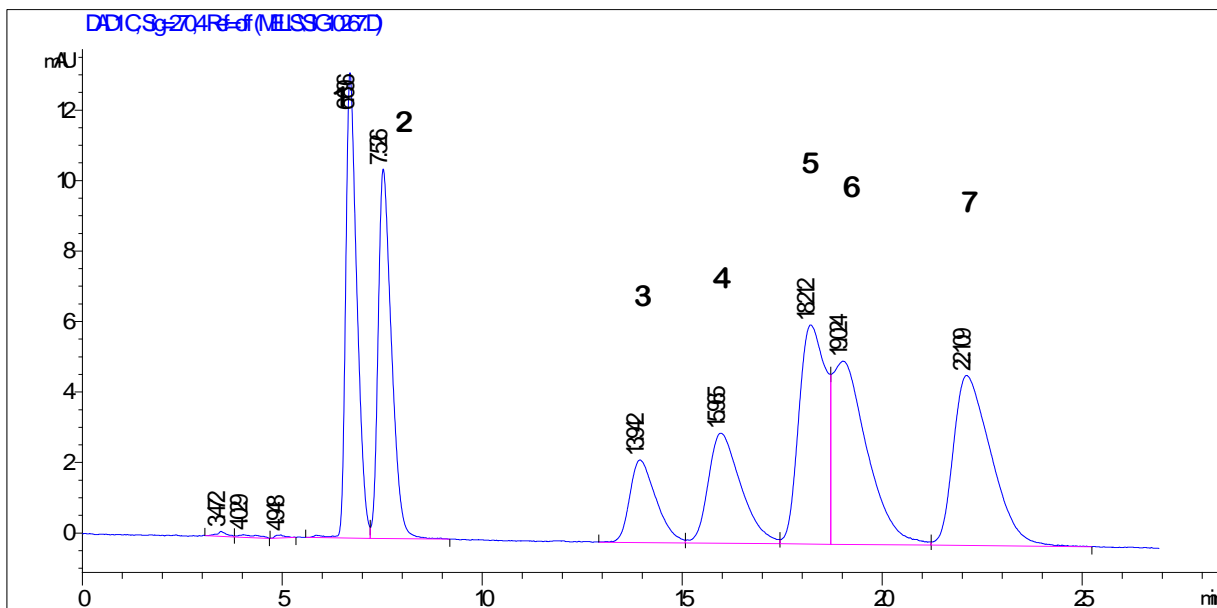
pH 5.71



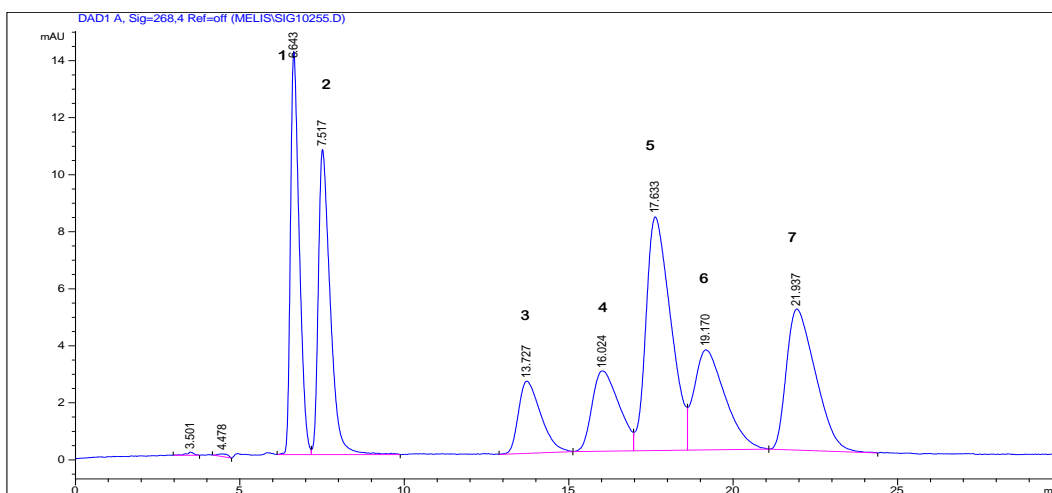
pH 5.00**pH of 4.40**

pH of 3.20**Tampon Konsantrasyonu Etkisi**

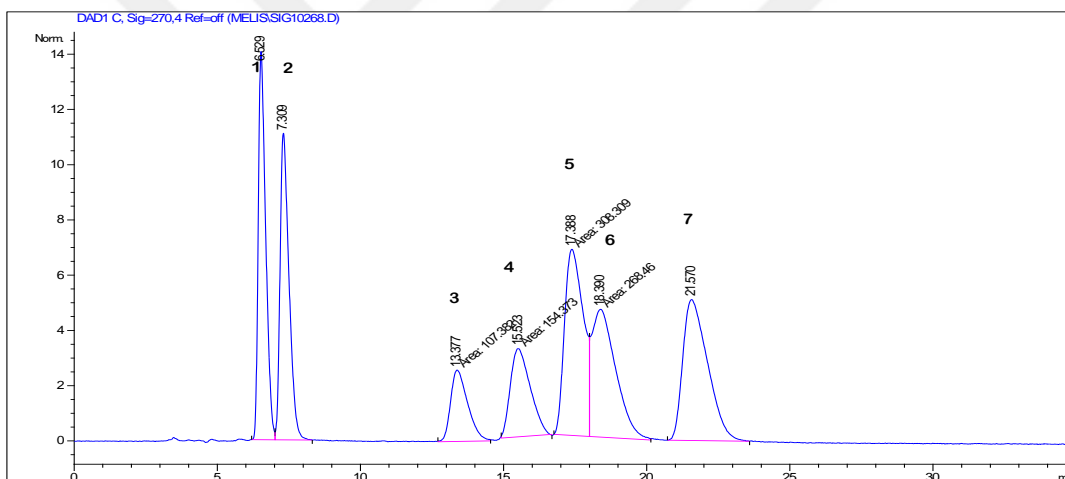


Sıcaklık Etkisi**10 °C****15 °C**

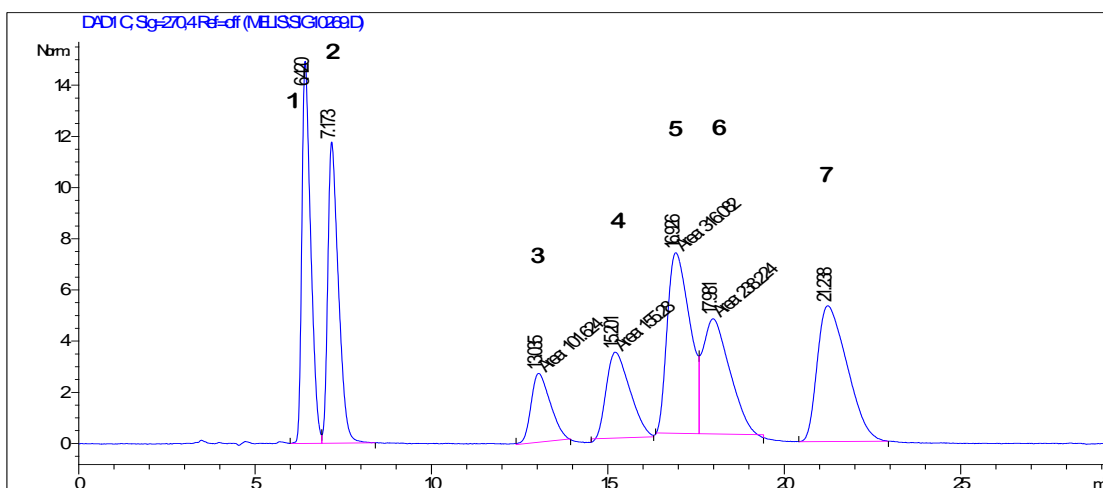
20 °C



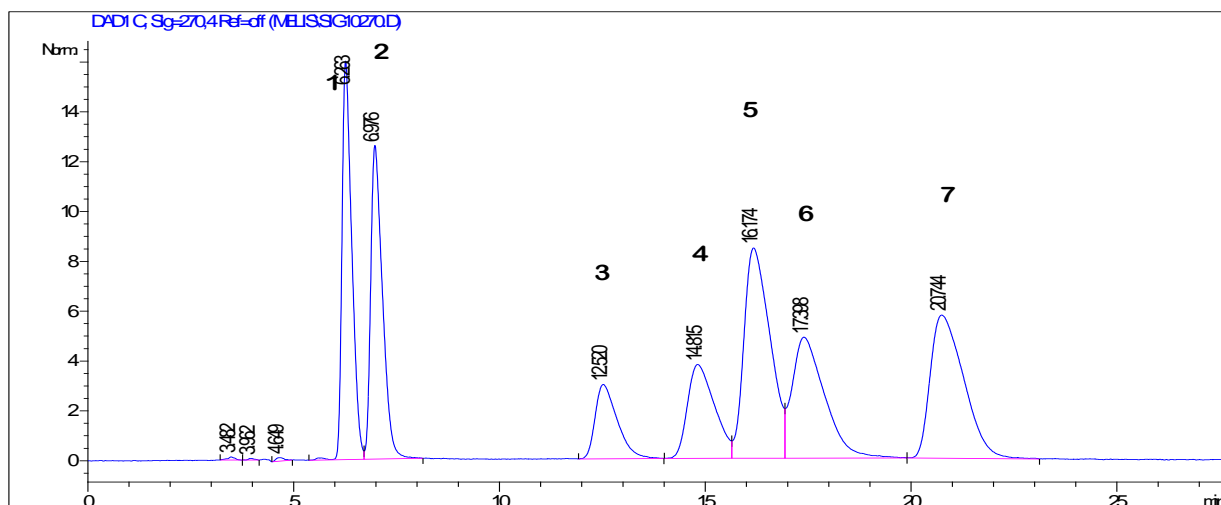
25 °C



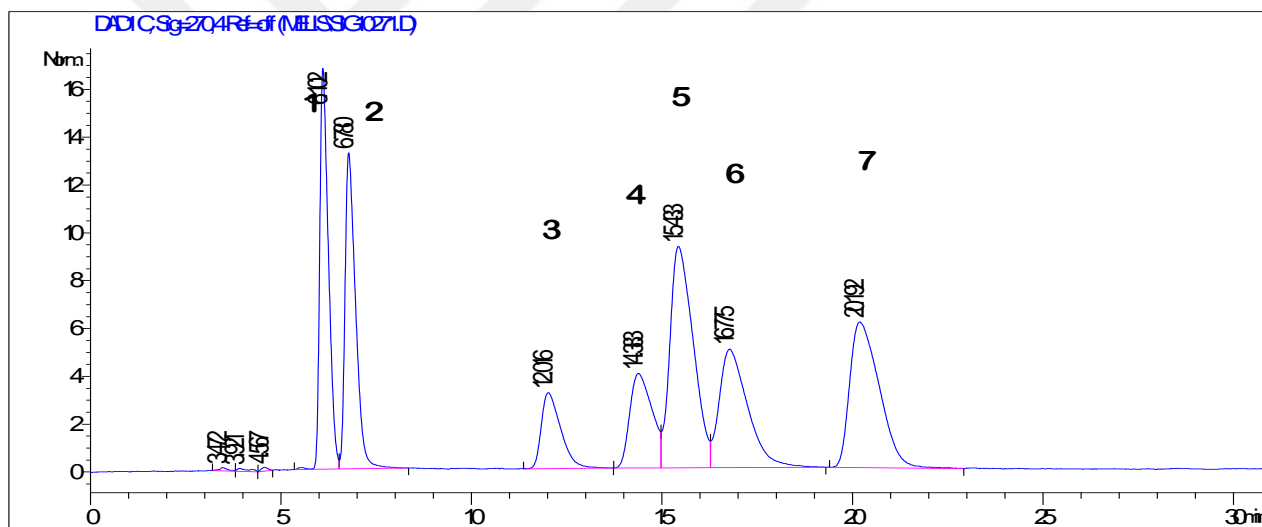
30 °C



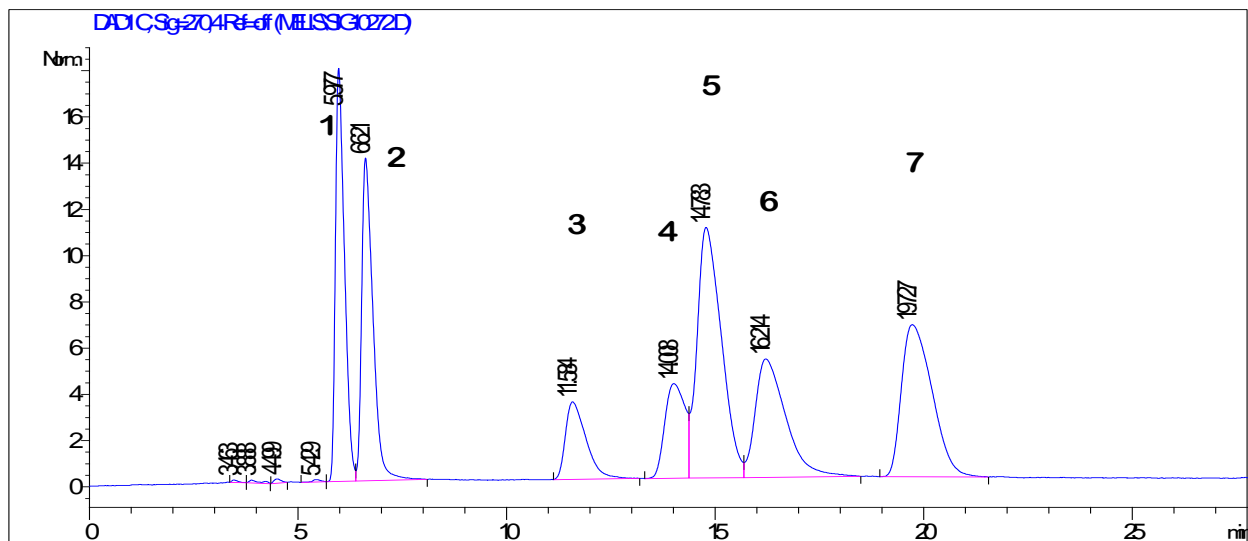
40 °C



50 °C

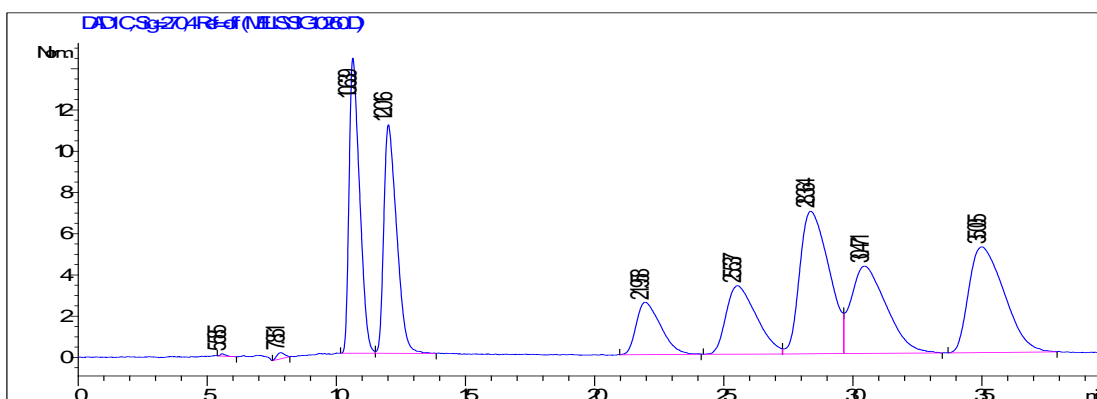


60 °C

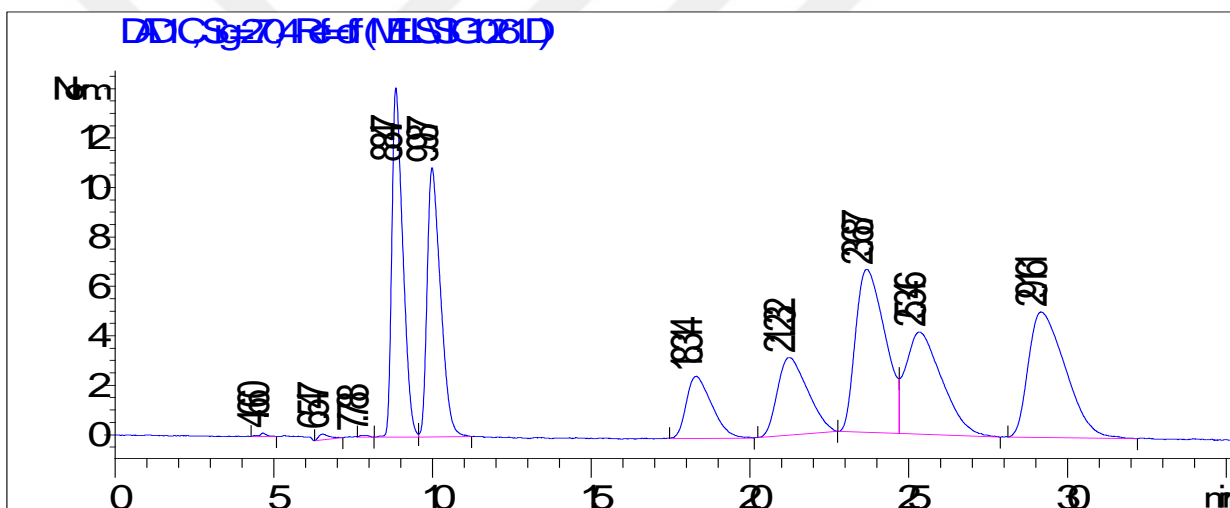


Akış Hızı Etkisi

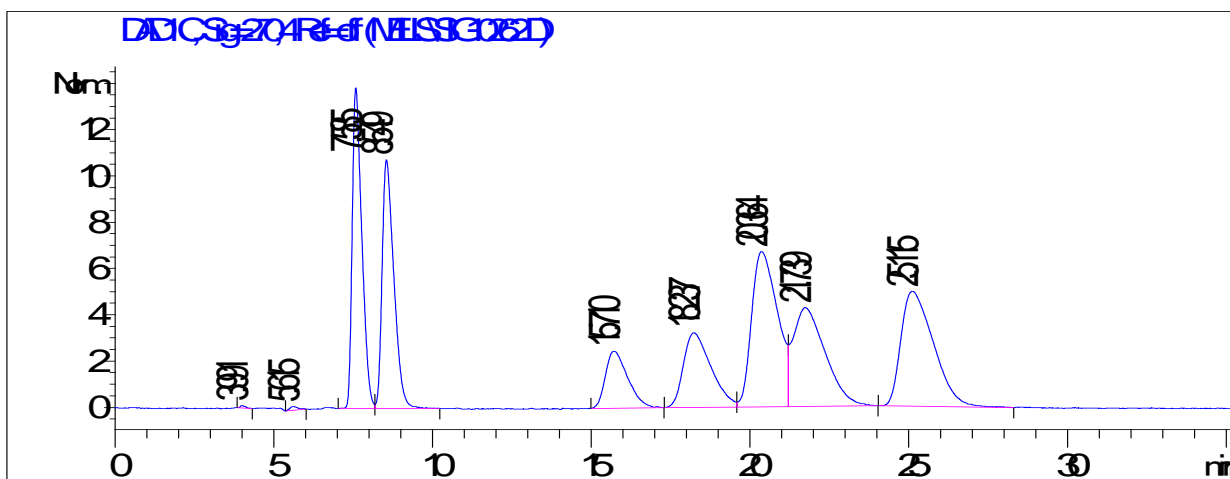
0.5 ml/min



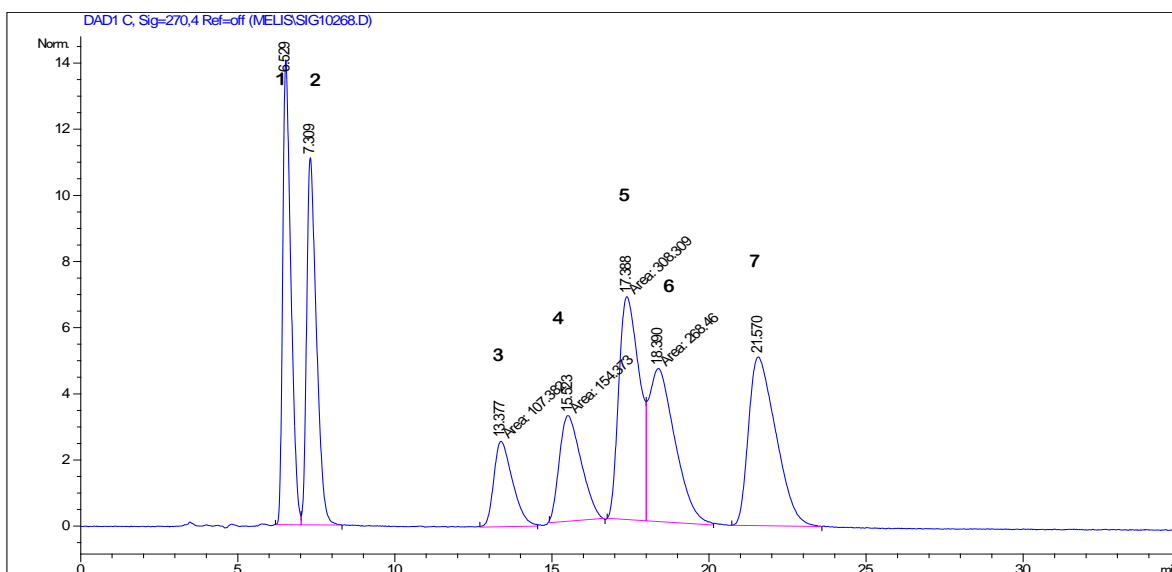
0.6 ml/min



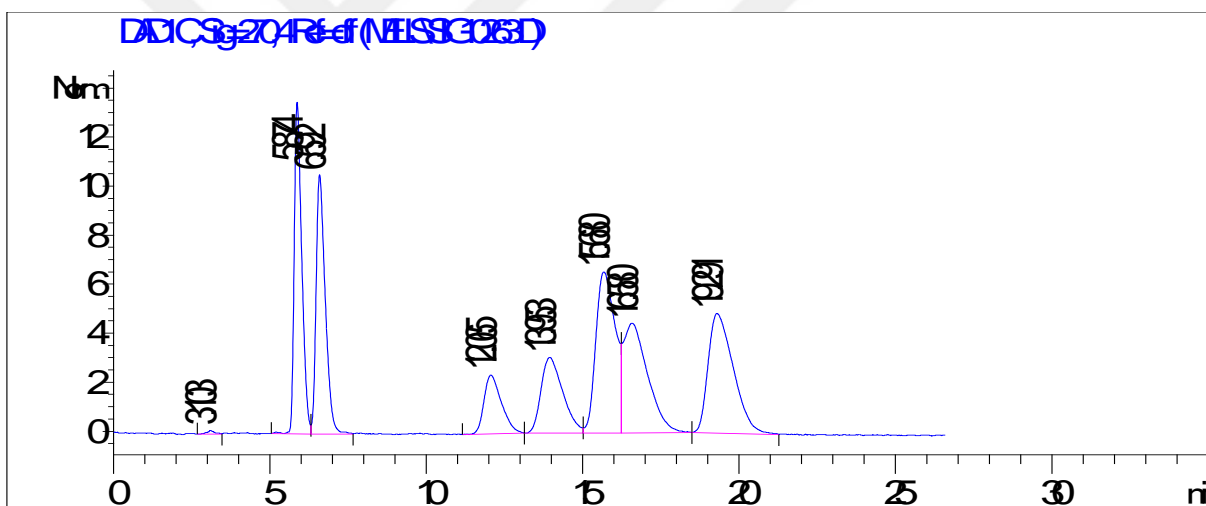
0.7 ml/min



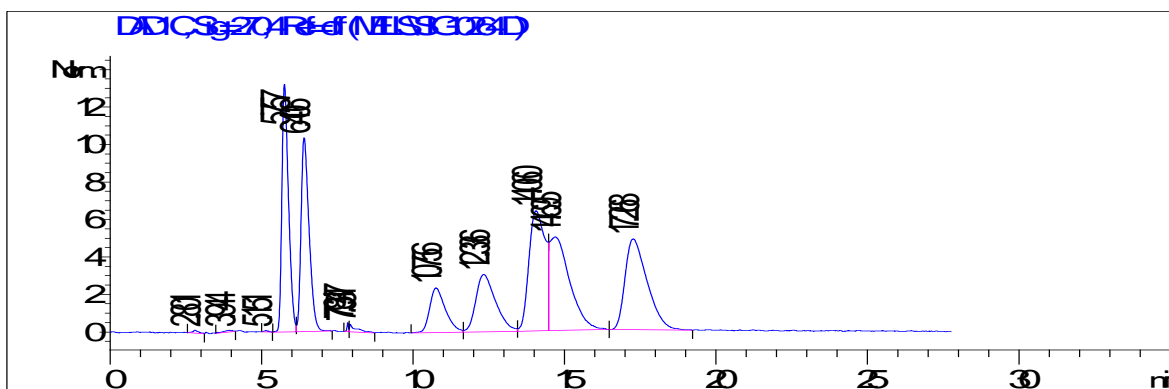
0.8 ml/min



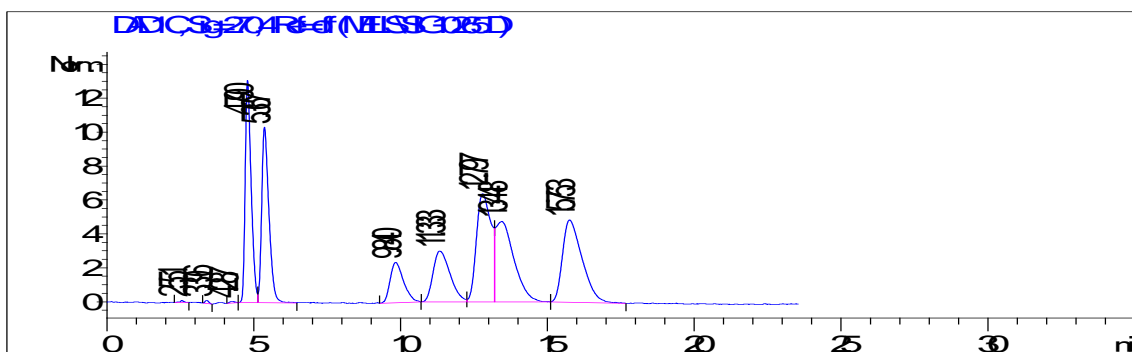
0.9 ml/min



1.0 ml/min



1.1 ml/min



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ramazan ALTINDAĞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : DİYARBAKIR/1992
Telefon : 0554 779 37 64
Faks : -
e-mail : raltindag2162@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Ziya Gökalp Lisesi/Diyarbakır	2010
Üniversite	: Munzur Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	: Batman Üniversitesi	Devam
Doktora	:	

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER : İNGİLİZCE

YAYINLAR

Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography (Talanta 174 (2017) 703–714)